Nancy-Université
Université Henri Poincaré

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

➢ Contact SCD Nancy 1 : theses.sciences@scd.uhp-nancy.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Natacha SLOBODA**

Facteurs environnementaux et génétiques pouvant influencer l'apparition de la rigidité artérielle, étude du rat Zucker et de la souris Klotho

Soutenue le 7 novembre 2011

Membres du jury :

Rapporteurs :

M. Daniel HAYOZ	Professeur, CHU Vaudois, Lausanne
Mme Florence PINET	Directeur de Recherche, Inserm UMR 744, Lille

Examinateurs :

M. Pascal BOUSQUET (Président du jury)	Professeur, EA 4438, Strasbourg
M. Athanase BENETOS	Professeur, Inserm U961 Nancy Université, Directeur de thèse
Melle Rosine NZIETCHUENG	Docteur, Inserm U961 Nancy Université, co-directeur de thèse

Membre invité :

Mme Anne PIZARD	Chargé de recherche, Inserm U961 Nancy Université, Nancy

---

Travail effectué au laboratoire INSERM U961, « *Risque cardiovasculaire, rigidité-fibrose et hypercoagulabilité* »
Faculté de Médecine de Nancy, Vandoeuvre-les-Nancy, Nancy Université

Je remercie le Professeur Athanase Benetos, pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Merci pour toute l'aide scientifique et humaine, qu'il m'a apportée durant ces 3 ans, pour ses conseils, sa disponibilité et pour tout ce qu'il m'a appris. Je le remercie également pour son appui dans ma démarche en vue d'intégrer le cursus médical.

Je tiens à remercier le Docteur Patrick Lacolley, qui m'a accueilli dans son laboratoire depuis mon stage de M1. Je le remercie pour son soutien, c'est en grande partie grâce à lui que j'ai pu réussir à intégrer le cursus médical en parallèle de mon travail de thèse.

Je remercie également le Docteur Rosine Nzietchueng, qui malgré la distance m'a beaucoup épaulée, conseillée et rassurée durant ces derniers mois. Sans son aide, je n'aurais pas réussi à bien cerner et intégrer la problématique Klotho !

Je remercie le Docteur Florence Pinet et le Professeur Daniel Hayoz de l'honneur qu'ils me témoignent en acceptant d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Ils prennent une partie de leur temps pour évaluer ce travail et je leur en suis reconnaissante.

Je suis également très honorée que le Professeur Pascal Bousquet ait accepté d'être examinateur de cette thèse. Je l'en remercie tout particulièrement.

Je remercie chaleureusement le Professeur Bruno Fève, pour toute son aide scientifique sur notre travail, pour sa disponibilité, ses nombreuses visites à Nancy, et sa bonne humeur !

Je remercie le Docteur Ketsia Hess, pour avoir été mon tuteur, et m'avoir donné mes premières heures d'enseignement. Merci de m'avoir montré les joies et les difficultés de l'enseignement, de m'avoir fait voir les nombreuses facettes du métier d'enseignant-chercheur. Merci pour votre temps, votre soutien et vos conseils.

Je remercie le Docteur Natalia De Isla, pour m'avoir épaulée durant mon poste de monitorat, et pour m'avoir ré-appris un peu de biochimie…

Je remercie Carlos Labat, pour m'avoir convaincue de faire mon master avec lui, de formée à l'échotracking. Merci pour toute son aide statistique, pour m'avoir communiqué

l’idée de la « bonne recherche », et pour m’avoir fait découvrir tout ce qu’on pouvait faire avec un simple tableur.

Je remercie Ginny Simon, pour toute l’aide qu’elle m’apportée en expérimentation animale. Merci pour ta compagnie, nos fous-rires en salle d’expérimentation, et surtout pour les adjectifs et les petits noms de nos sujets d’expérimentation. Tout ca va me manquer !

Je remercie le Professeur Simon Thornton, pour son esprit de contradiction, pour ses conseils, son sens critique, et son soutien en toute occasion. Merci pour nos conversations scientifiques, et non scientifiques aussi. C’est avec grand plaisir que j’ai travaillé avec vous, et sachez qu’il n’y aura pas de problèmes pour garder vos chats pendant les vacances des années à venir !

Je remercie Mary Osborne-Pellegrin, pour ses nombreux conseils, sa logique et sa rapidité de relecture, qui m’a été très précieuse.

Je remercie le Docteur N’guyen Tran, pour nous avoir aidé dans l’expérimentation animale, et avoir accepté de prendre de son temps pour m’aider à manipuler des animaux fragiles.

Je remercie le Docteur Jean-Pierre Max, « Super-Jean-Pierre », pour son sens pratique aiguisé, pour ses dépannages inestimables, et son aide technique qui m’a été d’un grand secours.

Je remercie le Docteur Huguette Louis, pour tous les conseils scientifiques, pour son aide en cas de coup dur, pour m’avoir attendu certains soirs de galère… pour nos pauses régulières aussi, qui ont toujours été un moment agréable de ma journée !

Je remercie le Docteur Natalia Lopez-Andres, pour nos séances de Body Pump, nos longues conversations, nos sorties (surtout avec beaucoup de nourriture !)… Merci d’avoir été mon amie !

Merci à tous les membres du laboratoire U961. Merci pour tous les moments passés avec vous. Vous avez contribué, de près ou de loin, au bon déroulement de cette thèse, que ce soit dans le travail ou dans les moments de détente.

Je remercie également mes amis Véro, Céline et Jérémie, Caro et Vincent, Mélanie, Totof, Emy, Mathieu, Jessica et Emilie… et tous les autres !

A mes parents,
Liliane et André

Pour votre amour et votre soutien permanent.
Pour m'avoir permis d'atteindre mes objectifs.

A Frédéric,
Pour son amour inestimable.

A toute ma famille.
A tous mes amis.

Je dédie ce travail de thèse

RESUME

Les conséquences cardiovasculaires du vieillissement sont l'une des principales causes de mortalité dans les pays occidentaux. Si l'âge chronologique contribue à l'aggravation des symptômes du vieillissement, plusieurs autres facteurs peuvent influencer l'apparition, plus ou moins précoce, des modifications liées au vieillissement. Ainsi, l'étude des déterminants génétiques et environnementaux accélérateurs du vieillissement cardiovasculaire pourrait améliorer la prévention et les traitements de ces pathologies.
Nous avons démontré chez le rat Zucker (modèle de syndrome métabolique) en fin de vie (80 semaines) que l'obésité et les troubles métaboliques associés et le vieillissement agissent de façon synergique pour modifier la structure et la fonction vasculaire *in vivo* et *in vitro*, en ciblant les propriétés endothéliales. L'augmentation précoce des acides gras libres (AGL) plasmatiques, suivie par la production d'espèces radicalaires de l'oxygène et l'activation de la voie de NFκB (pro-inflammatoire), ainsi que les altérations de réactivité carotidienne induites par les AGL, sont quelques-uns des mécanismes clés du développement de la rigidité artérielle dans ce modèle.
Il a été décrit en 1997 une souris déficiente pour le gène Klotho, avec une faible espérance de vie, un vieillissement accéléré et des pathologies semblables à celles de l'homme âgé : athérosclérose, ostéopénie, calcifications ectopiques et emphysème pulmonaire. Nous avons caractérisé le phénotype artériel (peu connu) des souris Kl+/- à 6 et 12 mois, en comparaison de leurs contrôles Kl+/+ aux mêmes âges. Nous avons démontré dans ce modèle que dans des conditions basales, les souris Kl+/- ne présentent pas de phénotype en faveur d'un vieillissement accéléré de la paroi artérielle à l'âge de 12 mois. Néanmoins, à l'âge de 6 mois, les souris Kl+/- présentent une augmentation de leur pression artérielle consciente et de leur rigidité carotidienne, qui sont en faveur d'une altération de la fonction vasculaire. L'étude de ces deux modèles nous a ainsi permis d'évaluer l'implication de l'obésité et de la protéine Klotho dans le vieillissement artériel.

Mots clés : rigidité artérielle, vieillissement, obésité, réactivité vasculaire, stress oxydant

ABSTRACT

The cardiovascular consequences of aging are a major cause of death in Western countries. If chronological age contributes to the worsening of symptoms of aging, several factors can influence the appearance, more or less early changes associated with aging. Thus, the study of genetic and environmental determinants of cardiovascular aging accelerators could improve prevention and treatment of these pathologies.
We have demonstrated Zucker rats (a model of the metabolic syndrome) at end of life (80 weeks) that obesity and associated metabolic disorders act synergistically with aging to alter the structure and vascular function *in vivo* and *in vitro* by targeting endothelial properties. The early increase in plasma free fatty acids (FFA), followed by production of radical oxygen species and the activation of the NFκB pathway (proinflammatory) and alterations in carotid responsiveness induced by AGL, are some of the key mechanisms of development of arterial stiffness in this model.
In 1997 a mouse was described deficient for the gene Klotho, with low life expectancy, accelerated aging and disease similar to an old man: atherosclerosis, osteopenia, pulmonary emphysema and ectopic calcifications. We characterized the arterial phenotype (unknown) in mice Kl+/- at 6 and 12 months, compared to their controls K +/+ at the same age. We have demonstrated in this model that in basal conditions, Kl +/- mice shows no phenotype for an accelerated aging of the arterial wall at the age of 12 months. However, at the age of 6 months, Kl +/- mice show an increase in blood pressure and conscious of their carotid stiffness, in favor of an alteration of vascular function. The study of these two models has allowed us to assess the implication of obesity and Klotho protein in aging arteries.

Key words : arterial stiffness, aging, obesity, vascular reactivity, oxidative stress

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE ____ *13*

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ____ *16*

I Rigidité pariétale artérielle : déterminants et conséquences ____ *17*

I.1 Contexte clinique ____ **17**

I.2 Elasticité et rigidité pariétale des gros troncs artériels ____ **18**

I.2.1 Définitions ____ 18

I.2.2 Fonction d'amortissement aortique ____ 21

I.2.3 Pression pulsée ____ 23

I.2.4 Onde de pouls et amplification de la pression pulsée ____ 25

I.3 Déterminants de l'élasticité des parois artérielles ____ **27**

I.3.1 Impact du tonus musculaire sur l'élasticité et la rigidité pariétales aortiques ____ 27

I.3.2 Impact de la contrainte pariétale sur l'élasticité des gros troncs artériels ____ 28

I.3.2.1 Effet de la pression intraluminale ____ 29

I.3.2.2 Effet de la géométrie de la paroi aortique ____ 29

I.3.3 Impact de la composition pariétale sur l'élasticité des gros troncs artériels ____ 30

I.3.3.1 Description de la composition pariétale artérielle ____ 30

I.3.3.2 Rôle de la média dans les propriétés élastiques de la paroi ____ 31

I.4 Modifications des gros troncs artériels au cours du vieillissement ____ **34**

I.4.1 Fatigue du cumul des chocs et remodelage pariétal ____ 34

I.4.2 Modifications structurales ____ 35

I.4.3 Modifications fonctionnelles ____ 36

II Facteurs environnementaux de la rigidité : le rôle du syndrome métabolique ____ *39*

II.1 Définition du syndrome métabolique ____ **39**

II.2 Modèles animaux de syndrome métabolique ____ **41**

II.2.1 La leptine ____ 41

II.2.2 Le récepteur de la leptine ____ 42

II.2.3 Mécanisme d'action ____ 43

II.2.4 Modèles animaux de syndrome métabolique ____ 44

II.2.4.1 Le rat Zucker ____ 46

II.2.4.2 Effets de l'insulino-résistance chez le rat Zucker ____ 47

II.2.5 Implication des acides gras libres dans le syndome métabolique et la fonction vasculaire ____ 49

II.2.5.1 Définition des acides gras ____ 49

II.2.5.2 Effets des acides gras sur les gros troncs artériels ____ 50

III Facteurs génétiques : l'exemple de la mutation de Klotho ____ *52*

III.1 Introduction ____ **52**

III.2 Polymorphisme de Klotho chez l'homme ____ **52**

III.3 La protéine Klotho ____ **53**

III.4 Compréhension actuelle des mécanismes d'action de Klotho ____ **54**

III.4.1 Klotho agit comme une hormone circulante ____ 54

III.4.2 Klotho régule les voie de l'insuline et de l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ____ 55

III.4.3 Klotho agit comme un cofacteur essentiel de FGF23 ____ 57

III.4.4 Klotho agit comme une β-glucuronidase, et active les canaux TRPV5 ____ 58

III.4.5 Klotho est une hormone « anti-vieillissement » ____ 59

III.5 Implication du stress oxydant ____ **60**

III.5.1 Définition ____ 60

III.5.2 Systèmes de défense contre les radicaux libres ____ 62

III.6 Phénotypes de la souris déficiente pour Klotho 62

HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL 66

MATERIEL ET METHODES 68

I Etude sur les rats Zucker 69

I.1 Animaux 69

I.2 Mesure de la pression artérielle chez l'animal éveillé 69

I.3 Fonction vasculaire 71

I.3.1 Evaluation de la rigidité artérielle in vivo 71

I.3.1.1 Préparation de l'animal 71

I.3.1.2 Etude des propriétés mécaniques artérielles : echotracking de l'artère carotide 71

I.3.1.3 Rigidité aortique : vitesse de l'onde de pouls (VOP) 73

I.3.2 Prélèvements tissulaires 74

I.3.3 Réactivité vasculaire 74

I.3.4 Prélèvements sanguins et tests biochimiques 75

I.3.5 Mesure des NEFA 75

I.3.6 Mesure des adipokines par ELISA 76

I.3.7 Structure artérielle 77

I.3.7.1 Histomorphométrie carotidienne 77

I.3.7.2 Méthode de Weigert 77

I.3.7.3 Quantification biochimique de l'élastine insoluble et du collagène 78

I.3.8 Western Blot 78

I.3.9 Analyse statistique 79

II Etude sur les souris Klotho 79

II.1 Animaux 79

II.1.1 Obtention des souris transgéniques Klotho 79

II.1.2 Animaux inclus dans l'étude 79

II.2 Mesure de la pression artérielle chez l'animal éveillé 80

II.3 Evaluation de la rigidité artérielle *in vivo* 80

II.3.1 Préparation de l'animal 80

II.3.2 Mesure de la VOP 80

II.4 Prélèvements tissulaires 81

II.5 Histomorphométrie carotidienne 81

II.6 Marqueurs du stress oxydant 81

II.6.1 Dosage du glutathion 81

II.6.2 Dosage des TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) 83

II.6.3 Dosage de la superoxide dismutase 83

II.7 Génotypage 84

II.7.1 Extraction d'ADN 84

II.7.2 Amplification du gène Klotho par PCR 84

II.7.3 Visualisation 85

RESULTATS 86

I Etude sur les rats Zucker 87

I.1 Paramètres morphologiques, hémodynamiques et métaboliques 87

I.2 Caractéristiques vasculaires fonctionnelles *in vivo* 89

I.3 Structure artérielle 92

***I.4* Réactivité vasculaire *in vitro* 95**

I.5 Altérations de voies de signalisation clés dans la paroi artérielle 98

I.6 La production d'ERO est corrélée à la déficience vasculaire chez les OZR âgés de 80 semaines **99**

I.7 Effets des AGL sur la dysfonction vasculaire chez les OZR âgés de 80 semaines **101**

II Etude sur les souris Klotho ***103***

II.1 Caractéristiques morphologiques **103**

II.2 Paramètres hémodynamiques chez l'animal éveillé **105**

II.3 Rigidité artérielle **106**

II.4 Géométrie carotidienne **110**

II.5 Stress oxydatif **112**

DISCUSSION ***113***

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES ***123***

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ***127***

ANNEXE 1 ***143***

Article soumis ***143***

INDEX DES FIGURES

Figure 1. *Représentation schématique de la relation contrainte-déformation d'un corps purement élastique et d'un corps visco-élastique* *18*
Figure 2. *Contraintes imposées à la paroi aortique.* *19*
Figure 3. *Effet "Windkessel" chez une personne jeune.* *22*
Figure 4. *Effet "Windkessel" chez une personne âgée.* *23*
Figure 5. *Onde de pression artérielle* *24*
Figure 6. *Evolution du contour de l'onde de pression le long de l'aorte chez l'homme.* *26*
Figure 7. *Organisation de la média aortique en faisceau musculo-élastiques* *31*
Figure 8. *Schéma résumant les différentes modifications qualitatives de la matrice extracellulaire de la média artérielle et leur conséquences, en terme de rigidité, de la paroi artérielle.* *38*
Figure 9. *Présentation des différentes isoformes du récepteur de la leptine* *43*
Figure 10. *Schéma du mécanisme d'action de la leptine.* *44*
Figure 11. *Schéma des voies de signalisation impliquées dans la lipotoxicité, entraînant la dysfonction endothéliale* *51*
Figure 12. *Rôle de Klotho dans les voies de signalisation de l'IGF et de l'insuline.* *56*
Figure 13. *Interaction entre FGF23 et son récepteur.* *58*
Figure 14. *Schéma récapitulatif des mécanismes connus de Klotho* *60*
Figure 15. *Schéma de formation et catabolisme des radicaux libres* *61*
Figure 16. *Vasodilatation endothélium-dépendante en réponse à l'acétylcholine chez la souris Klotho.* *64*
Figure 17. *Vasodilatation endothélium-dépendante et métabolites du NO chez les rats OLETF.* *65*
Figure 18. *Schéma de la technique « tail-cuff » de mesure de pression artérielle chez les souris éveillées, à partir de l'artère caudale.* *70*
Figure 19. *Schéma d'obtention des courbes Pression-Diamètre carotidien par la technique d'echotracking chez la souris.* *72*
Figure 20. *Exemple de courbes de pression au niveau de l'aorte thoracique et de l'aorte abdominale enregistrées chez un rat Zucker obèse afin de mesurer la VOP* *74*
Figure 21. *Réactions chimiques utilisées dans le kit commercial de dosage colorimétrique des acides gras non estérifiés.* *76*
Figure 22. *Réactions chimiques utilisées dans le kit commercial pour le dosage du glutathion réduit (GSH).* *82*
Figure 23. *Réaction chimique utilisée dans le kit commercial de dosage de péroxydation lipidique.* *83*
Figure 24. *Réactions chimiques utilisées dans le kit commercial de dosage de l'activité superoxyde dismutase.* *84*
Figure 25. *Propriétés mécaniques des artères carotides chez les LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines.* *91*
Figure 26. *Composition de la média aortique chez les LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines.* *94*
Figure 27. *Réactivité vasculaire dans les artères carotides des LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines.* *97*
Figure 28. *Activation de plusieurs kinases dans les aortes des LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines.* *98*
Figure 29. *Stress oxydatif et état inflammatoire chez les LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines.* *100*
Figure 30. *Effets des acides gras libres (AGL) sur la réactivité vasculaire dans des carotides de LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines.* *102*
Figure 31. *Hémodynamique chez l'animal éveillé.* *105*
Figure 32. *Propriétés mécaniques des artères carotides chez les Kl+/+ et Kl+/- âgés de 6 et 12 mois.* *107*
Figure 33. *Etat oxydatif des souris Kl+/+ et Kl+/- âgés de 6 et 12 mois.* *112*

LISTE DES ABBREVIATIONS

1,25(OH)2D3	calcitriol (1,25 dihydroxyvitamine-D3)
ADAM10 / ADAM17	A Disintegrin And Metalloprotease domain-10 et -17
AdipoR1 et AdipoR2	récepteurs à l'adiponectine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGEs	Advanced glycation end products
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein
ANOVA	Analyse de variance
bpm	Battements par minute
CE	Cellule endothéliale
CMLv	Cellule musculaire lisse vasculaire
CP	Contrainte pariétale
CRP	C-reactive protein, protéine C-réactive
Di	Diamètre interne
Dl	Distance entre les deux sites de mesure de la VOP
ΔP	Variation de pression intraluminale
Δt	Délai de transmission de l'onde de pouls entre les deux sites de mesure
ΔV	Variation de volume
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGFR	epidemial growth factor receptor
Einc	Module élastique incrémentiel
eNOS	NO-synthase endothéliale
EROs	espèces réactives de l'oxygène
FC	Fréquence cardiaque
FGF23	fibroblast growth factor 23
FGFR	récepteur du FGF
FOXOs	forkhead box O
GPx	glutathion peroxydase
GS.	radical thyil
GSH	glutathion réduit
GSSH	glutathion oxydé
GTA	Gros tronc artériel
h	Epaisseur médiale
H2O2	peroxyde d'hydrogène
HDL	High Density Lipoprotein
HVG	Hypertrophie ventriculaire gauche
IDF	International Diabetes Federation
IGF-1	Insulin growth factor-1
IGF-1R	Récepteur à l'IGF-1
IL-x	Interleukine X
IR	récepteur à l'insuline
IRS-1	insulin receptor substrat -1
JCR :LA-cp	James C Russell corpulent rat
KL	klotho
KL-VS	variant fonctionnel du gène Klotho humain
KO	knock-out
LCSA	Lumen Cross-Sectionnal Area
LETO	Long Evans Tokushima Otsuka rat
L-NMMA	L-N^G-monométhyl arginine

LZR	Lean Zucker Rat
MAPK	Mitogen associated protein kinase
MCSA	Medial cross-sectionnal area, surface médiale de coupe trans-sectionnelle
ME	Module élastique
ME/CP	Rapport module élastique/contrainte pariétale
MEC	Matrice extra-cellulaire
MEinc	Module élastique incrémental
MGP	Matrix gla protein : protéine matricielle à base de γ-carboxylglutamate
MHC	Chaîne lourde de la myosine
MMP	Métalloprotéinases matricielles
MMP7	Métalloprotéinase matricielle 7
MnSOD ou SOD2	manganèse superoxyde dismutase
NADPH oxidase	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NCEP ATP III	National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III
NFkB	nuclear factor κB
NO	Monoxyde d'azote
NO2- et NO3	métabolites du monoxyde d'azote
OLETF	rat Otsuka Long Evans Tokushima Fatty
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONOO-	anion peroxynitrite
OZR	Obese Zucker Rat
PAD	Pression artérielle diastolique
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PAM	Pression artérielle moyenne
PAS	Pression Artérielle Systolique
PBS	Phosphate buffered saline : solution saline tamponnée à pH7,4
PCR	Polymerase chain reaction : réaction en chaîne par polymérase
PDGFR	récepteur au PDGF
PI3K	phosphoinositol 3 kinase
PKB/Akt	phosphokinase B / Akt
PP	Pression pulsée
RAGEs	Récepteur pour les AGEs
SHHF	spontaneously hypertensive, heart failure rat
SHR	Spontaneously Hypertensive Rat, rat spontanément hypertendu
SHROB	spontaneous hypertensive obese rat
TGFb	Tumor growth factor b
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
TRPV5	transient receptor potential vanilloid 5
V0	Volume artériel initial (diastolique)
VDN	Rats traités par la vitamine D3 et la nicotine
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VOP	Vitesse de transmission de l'onde de pouls
WHO	World Health Organization
Wnt	Wingless integration site
WS	Contrainte circonférentielle
ZDF	Zucker diabetic fatty rat

INTRODUCTION GENERALE

Les conséquences cardiovasculaires du vieillissement sont l'une des principales causes de mortalité dans les pays occidentaux. Au niveau des grosses artères élastiques, notamment l'aorte et les artères carotides, ce phénomène de vieillissement se caractérise par une sclérose progressive de la paroi artérielle, ou artériosclérose, accompagnée d'une augmentation de la rigidité de la paroi du vaisseau et d'une perte de ses propriétés de compliance.

Safar (1989) a décrit cette augmentation de la rigidité pariétale des grosses artères élastiques avec l'âge et l'a désigné comme "maladie des vaisseaux rigides" ("*stiff vessel disease*"). L'étude de la cohorte de Framingham a permis d'estimer sa prévalence à plus de 30% chez les personnes âgées de plus de 75 ans (Kannel et coll., 1980).

Si l'âge chronologique contribue à l'aggravation des symptômes du vieillissement, plusieurs autres facteurs peuvent influencer l'apparition, plus ou moins précoce, des modifications liées au vieillissement. Ainsi, l'étude des déterminants génétiques et environnementaux accélérateurs du vieillissement, notamment au plan cardiovasculaire, pourrait améliorer la prévention et les traitements des pathologies cardiovasculaires.

Un des facteurs environnementaux connus pour avoir des effets délétères sur les gros troncs artériels est l'obésité. En effet, il a été démontré que les patients obèses sont hypertendus et présentent une dysfonction endothéliale (Steinberg et coll., 1996) De plus, il a été montré qu'il existe une plus grande proportion de personnes obèses chez les personnes de plus de 65 ans par rapport à la population générale (17.9 % *vs* 14.5% respectivement) (Charles MA, 2008). Ainsi, l'étude des interactions entre obésité et troubles métaboliques associés et le vieillissement permettrait une meilleure compréhension des mécanismes impliqués.

De nombreux facteurs génétiques peuvent influencer directement ou non le vieillissement cardiovasculaire, comme par exemple le polymorphisme du récepteur AT1 de l'angiotensine II (Benetos et coll., 1996; Benetos et Safar, 1996), ou encore le polymorphisme des récepteurs de l'endothéline (Lajemi et coll., 2001), sans que le mécanisme sous-jacent n'est été établi. Il a été montré récemment que le polymorphisme du gène Klotho pouvait être associé à la pathologie athérosclérotique (Arking et coll., 2002). Ainsi, l'étude du gène Klotho dans un modèle animal pourrait apporter des réponses sur le rôle de cette protéine dans l'apparition de pathologies cardio-vasculaires.

La première partie de ce travail présente l'état des lieux actuel des données bibliographiques concernant la rigidité pariétale, ses déterminants, ses manifestations

cliniques et ses conséquences sur les organes cibles. Les différents modèles animaux disponibles pour leur étude expérimentale et développés dans notre laboratoire y sont également détaillés, afin de justifier leur intérêt et leur valeur pour la compréhension des mécanismes de vieillissement artériel.

Dans une seconde partie serons présentés les études expérimentales réalisées au cours de cette thèse.

Une première étude visait à évaluer l'impact de l'obésité, associée au vieillissement, sur la rigidité pariétale aortique dans le modèle du rat Zucker obèse. En effet, des travaux de la littérature montrent que l'obésité est un facteur de risque cardiovasculaire. Notre hypothèse de travail était que l'obésité, au cours du processus de vieillissement, pourrait avoir des effets délétères sur la rigidité pariétale aortique.

Une seconde étude avait pour objet d'analyser le phénotype de la souris Klotho-déficiente qui est actuellement très peu étudié au-delà de l'âge de huit semaines. L'état artériel des souris hétérozygotes a été caractérisé *in vivo* à six et douze mois, en parallèle avec les changements du stress oxydant. Cela permet d'évaluer dans quelle mesure l'absence de la protéine Klotho peut entraîner des modifications de structure et/ou de fonction des grosses artères élastiques.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I Rigidité pariétale artérielle : déterminants et conséquences

I.1 Contexte clinique

Le développement de la rigidité des gros troncs artériels, manifestation principale du vieillissement artériel, est considéré comme un facteur de risque indépendant de morbidité et de mortalité (Laurent et coll., 2001a; Safar et coll., 2003).

Si l'âge chronologique est un déterminant majeur de l'aggravation de la rigidité artérielle, plusieurs autres facteurs peuvent influencer l'apparition plus ou moins précoce des modifications liées au vieillissement. Des études ont montré que les sujets diabétiques (Cruickshank et coll., 2002 ; Henry et coll., 2003) et ceux porteurs d'un syndrome métabolique (Safar et coll., 2006) présentent une rigidité accrue de l'aorte et des autres gros troncs artériels. Par contre, les effets de la dyslipidémie et du tabagisme sur la rigidité artérielle ne sont pas unanimement reconnus et ne semblent pas être d'une importance majeure (contrairement à leurs actions majeures sur l'athérome et ses complications). L'hypertension systolo-diastolique a toujours été considérée comme un accélérateur du vieillissement artériel (Safar et Benetos, 2003; Safar et coll., 2003). Dans une étude longitudinale récente, Benetos et coll ont démontré que l'évolution de la rigidité artérielle avec l'âge était deux fois plus importante chez des sujets hypertendus que chez des sujets normotendus (Benetos et coll., 2002). Ces résultats démontrent qu'à long terme, l'hypertension systolo-diastolique est un accélérateur du vieillissement artériel et de l'aggravation de la rigidité des gros troncs artériels.

Les facteurs génétiques peuvent influencer le vieillissement artériel à différents niveaux : par l'augmentation de la pression artérielle ou par une prédisposition à développer des troubles métaboliques et hémodynamiques conduisant à des altérations artérielles. Ils peuvent aussi rendre la paroi artérielle plus vulnérable aux effets de l'âge et des autres facteurs de risque.

De plus, plusieurs études cliniques récentes ont montré la présence d'une rigidité pariétale aortique dans diverses pathologies inflammatoires chroniques telles que le lupus érythémateux (Selzer et coll., 2001), la polyarthrite rhumatoïde (Wong et coll., 2003) ou la vascularite systémique (Booth et coll., 2004).

Ainsi, il apparaît parfois difficile, comme par exemple chez une personne âgée présentant plusieurs de ces pathologies, de connaître la part de responsabilité du

vieillissement dans le développement de la rigidité pariétale aortique. Néanmoins, au cours de ce travail de thèse, l'intérêt s'est principalement porté sur les modifications de l'élasticité pariétale liées à certaines caractéristiques du remodelage dégénératif, présentes chez l'homme au cours du vieillissement.

I.2 Elasticité et rigidité pariétale des gros troncs artériels

I.2.1 Définitions

L'élasticité est la propriété physique que possède un corps de se déformer sous l'effet d'une force ou contrainte, puis de reprendre sa forme initiale lorsque la force cesse de s'exercer. La déformation d'un corps purement élastique est instantanée et proportionnelle à la contrainte (loi de Hooke).

Cependant, la paroi artérielle ayant une composition hétérogène, elle n'est pas purement élastique mais visco-élastique. Un facteur temps supplémentaire entre alors également en compte : la déformation consécutive à une contrainte n'est pas instantanée, de même que le retour à l'état initial (Nichols et O'Rourke, 1998). Ainsi, les propriétés d'élasticité d'un corps peuvent être étudiées grâce à des courbes contrainte/déformation. Dans le cas des gros troncs artériels, la contrainte sera en partie la pression intraluminale tandis que la déformation sera évaluée par les variations du diamètre artériel (Figure 1).

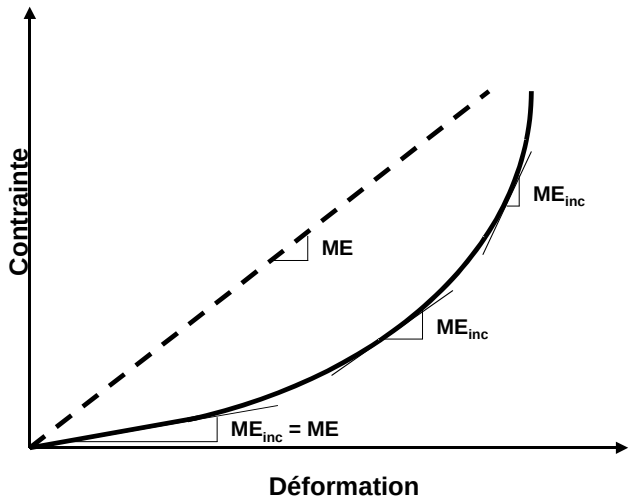


Figure 1. Représentation schématique de la relation contrainte-déformation d'un corps purement élastique (pointillés) et d'un corps visco-élastique (trait continu**)**
comme la paroi aortique, ainsi que du module élastique incrémental (ME_{inc}), tangente en chaque point de la relation contrainte-déformation. A un niveau de contrainte faible, cette

relation est pratiquement linéaire et le module élastique incrémental est égal au module élastique de Young (ME), constante caractéristique d'un matériau (d'après Dobrin, 1978).

La déformation de la paroi artérielle résulte de l'application d'une contrainte qui est définie comme la force imposée par unité de surface, ou contrainte pariétale. La paroi artérielle supporte des contraintes s'exerçant dans trois orientations : la pressurisation comprime la paroi de l'artère et l'amincit (contrainte radiale), mais exerce également une traction qui distend l'artère (contraintes longitudinale et circonférentielle) (Dobrin, 1978) (Figure 2).

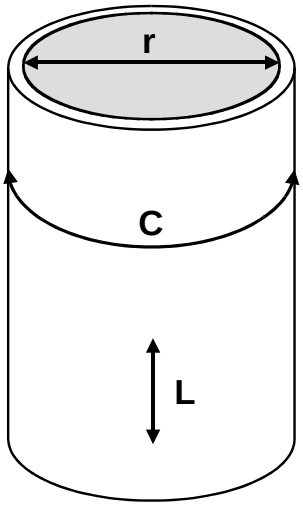


Figure 2. Contraintes radiale (r), circonférentielle (C) et longitudinale (L) imposées à la paroi aortique (d'après Dobrin, 1978).

Néanmoins, *in vivo*, la variation de longueur des artères au cours d'un cycle cardiaque n'est que de 1 à 3% (Milnor, 1989). La contrainte longitudinale est donc de faible importance.

La paroi des grosses artères élastiques étant mince, il en résulte qu'à un niveau de pression donnée, la contrainte radiale ne représente que 5% de la contrainte circonférentielle (Milnor, 1989). Ainsi, les contraintes prédominantes appliquées à la paroi des grosses artères élastiques et les déformations qui en résultent se font essentiellement dans la direction circonférentielle, par des variations de diamètre artériel. Les contraintes longitudinales et radiales étant négligeables par rapport aux contraintes circonférentielles, il en découle que la contrainte pariétale peut être évaluée expérimentalement par la mesure des variations de diamètre interne.

Le rapport contrainte appliquée (pression) sur déformation (étirement pariétal) qui en découle permet de définir un indice d'élasticité, le module élastique de Young (ME) (Bergel, 1961). Il s'agit en fait de la pression nécessaire pour étirer la paroi de 100%, ce concept restant très théorique, puisque l'artère se déchirera bien avant de parvenir à de telles valeurs d'étirement.

Le module élastique représente néanmoins une constante caractéristique d'un matériel : plus la valeur de ce module élastique est élevée, plus le matériel est rigide. Or, la paroi artérielle étant visco-élastique, la relation contrainte-déformation n'est pas linéaire. Il est alors définit un module élastique incrémentiel (ME_{inc}) qui correspond à la tangente en chaque point de la relation contrainte-déformation (Figure 1, p.14). A un niveau de contrainte faible, cette relation est pratiquement linéaire et le module élastique incrémentiel est égal au module élastique de Young.

La distensibilité de la paroi aortique est la capacité de déformation de la paroi vasculaire, indépendamment de l'état du volume aortique, sous l'effet d'une contrainte donnée. Elle est mesurée par le rapport $\Delta V / V_{0.} \Delta P$, en %.mm Hg^{-1}, où V_0 représente le volume artériel initial (diastolique) et ΔV la déformation (c'est-à-dire la variation du diamètre interne suite à une variation du volume aortique) induite par une contrainte (c'est-à-dire une variation de la pression intraluminale, ΔP) (Milnor, 1989; 1990).

La compliance artérielle représente la distensibilité volumique de l'aorte, c'est-à-dire la capacité d'augmentation du volume artériel ΔV par unité d'augmentation de pression ΔP, soit le rapport d'une variation absolue de volume pour une variation de pression intraluminale imposée : $C = \Delta V / \Delta P$ en mL.mm Hg^{-1}.

La distensibilité de la paroi artérielle dépend essentiellement des propriétés élastiques de la paroi, alors que la compliance artérielle est déterminée à la fois par l'élasticité de la paroi et par le volume de l’artère. Ainsi, si la distensibilité artérielle diminue mais qu’elle est associée à une dilatation, la valeur de la compliance artérielle restera constante (Milnor, 1989; 1990).

La compliance est l'un des facteurs responsables de la forme et de l'amplitude de l'onde de pression artérielle (Nichols et O'Rourke, 1998) (Tableau 1) et constitue la composante capacitive de la post-charge cardiaque (Westerhof et coll., 1971).

Tableau 1. Récapitulatif des définitions des propriétés élastiques artérielles (d'après Milnor, 1989).

Paramètres	Définitions
Elasticité	Capacité d'un corps de se déformer sous l'effet d'une force puis de reprendre sa forme initiale instantanément
Visco-élasticité	Capacité d'un corps de se déformer sous l'effet d'une force puis de reprendre sa forme initiale mais non instantanément
Module élastique	Rapport de la contrainte divisée par la déformation qui en résulte, indice d'élasticité
Distensibilité	Variation relative de volume par variation de pression
Compliance	Variation absolue de volume par variation de pression

Lorsque la paroi artérielle devient plus rigide (ou moins élastique), sa déformation sera moindre pour une contrainte donnée. Ceci résulte en une augmentation du module élastique, avec une perte des propriétés de distensibilité et de compliance.

I.2.2 Fonction d'amortissement aortique

Le sang est éjecté du cœur de façon pulsatile et présente à sa sortie du ventricule gauche d'importantes oscillations de pression et de débit. Les gros troncs artériels, ou artères élastiques (aorte, artères carotides, sous-clavières et iliaques communes) ont alors pour rôle de transformer progressivement cet écoulement pulsatile en un écoulement continu, stabilisé en débit et amorti en pression.

En effet, les gros troncs artériels reçoivent instantanément le volume total de sang éjecté du cœur : grâce à leurs propriétés élastiques, les parois aortiques s'écartent pendant la systole afin de permettre le passage d'environ la moitié du flux sanguin tandis que l'autre moitié est emmagasinée puis restituée pendant la diastole (Guyton, 1992; Berne et Levy, 2000; O'Rourke et Hashimoto, 2007) (Figure 3).

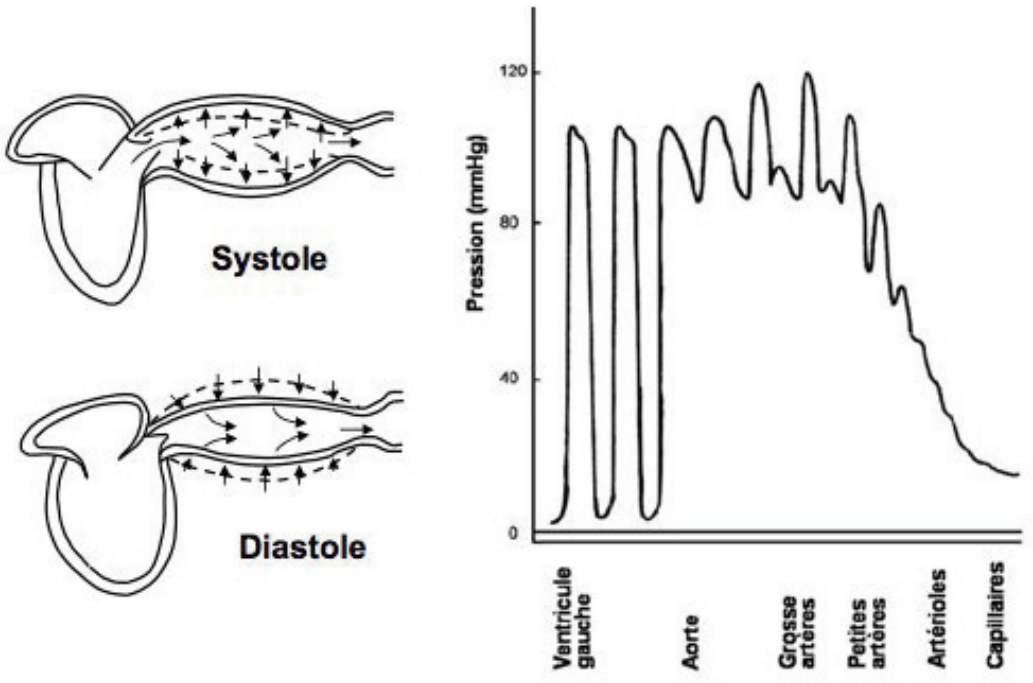


Figure 3. Effet "Windkessel" chez une personne jeune.
Lorsque l'aorte est compliante, ses parois s'écartent durant la systole pour emmagasiner une partie du flux sanguin, pour ensuite le propulser durant la diastole. Cet effet "Windkessel" résulte en un amortissement de la pulsatilité artérielle entre le ventricule gauche et l'aorte et en un débit plus continu (d'après O'Rourke et coll., 1997).

Avec le vieillissement, les gros troncs artériels perdent progressivement leurs propriétés élastiques et leurs parois se rigidifient. Cette perte de compliance des artères aura des conséquences d'une part en amont car l'augmentation de rigidité pariétale représente une augmentation de la post-charge pour le cœur lors de l'éjection systolique, pouvant conduire à un dysfonctionnement du couplage cœur-vaisseau. D'autre part, en aval, les fortes oscillations de pression et de débit (Figure 4) auront un effet néfaste sur la structure et la fonction des organes et sur la perfusion tissulaire (O'Rourke et Safar, 2005).

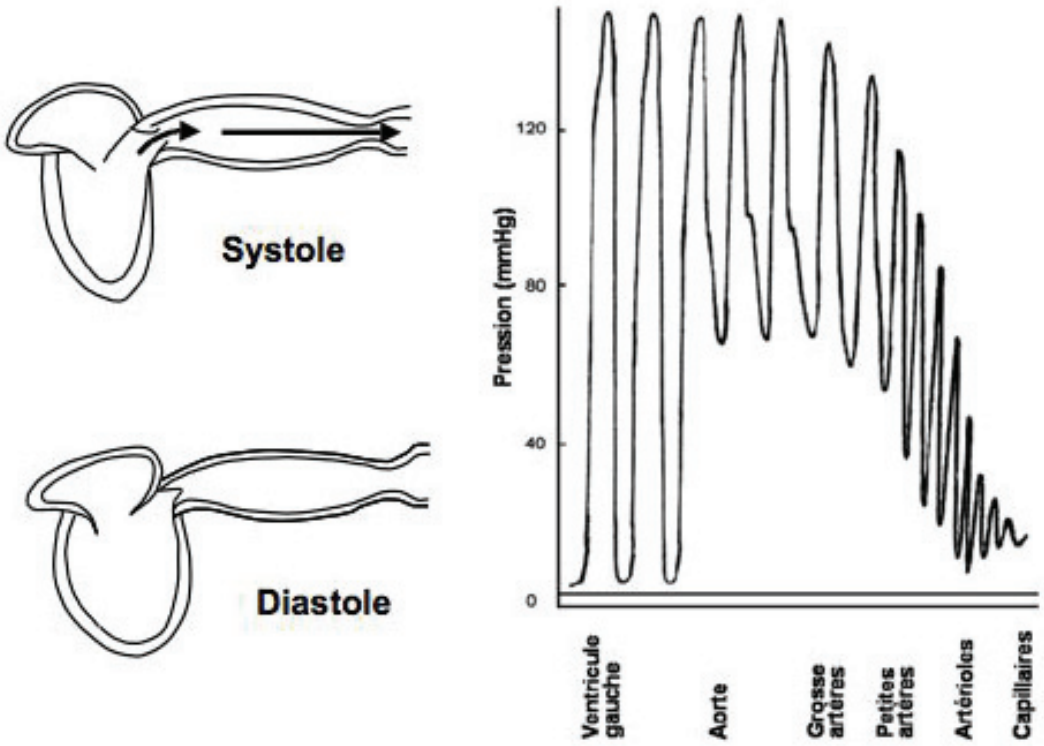


Figure 4. Effet "Windkessel" chez une personne âgée.
Quand la paroi aortique est rigide, l'ensemble du volume d'éjection systolique transite durant la systole et le flux cesse durant la diastole. Cette perte des propriétés de compliance de l'aorte au cours de la systole et de la diastole a pour conséquence un amortissement moindre de la pression pulsée dans les grosses artères et donc sont présentes au niveau de la microcirculation (d'après O'Rourke et coll., 2007).

I.2.3 Pression pulsée

La pression pulsée (PP) est définie comme la différence entre le pic de pression systolique et la pression diastolique : elle est donc le reflet des oscillations de la pression sanguine (Figure 5). Chez un individu sain, dont les parois artérielles sont élastiques et amortissent la PP, elle est de l'ordre de 30 à 45 mm Hg (O'Rourke et coll., 2002).

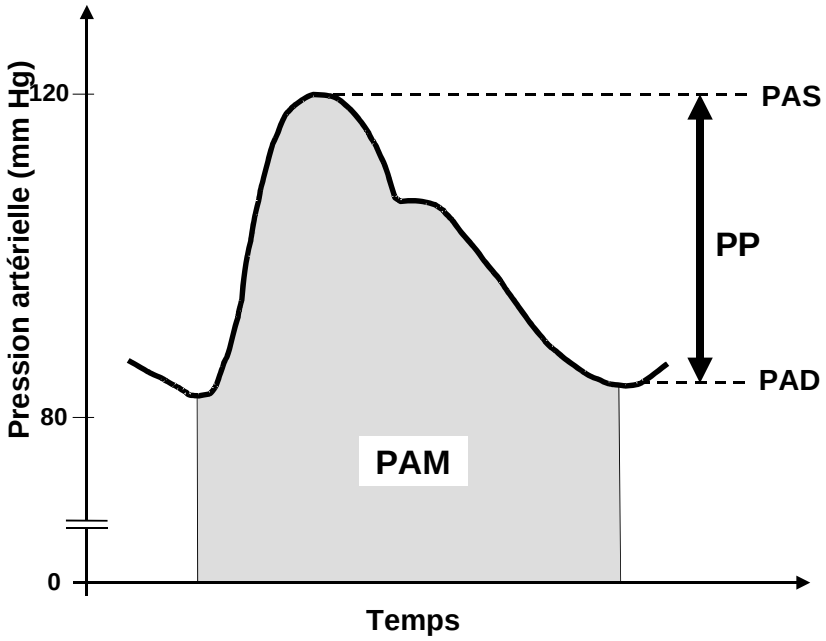


Figure 5. Onde de pression artérielle
(trait plein) avec la pression artérielle moyenne (évaluée par l'aire sous la courbe grisée, PAM). La pression pulsée (PP) est définie comme la différence entre la pression artérielle systolique (PAS) et la pression artérielle diastolique (PAD).

L'amplitude de la PP dépend d'une part du volume sanguin éjecté par le ventricule gauche en fin de systole. Plus le volume d'éjection systolique est important, plus grand est le volume de sang que doivent emmagasiner les gros troncs artériels à chaque battement cardiaque et plus forte est la montée de pression lors de la systole et la chute de pression lors de la diastole, donc plus grande est la PP.

D'autre part, l'amplitude de la PP dépend des caractéristiques de l'arbre artériel et des propriétés visco-élastiques de ses parois. Ainsi, plus la compliance du système artériel sera faible, plus la montée de pression sera forte pour un volume d'éjection systolique donné, et plus la PP sera importante. Lors de l'artériosclérose liée au vieillissement, une hyperpulsatilité de la pression artérielle sera donc observée par rapport à un individu jeune et l'augmentation de PP est ainsi directement associée à une augmentation de rigidité pariétale aortique (Franklin, 2004).

En conséquent, la PP est principalement déterminée par le volume d'éjection systolique et la compliance du système artériel. Ainsi, toute condition circulatoire changeant

l'un ou l'autre de ces deux facteurs changera aussi la PP. Chez l'homme, celle-ci n'est cependant pas identique à tous les niveaux. Il existe en effet une amplification de la PP entre l'aorte et la périphérie.

I.2.4 Onde de pouls et amplification de la pression pulsée

Initialement, lorsque le sang est éjecté dans l'aorte lors de la systole cardiaque, seule la portion proximale de l'aorte est distendue. En effet, l'inertie du sang l'empêche d'être propulsé tout de suite jusqu'en périphérie. Or la pression croissante dans l'aorte dépasse rapidement cette force d'inertie et la distension se propage comme une onde le long de l'aorte. Cette propagation de l'oscillation de pression dans les artères est également appelée transmission de l'onde de pouls ou onde de pression.

D'une façon générale, la propagation de cette onde est plus lente lorsque la compliance d'un segment artériel augmente. Chez un individu sain, la vitesse de l'onde de pouls (VOP) dans l'aorte est de l'ordre de 3 à 5 mètres par seconde (O'Rourke et coll., 2002). Cependant, il faut discerner la VOP de la vitesse de propagation du sang, qui est au moins quinze fois plus élevée dans l'aorte. (Berne et Levy, 2000)

Le signal de pression artérielle (onde de pouls) n'est pas uniforme tout au long de l'aorte. Ce signal résulte en chaque point de l'addition de l'onde de pression incidente émise par l'éjection ventriculaire et d'une onde de pression réfléchie sur les bifurcations artérielles (rénales, iliaques), sur les zones de transition entre les gros troncs artériels et les artères de résistance (Latham et coll., 1985; O'Rourke et coll., 2002) et sur les zones de changements de composition de la paroi. Ainsi, en fonction du site de mesure sur l'aorte, plus ou moins loin des sites de réflexion, l'onde de réflexion s'additionnera à des endroits différents sur le tracé du signal incident (Murgo et coll., 1980; Nichols et O'Rourke, 1998) (Figure 6).

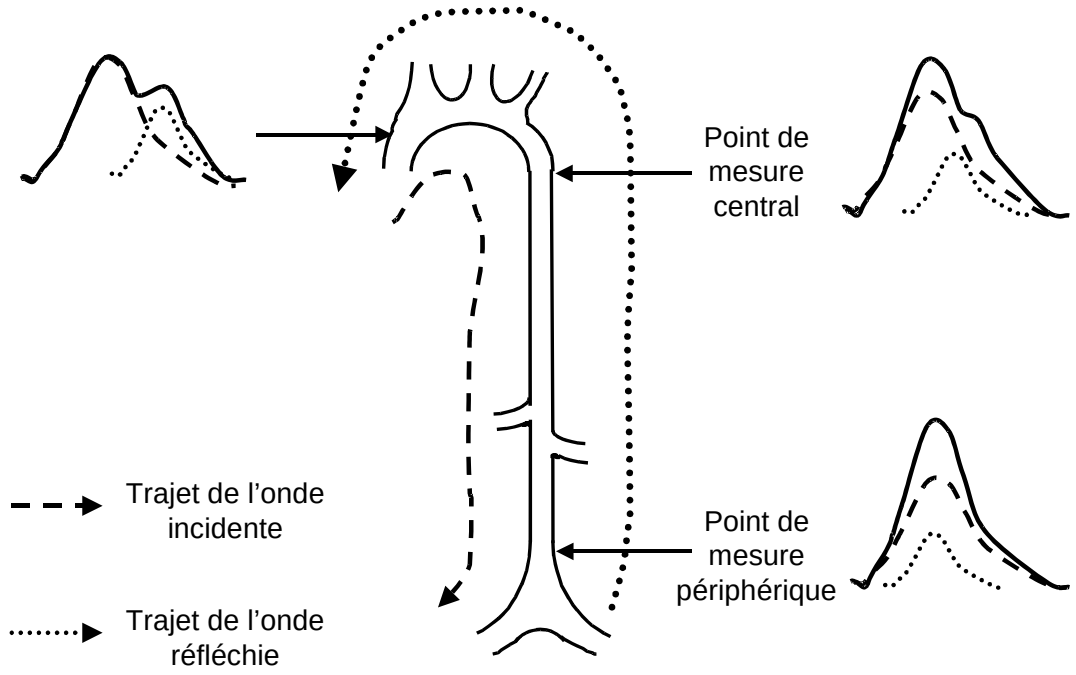


Figure 6. Evolution du contour de l'onde de pression le long de l'aorte chez l'homme. L'onde de pression (——) mesurée en tout point de l'aorte résulte de l'addition d'une onde incidente (– –) et d'une onde réfléchie (·····) (d'après Latham et coll., 1985).

Ainsi, chez l'individu jeune, plus on s'éloigne du cœur et plus la PP augmente. En conséquence, lorsque le site de mesure se rapproche des sites de réflexion, ces réflexions reviennent plus rapidement et s'additionnent plus précocement par rapport au cycle cardiaque. Il apparaît donc une amplification de la pression pulsée aortique (= PP périphérique / PP centrale) le long de l'aorte, entre le point de mesure central et le point de mesure périphérique (de l'ordre de 50% chez l'homme de moins de 50 ans) (Figure 6). (O'Rourke et coll., 1968)

Chez la personne âgée, une accentuation de l'intensité des ondes réfléchies est observée (à cause du rétrécissement du calibre artériolaire, de la rigidité de la paroi artérielle…). De plus, l'augmentation de la VOP consécutive à la perte d'élasticité aortique induit un trajet plus rapide de l'onde incidente (VOP multipliée par deux entre 20 et 80 ans, (Nichols et O'Rourke, 1998)) et un retour plus précoce des ondes de réflexion. Ainsi, l'augmentation de la PP est proportionnellement moins importante au niveau périphérique

qu'au niveau central. Il en résulte que l'amplification de la PP est fortement atténuée avec l'âge chez l'homme (15% à 50 ans, amplification nulle à 65 ans, (O'Rourke et coll., 1968)).

L'amplification de la PP aortique, de même que l'augmentation de la VOP sont donc des paramètres hémodynamiques qui reflètent l'augmentation de la rigidité de la paroi aortique (Nichols et O'Rourke, 1998) et permettent d'évaluer la fonction aortique dans sa globalité. Néanmoins, ces deux paramètres ne sont pas totalement équivalents : alors que la VOP thoraco-abdominale correspond strictement à la rigidité pariétale aortique, l'amplification de la PP reflète les réflexions d'ondes dues à l'augmentation de résistance périphérique en aval et aux changements de composition pariétale (Izzo, 2004).

I.3 Déterminants de l'élasticité des parois artérielles

Il existe plusieurs déterminants de l'élasticité pariétale qui la modifient à différents degrés. Ainsi, d'après Milnor, le tonus local dû à la contractilité des cellules musculaires lisses médiales, de même que la contrainte et la composition pariétales ont une influence directe sur l'élasticité pariétale artérielle (Milnor, 1990). Ces paramètres évoluent au cours du vieillissement et influencent d'autant plus le développement de la rigidité pariétale artérielle.

I.3.1 Impact du tonus musculaire sur l'élasticité et la rigidité pariétales aortiques

Les cellules musculaires lisses (CML) représentent l'élément potentiellement actif de la média en raison de leur capacité à modifier le diamètre artériel et la contrainte pariétale *via* des mécanismes de relaxation et de contraction. L'état contractile des CML reflète à chaque instant l'équilibre entre les facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs qui contrôlent la concentration en calcium cytoplasmique et le niveau de phosphorylation des chaînes légères régulatrices de la myosine de type II (MLC20) (Lacolley, 2007). L'endothélium, par sa capacité à libérer des substances vasoactives, plus particulièrement le monoxyde d'azote (NO), peut moduler les propriétés élastiques (Levy et coll., 1990) en modifiant l'état de contraction des CML qui se situent à proximité.

La découverte par Furchgott et Zawadzki du rôle obligatoire joué par les cellules endothéliales en relation avec les artères isolées en réponse à l'acétylcholine, est à l'origine de nombreuses recherches portant sur le rôle essentiel de l'endothélium dans sa

contribution à la fonction physiologique normale de la paroi vasculaire (Furchgott et Zawadzki, 1980).

Les travaux de Gaballa et de ses collaborateurs montrent une majoration de la rigidité de la paroi carotidienne de rats âgés (vingt-trois mois) suite à une vasoconstriction et l'expliquent par les effets combinés du remodelage de la matrice extracellulaire et de l'altération des réponses constrictrices-relaxantes des CML médiales (Gaballa et coll., 1998). D'autre part, Kinlay et ses collaborateurs ont démontré qu'un inhibiteur de la production de NO, le L-NMMA (L-N^G-monométhyl arginine), diminuait la compliance artérielle et augmentait la VOP, alors que la nitroglycérine, un donneur de NO, avait l'effet inverse (Kinlay et coll., 2001). Ainsi, une dysfonction endothéliale liée à l'âge pourrait être mise en jeu dans le développement de la rigidité pariétale artérielle (Taddei et coll., 1995; d'Alessio, 2004). Pour Taddei et ses collaborateurs, une dysfonction primaire de la voie endothéliale du NO réduirait la production du NO et donc sa biodisponibilité dans un premier temps, puis dans un second temps par le développement d'un stress oxydant, l'ensemble de ces phénomènes conduisant au final à une réduction de la vasodilation endothélium-dépendante et à une augmentation de la rigidité pariétale artérielle (Taddei et coll., 2001).

De plus, Michel et ses collaborateurs ont montré *in situ* que l'élévation de compliance carotidienne induite par le cyanure de potassium (provoquant la désactivation des CML) s'amenuise avec l'âge (Michel et coll., 1994). Ceci suggère que la part "contractile" des CML dans le contrôle de la compliance des artères élastiques, diminue avec l'âge, tandis que la part "structurale" (représentée par la matrice extracellulaire) augmente.

Par ailleurs, l'impact important de la contractilité des cellules musculaires lisses a été démontré dans la détermination de l'élasticité pariétale des artères de résistance, dont la paroi contient beaucoup plus de CML que les artères élastiques (Mulvany et Halpern, 1977).

I.3.2 Impact de la contrainte pariétale sur l'élasticité des gros troncs artériels

Comme prédit par la relation contrainte/déformation vue précédemment (Figure 2, page 4), plus la contrainte pariétale augmente, moins la déformation est importante, donc plus la paroi artérielle est rigide.

L'équation de Lamé (Whittaker et Watson, 1927) permet de calculer la contrainte pariétale (CP, 10^6 dynes/cm^2 avec 1 mm Hg = 1334 dynes/cm^2) telle que :

$$CP = (\text{pression artérielle moyenne} \times D_i) / 2h$$

Ainsi, toute augmentation du diamètre interne (Di) et/ou de la pression intraluminale (traduite par la pression artérielle moyenne) ou toute diminution de l'épaisseur pariétale (h), en induisant une majoration de la contrainte pariétale, augmentera la rigidité pariétale artérielle.

I.3.2.1 Effet de la pression intraluminale

Une élévation de la pression intraluminale distend et rigidifie la paroi artérielle, de manière indépendante de sa géométrie et de sa composition de base (Armentano et coll., 1995). Une augmentation de la pression intraluminale aiguë ou chronique, comme celle observée dans l'hypertension artérielle, induit une augmentation du module élastique de la paroi artérielle qui se traduit par une augmentation de la VOP et une diminution de la compliance artérielle. Néanmoins, différentes études (Hayoz et coll., 1992; Armentano et coll., 1995) ont montré que la distensibilité des grosses artères élastiques de sujets hypertendus jeunes est similaire à celle de sujets normotendus dans des conditions isobariques. Ceci n'est pas le cas chez les sujets hypertendus âgés dont les gros troncs artériels présentent une rigidité pariétale intrinsèque même à pression artérielle moyenne normale (Marque et coll., 1999).

I.3.2.2 Effet de la géométrie de la paroi aortique

Lors d'un accroissement chronique du diamètre interne de l'aorte, tel qu'on l'observe au cours du vieillissement, une hypertrophie pariétale se développe et compense dans un premier temps cette augmentation du diamètre, maintenant ainsi la contrainte pariétale à un niveau normal. Cette hypertrophie implique toutefois des modifications de la composition pariétale (Mulvany, 1993), elle-même déterminant important de l'élasticité de la paroi artérielle (cf ci-dessous).

En conséquence, les modifications chroniques de géométrie, impliquant une dilatation et une hypertrophie pariétale, aboutissent à une augmentation de la rigidité pariétale artérielle.

I.3.3 Impact de la composition pariétale sur l'élasticité des gros troncs artériels

I.3.3.1 Description de la composition pariétale artérielle

La paroi aortique se compose de trois tuniques concentriques distinctes. A partir de la lumière vasculaire, on trouve :

(1) **l'intima**, composée de l'endothélium et de la lame limitante élastique interne. Son organisation en couche monocellulaire confère à l'intima une faible influence sur l'élasticité de la paroi (Burton, 1954) mais l'endothélium est néanmoins capable de libérer des substances vasoactives pouvant modifier le tonus vasomoteur (cf ci-dessus).

(2) **la média**, délimitée par les lames limitantes élastiques interne et externe, est essentielle dans la détermination des propriétés élastiques de la paroi. Elle ne contient généralement que des CML vasculaires, s'appuyant sur une matrice extracellulaire (MEC) composée en majeure partie d'élastine, de collagène et de protéoglycannes (Wolinsky et Glagov, 1967). La média artérielle des artères élastiques se présente comme un empilement de faisceaux (ou feuillets) musculo-élastiques (Clark et Glagov, 1985). Chaque feuillet consiste en un groupe de CML et de fibres de collagène délimité par des fibres élastiques orientées suivant le grand axe des cellules (Figure 7). Le nombre de ces feuillets augmente avec le diamètre artériel et le poids de l'animal (Wolinsky et Glagov, 1967). Cette disposition permet une distribution plus ou moins uniforme des contraintes mécaniques au sein des vaisseaux.

(3) **l'adventice**, composée de fibres de collagène et d'élastine, assure la liaison avec les tissus conjonctifs adjacents. Elle joue un rôle important dans l'élasticité de la paroi mais seulement pour des niveaux de pression élevés (Dobrin, 1978) et dans la résistance à la rupture des anévrysmes. L'adventice est traversée de *vasa vasorum*, de vaisseaux lymphatiques et de structures nerveuses et joue un rôle dans l'apport nutritionnel de la paroi artérielle. L'épaisseur de l'adventice est très variable selon le type d'artère : peu importante dans les gros troncs artériels, plus épaisse pour les artères mésentériques et rénales.

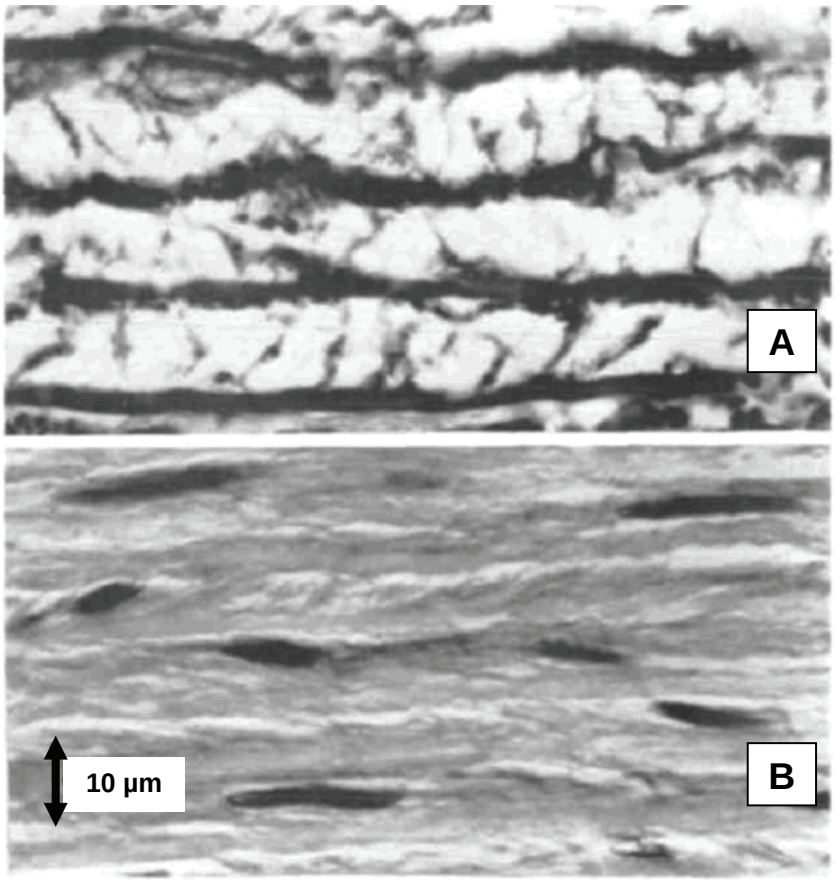


Figure 7. Organisation de la média aortique en faisceau musculo-élastiques
(A) les lames élastiques apparaissent en noir par une coloration Weigert-Van Gieson ; (B) les lames élastiques apparaissent en blanc et les noyaux des cellules musculaires lisses en noir par une coloration hématoxyline-éosine. Les propriétés de la paroi ne dépendent pas uniquement de sa composition mais aussi de l'organisation spatiale des composants entre eux (d'après Wolinsky et Glagov, 1967).

I.3.3.2 Rôle de la média dans les propriétés élastiques de la paroi

La média, de par sa composition, est une tunique importante dans la détermination de l'élasticité pariétale artérielle globale (Nichols et O'Rourke, 1998). Ses éléments constitutifs sont caractérisés chacun par un module élastique différent : on distingue ainsi des éléments à faible module élastique (élastine, CML) et des éléments à fort module élastique (collagène). Le module élastique du collagène est 10 à 30 fois supérieur à celui de l'élastine et des CML (Burton, 1954).

Au sein de la média, la répartition et la quantification de ces différents éléments peuvent être étudiées histologiquement en deux (histomorphométrie, (Corman et coll., 1998)) ou trois dimensions (microscopie confocale, (McGrath et coll., 1995)). Les taux de collagène et d'élastine peuvent être également mesurés *via* le dosage de l'un de leurs acides aminés modifiés caractéristiques (respectivement hydroxyproline (Neuman et Logan, 1950; Cantini et coll., 2001) et desmosine et isodesmosine (Giummelly et coll., 1999).

- **Elastine et collagène**

La composition relative en collagène et en élastine de la média aortique est maintenue stable grâce à un processus lent mais dynamique de production et de dégradation par les CML vasculaires.

L'élastine est une protéine élastomèrique très extensible, vectrice des propriétés de distensibilité des gros troncs artériels. Dans la média, l'élastine est organisée en un réseau de lames élastiques continues, parallèles et concentriques (Figure 7, (Wolinsky et Glagov, 1967)).

Le rôle physiologique des fibres de collagène est de maintenir l'intégrité de la structure vasculaire en résistant aux forces de traction des parois vasculaires (contraintes longitudinale, radiale et circonférentielle). En effet, les fibres de collagène sont très peu extensibles mais leur organisation en réseau les rend toutefois flexibles (Roveri et coll., 1978). De plus, les molécules de collagène sont immédiatement liées, pontées entre elles après leur formation afin de les rendre résistantes aux enzymes hydrolytiques. Les modifications des molécules de collagène ou de leurs liaisons induisent des pertes graves de la cohésion du tissu conjonctif pariétal.

- **Cellules musculaires lisses vasculaires**

Les CML sont orientées principalement dans la direction circonférentielle, associées aux protéines matricielles pour former des faisceaux musculo-élastiques (Clark et Glagov, 1985). Ces CML médiales jouent un rôle essentiel dans l'équilibre du processus de production et de dégradation de la MEC, puisqu'elle synthétisent aussi bien l'élastine et le collagène que les métalloprotéases matricielles (MMP), collagénases et élastases, qui catabolisent ces mêmes protéines.

- **MEC et interactions cellules-matrices**

Entre les fibres élastiques, se trouve la matrice interstitielle, composée de collagènes fibrillaires (majoritairement de type III), de glycoprotéines de structure (fibronectine, laminine) et de protéoglycannes (Robert L, 1987).

Les glycoprotéines de structure sont des protéines d'adhérence, responsables des interactions entre la membrane cellulaire et les autres composants de la MEC (Yamada et coll., 1983). Ainsi, les liaisons entre les CML et la MEC impliquent des protéines d'adhésion du type fibronectine et leurs récepteurs membranaires, les intégrines, et constituent de véritables structures d'attachement nommées plaques denses (Gabella, 1984; Bezie et coll., 1998a; Lacolley et coll., 2002).

Les branchements latéraux entre les fibres élastiques et la surface cellulaire permettent de cette façon de coupler chaque feuillet élastique au suivant. Les connections ainsi organisées coordonnent la tension des lames élastiques à la tension des cellules CML (Gabella, 1984).

Le nombre d'attachements entre cellules et MEC pourrait influencer directement les propriétés mécaniques de la paroi en limitant la capacité de celle-ci à se déformer sous l'effet d'une contrainte. Bézie et ses collaborateurs ont mis en évidence une augmentation du nombre de liaisons cellules-matrice chez le rat spontanément hypertendu (SHR) par rapport au rat contrôle (Bezie et coll., 1998b). Ces auteurs suggèrent qu'il s'agirait d'un phénomène d'adaptation à l'hypertension pour maintenir un comportement mécanique des parois artérielles identique entre le rat hypertendu et normotendu en conditions isobariques (Bezie et coll., 1998a). En revanche, chez le rat SHR âgé, l'augmentation de la rigidité pariétale artérielle liée à l'âge pourrait être due à une augmentation des liaisons cellules-matrice : le vieillissement prendrait le pas sur le phénomène adaptatif et le nombre accru de liaisons cellules-matrice participerait à la rigidification de la paroi (Marque et coll., 1999). Il serait également possible qu'une augmentation du nombre de liaisons cellules-matrice influence l'augmentation de la rigidité pariétale artérielle avec l'âge chez le sujet normotendu mais cela doit encore être vérifié (Lacolley, 2007).

I.4 Modifications des gros troncs artériels au cours du vieillissement

Le vieillissement vasculaire est caractérisé par l'atteinte des gros trons artériels. Avec l'âge, la paroi artérielle subit de nombreuses modifications structurales et fonctionnelles.

I.4.1 Fatigue du cumul des chocs et remodelage pariétal

A chaque cycle cardiaque, les matériaux constitutifs de la paroi artérielle subissent un étirement cyclique, responsable d'une fatigue. Physiologiquement, la fatigue accumulée par l'aorte à un moment donné de la vie est déterminée par le nombre de cycles cardiaques (fonction de l'âge de l'individu et de sa fréquence cardiaque) et par l'amplitude de l'étirement de la paroi artérielle à chaque cycle cardiaque, correspondant à la PP (Laurent et coll., 2001b).

Ce processus de "fatigue du cumul des chocs" est amplifié par l'augmentation de la PP et entraîne un remodelage de la paroi artérielle. Ainsi, le cumul des chocs pariétaux des ondes de pression intraluminale favorise la cassure, la fragmentation des fibres élastiques (offrant alors plus de sites de fixation pour le calcium), entraînant une désorganisation du réseau élastique de la média avec à terme la perte des propriétés élastiques de la paroi artérielle et le transfert de la contrainte pariétale au collagène dont le module élastique est nettement supérieur à celui de l'élastine (Nichols et O'Rourke, 1998). De cette façon, la rigidité pariétale artérielle s'auto-entretient, en favorisant la dégradation de la MEC qui, elle-même, favorise l'augmentation de PP, etc.

De plus, la perte de l'intégrité structurale du réseau élastique de maintien fragilise la paroi artérielle et entraîne un remodelage pariétal : hypertrophie (média et adventice) et augmentation du diamètre interne. Ce remodelage pariétal mène à la formation d'un anévrysme dont l'évolution naturelle est une augmentation inéluctable de son calibre avec, à terme, rupture. (Halloran et Baxter, 1995; Ghorpade et Baxter, 1996)

Boutouyrie et ses collaborateurs ont montré que la PP carotidienne, à l'inverse de la pression artérielle moyenne et de la PP brachiale, était un déterminant indépendant de la dilatation et de l'épaississement de la paroi de l'artère carotide, suggérant ainsi que la PP locale influence plus le remodelage pariétal que la pression artérielle moyenne (Boutouyrie et coll., 1999).

I.4.2 Modifications structurales

Au cours du viellissement, le remodelage de la paroi artérielle au plan macroscopique associe une dilatation de l'artère et un épaississement de la paroi (Lakatta et Levy, 2003). La dilatation artérielle se caractérise par une augmentation importante des diamètres internes et externes des gros troncs artériels (O'Rourke, 1990). L'hypertrophie artérielle au cours du viellissement atteint l'intima-média. Des mesures non-invasives au niveau de la carotide ont montré que l'épaisseur intima-média était multipliée par 2 ou 3 entre 20 et 90 ans. Cette hypertrophie s'explique par l'accumulation de matériel fibreux liée à l'altération de l'endothélium qui devient perméable aux macromolécules plasmatiques *in vivo* (Belmin et coll., 1993), et à l'hypertrophie des CML vasculaires. Les CML augmentent leur capacité proliférative et sécrétoire. Cette prolifération anormale est liée à une production accrue de facteurs de croissance (Platelet-derived growth factor, PDGF), des anomalies des facteurs anti-prolifératifs et est associée à l'expression de molécules d'adhésion et la production de cytokines dans la paroi artérielle.

La matrice extracellulaire est modifiée : les fibres élastiques apparaissent progressivement désorganisées, plus fines et souvent fragmentées (Fornieri et coll., 1992). L'élastolyse est probablement en rapport avec l'usure mécanique provoquée par la fatigue du cumul des chocs que subit l'artère à chaque systole. Bien que les fibres élastiques soient dégradées et synthétisées en permanence, leur renouvellement est très lent. L'altération de l'élastine lors du vieillissement résulterait de la diminution de sa biosynthèse et de l'accélération de sa dégradation par l'augmentation de l'activité des enzymes élastolytiques présentes au niveau des CML, des fibroblastes et des leucocytes (Labat-Robert et Robert, 1988) ainsi que le dépôt progressif de lipides et de sels de calcium à leur surface (Lakatta, 1998). Cette dégénéresence des fibres élastiques est potentialisée par l'accumulation des contraintes mécaniques de pression avec l'âge (O'Rourke, 1990). La quantité de collagène augmente, aboutissant à une diminution du rapport élastine / collagène.

Des calcifications apparaissent : la calcification de la média se développe préférentiellement sur les lames élastiques des grosses artères élastiques (aorte, carotides) et provoque leur dégradation, ou élastocalcinose (Elliott et McGrath, 1994; Proudfoot et Shanahan, 2001). Entre l'enfance et l'âge de 90 ans, le taux de calcium total dans la paroi artérielle est multiplié par un facteur variant de 50 à 100 (Fleckenstein et coll., 1983). L'intensité de la calcification âge-dépendante de la paroi artérielle suit le gradient d'élastine : elle est forte dans les artères à forte proportion d'élastine (aorte thoracique) et faible dans les artères à faible proportion d'élastine (artère caudale) (pour revue, voir (Atkinson, 1998)).

Ainsi, l'élastine aurait une très forte affinité pour le calcium. Plus précisément, les MMP, lorsqu'elles dégradent les fibres élastiques, augmenteraient cette affinité élastine-calcium et favoriseraient le développement de l'élastocalcinose (Basalyga et coll., 2004). L'absence de dégradation de l'élastine par les MMP empêcherait donc le développement de l'élastocalcinose (Bailey et coll., 2004; Qin et coll., 2006).

Les fibres de collagène se rigidifient avec l'âge (Rattan, 1996). Cette rigidité des fibres de collagène est due à leur transformation par la réaction de Maillard, mieux connue en physiologie sous le nom de « glycation non enzymatique des protéines ». En effet, le glucose se lie, par des liaisons covalentes, aux radicaux NH des protéines pour former des bases de Schiff (résultant de l'addition d'une amine primaire avec un aldéhyde ou une cétone suivi d'une déshydratation), conduisant à la formation de produits de glycation avancée (AGEs) (Brownlee et coll., 1988) s'accumulant avec l'âge (et le diabète) dans la paroi artérielle. Ce processus lent concerne les protéines à taux de renouvellement faible comme l'élastine et le collagène. Les AGEs sont directement responsables d'une désorganisation de l'assemblage des protéines matricielles et du pontage du collagène. Ils rendent les fibres de collagène plus résistantes aux collagénases en augmentant la fréquence des ponts intercaténaires (cross-linking) (Oimomi et coll., 1988). Ainsi, la prédominance de ce collagène ponté dans les parois vasculaires, avec la calcification, engendre les phénomènes de fibrose et de perte d'élasticité artérielle (Robert, 1999).

I.4.3 Modifications fonctionnelles

Le vieillissement fonctionnel résulte en partie des modifications de structure. L'épaississement de la paroi s'accompagne d'un élargissement de la lumière artérielle. En effet, le diamètre de l'aorte est augmenté de 15-20% chez des sujets normaux âgés de plus de 65 ans par rapport au diamètre de l'aorte du sujet adulte jeune (Virmani et coll., 1991). Ces modifications sont observées au niveau des artères élastiques (aorte et grosses artères thoracoabdominales) alors que le diamètre des artères musculaires change peu avec l'âge (Benetos et coll., 1993). Ces modifications vont entraîner une diminution de la distensibilité et de la compliance artérielle. La compliance artérielle *in vivo* dépend surtout des caractéristiques de la MEC de la média mais aussi du tonus contractile de ses CML. Avec l'âge, les fonctions d'amortissement des gros troncs artériels sont altérées, ce qui se traduit par une élévation de la rigidité artérielle considérée actuellement comme un facteur de risque cardio-vasculaire indépendant (Benetos et coll., 1997). La diminution de la compliance artérielle entraîne une élévation de la pression artérielle systolique, une augmentation de la VOP et une surcharge en pression du ventricule gauche avec une augmentation des contraintes pariétales à l'origine du remodelage du ventricule gauche.

L'étude Framingham a confirmé que la pression artérielle systolique augmentait avec l'âge, tandis que la pression diastolique qui s'élève jusque vers 50 ans, diminue au-delà (Franklin et coll., 1997). Il en résulte une augmentation de la PP, signe d'une augmentation de rigidité de la paroi vasculaire (Izzo et Mitchell, 2007). L'augmentation de la rigidité artérielle précède l'hypertension artérielle. En retour, l'hypertension artérielle systolique contribue à l'épaississement de la paroi et à la rigidité artérielle. Plusieurs études récentes ont montré que la PP était un facteur de risque puissant et indépendant d'évènements cardio-vasculaires chez le sujet âgé (Boutouyrie et coll., 2002; Cockcroft et coll., 2005).

La fonction endothéliale est également altérée avec l'âge, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité endothéliale et une diminution de la production de substances vasoactives notamment du monoxyde d'azote (NO) (Barton et coll., 1997). L'augmentation de la perméabilité endothéliale entraîne un passage accru des macromolécules plasmatiques dans la média, et une accumulation de celles-ci dans l'intima, qui participent à son épaississement (Lee et coll., 2008).

La réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine (Ach) est très réduite chez l'animal et chez l'homme âgé (Marin, 1995; Bulckaen et coll., 2008). Chez l'animal âgé, la relaxation artérielle endothélium-dépendante induite par l'Ach est diminuée (Castillo et coll., 2005). Cette diminution des effets de l'Ach n'est pas due à une réduction de la production de NO, qui est conservée ou même augmentée chez le sujet âgé, mais à une inactivation accrue du NO par les radicaux libres et/ou à une augmentation de substances vasoconstructrices comme l'endothéline (van der Loo et coll., 2009; Westby et coll., 2011), le thromboxane ou certaines prostaglandines (Wong et coll., 2010). Les protéines glyquées de la média pourraient également participer à la dysfonction endothéliale du sujet âgé dans la mesure où les AGEs séquestrent le NO et limitent sa diffusion vers les CML (Hallam et coll., 2010). En parallèle, la prostacycline (PGI_2), molécule vasodilatatrice synthétisée par les plaquettes et les cellules endothéliales, est libérée en quantité moindre par des cellules endothéliales humaines provenant de sujets âgés (Nicholson et coll., 2009).

En résumé, les modifications qualitatives de la MEC de la média artérielle décrites ici sont responsables du vieillissement de la paroi aortique. Celui-ci détermine directement le développement d'une rigidité pariétale artérielle et par conséquent d'une hyperpulsatilité, qui accentue elle-même le remodelage vasculaire (Figure 8). Ainsi, par ces mécanismes, la rigidité pariétale artérielle s'auto-entretient et s'aggrave.

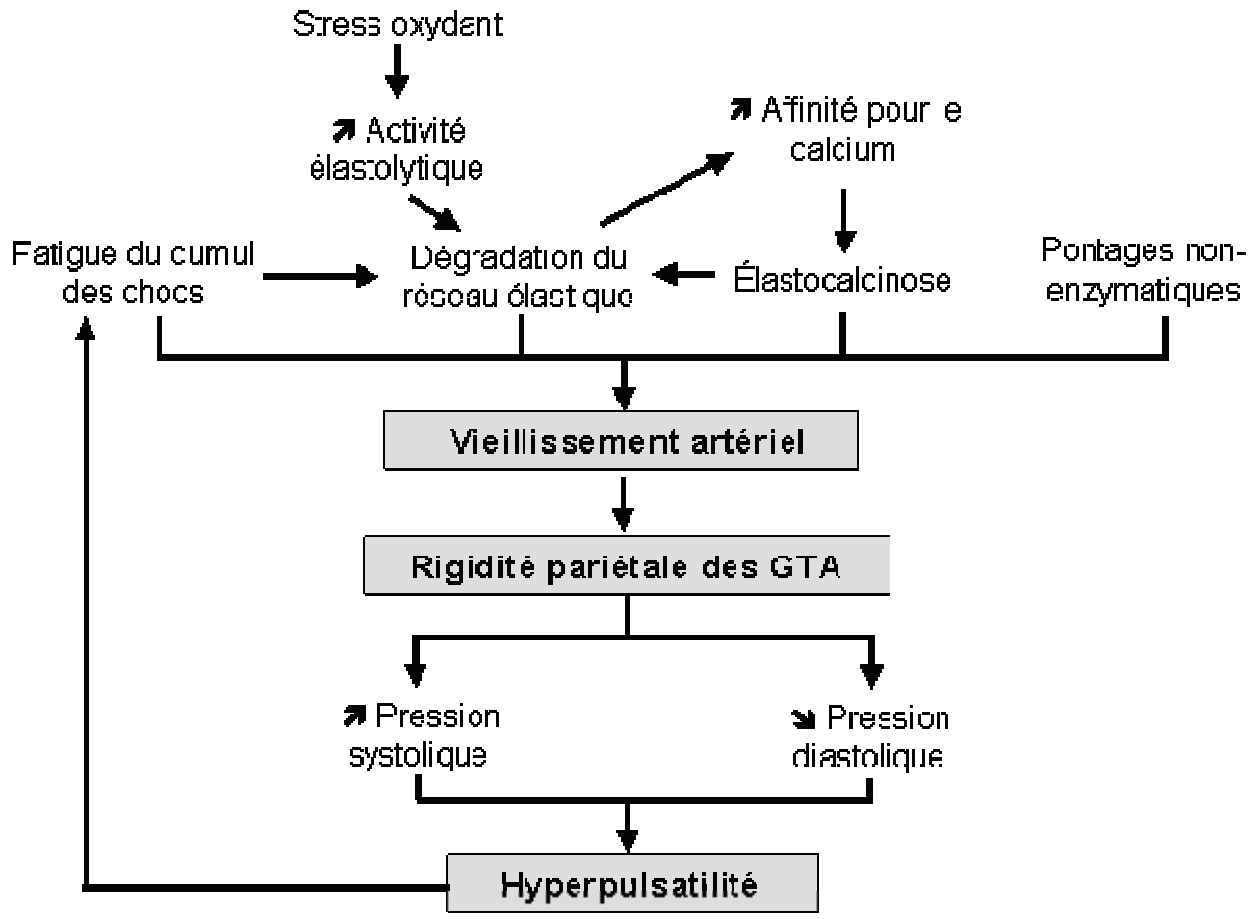


Figure 8. Schéma résumant les différentes modifications qualitatives de la matrice extracellulaire de la média artérielle et leur conséquences, en terme de rigidité, de la paroi artérielle.

Les effets du vieillissement sur les déterminants de la rigidité pariétale aortique concernent peu la contrainte pariétale et les modifications quantitatives de la composition pariétale. En revanche, les atteintes qualitatives (élastocalcinose, accumulation d'AGEs, dégradation du réseau élastique et interactions cellules-matrice) semblent avoir quant à elles un plus fort retentissement (Figure 8).

Cependant, pour un même état pathologique final, c'est-à-dire une rigidité pariétale artérielle augmentée, ses déterminants et leurs parts de responsabilité dans le développement de la pathologie différent d'un individu à l'autre. Cette idée semble confortée par l'existence d'une susceptibilité génétique au développement de la rigidité pariétale aortique, ainsi que par l'influence de l'environnement.

Nous avons choisi, dans ce travail, d'étudier certains facteurs influençant la rigidité artérielle à travers 2 modèles :

Un facteur majeur de l'environnement sont les troubles métaboliques, que nous avons étudiés dans le modèle du rat Zucker obèse.

Un facteur génétique, dont le polymorphisme peut modifier la prévalence des maladies cardiovasculaire dans le modèle de la souris Klotho, modèle connu pour avoir un vieillissement systémique accéléré.

II Facteurs environnementaux de la rigidité : le rôle du syndrome métabolique

Chez l'homme, il existe énormément des travaux dans le cadre du syndrome métabolique, qui associent l'obésité abdominale et les troubles métaboliques tels que les dyslipidémies (Reaven et coll., 2004). Avant de présenter notre modèle d'obésité, le rat Zucker, il est intéressant de donner une définition du syndrome métabolique, associé à l'obésité, ainsi que les différents modèles animaux disponibles pour reproduire ce syndrome.

II.1 Définition du syndrome métabolique

Le syndrome métabolique a été décrit pour la première fois en 1988 par Reaven sous le nom de syndrome X (Reaven, 1988). Il le définit comme l'association d'une intolérance au glucose, d'une résistance à l'insuline, de dyslipidémies, et d'hypertension. Par la suite d'autres critères, comme l'obésité, se sont ajoutés à ce syndrome, qui est actuellement mieux connu sous le nom de syndrome métabolique. Néanmoins la définition exacte de ce syndrome est l'objet d'un vif débat au sein des communautés scientifiques et médicales internationales. En effet, il existe plusieurs définitions de ce syndrome, mais aucune d'entre elles ne fait consensus, ce qui pose un problème de diagnostic en pratique clinique. En revanche, ce qui est unanimement acquis, c'est que les patients présentant un syndrome métabolique, quelle que soit sa définition, ont une augmentation très importante du risque de développer des pathologies cardiovasculaires comme l'athérosclérose ou l'insuffisance cardiaque et un diabète de type 2, tout ceci contribuant à la morbi-mortalité de ce syndrome (Lakka et coll., 2002; Aguilar-Salinas et coll., 2005; Kahn et coll., 2005).

Toutes les définitions du syndrome métabolique proposées jusqu'à aujourd'hui sont relativement semblables et regroupent globalement les mêmes anomalies métaboliques et

cardiovasculaires, mais souvent n'ont pas les mêmes seuils de détection pour chaque anomalie.

Au fil des années, il est apparu critique de définir plus précisément et plus simplement le syndrome métabolique afin de proposer un outil de diagnostic facile à utiliser en pratique clinique, quelque soit le pays. Ceci permettrait en particulier de pouvoir comparer la prévalence du syndrome métabolique au sein de différentes populations.
En regroupant plusieurs experts, dont les membres de la WHO (World Health Organization) et du NCEP ATP III (National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III), l'International Diabetes Federation (IDF) avait pour but d'arriver à un consensus pour une définition de ce syndrome.
Selon ces experts, le syndrome métabolique regrouperait les symptomes suivants :

- *obésité abdominale* :

l'IDF a considéré que « l'épidémie » d'obésité serait un des moteurs majeurs de l'augmentation de la prévalence du syndrome métabolique dans le monde. En effet, l'obésité peut contribuer à l'hyperglycémie, l'hypertension, l'augmentation des triglycérides plasmatiques, la diminution du High Density Lipoprotein (HDL) cholestérol et la résistance à l'insuline (2006; Liu et coll., 2010). L'obésité est également un important facteur de risque cardiovasculaire. L'obésité abdominale joue un rôle important dans le syndrome métabolique en raison du rôle majeur du tissu adipeux, plus particulièrement abdominal ; en effet, le tissu adipeux sécrète différents facteurs comme les acides gras libres (Boden, 2011), le Tumor Necrosis Factor α (TNFα), qui peuvent affecter l'action de l'insuline (Turner et coll., 1998), ou encore l'adiponectine, qui, en situation normale a une action anti-diabétique, anti-athérogène et anti-inflammatoire (Goldstein et Scalia, 2004). Le marqueur de choix de l'obésité abdominale serait la mesure du tour de taille préférentiellement au calcul de l'indice de masse corporelle. En revanche, les valeurs seuil du tour de taille seraient à adapter en fonction de l'origine ethnique du patient.

- *Résistance à l'insuline :*

elle est présente chez la majorité des patients présentant un syndrome métabolique.

- *Dyslipidémies athérogènes :*

ceci correspond principalement à l'augmentation des triglycérides plasmatiques ainsi qu'à la diminution du HDL cholestérol.

- *Augmentation de la presssion artérielle ;*
- *Etat pro-inflammatoire ;*
- *Etat pro-thrombotique.*

Même si la résistance à l'insuline semble être un élément clé du syndrome métabolique, ce paramètre n'a pas été retenu dans la définition de l'IDF au vu des difficultés à l'évaluer en pratique clinique. L'IDF a donc proposé la définiton suivante : le critère obligatoire de cette définition est l'obésité abdominale (valeur seuil du tour de taille dépendant de l'origine ethnique), associée à deux des quatre paramètres suivants :

- augmentation des triglycérides plasmatiques : >1,7 mm/l (150 mg/dl)
- diminution du taux de HDL-cholestérol : < 1,03 mmol/l (40 mg/dl) chez l'homme, < 1,29 mmol/l (50 mg/dl chez la femme, ou traitement en cours pour dyslipidémie)
- augmentation de la pression artérielle : > 130/85 mmHg, ou traitement en cours pour hypertension artérielle
- augmentation de la glycémie à jeun : > 5,6 mmol/l (100 mg/dl), ou diabète de type 2 diagnostiqué.

II.2 Modèles animaux de syndrome métabolique

Avant de présenter les principaux modèles animaux de syndrome métabolique, qui utilisent l'invalidation de la voie de la leptine, il convient de préciser la biologie de la leptine, de ses récepteurs et de son mécanisme d'action.

II.2.1 La leptine

Le terme leptine est issu du grec *leptos* qui signifie mince. La leptine est une hormone peptidique constituée de 167 acides aminés, sécrétée principalement par les adipocytes.
Chez la souris, le gène codant pour la leptine (gène ob) a été cloné en 1994 ; il se situe sur le chromosome 6 (Zhang et coll., 1994). La leptine régule le volume de la masse adipeuse en agissant au niveau hypothalamique pour contrôler la prise alimentaire et la dépense énergétique. En effet, le taux de leptine circulante est diminué en période de jeûne et augmentée en période post-prandiale. De plus, elle agit sur le système nerveux sympathique pour augmenter la dépense énergétique et la thermogenèse au niveau du tissu adipeux brun (Saladin et coll., 1995; Stephens et coll., 1995; Collins et coll., 1996). Par ses actions à la fois centrales et périphériques, la leptine exerce un effet sur le métabolisme du glucose (module la sécrétion de l'insuline) et des lipides. Elle réduit le transport de glucose dans les adipocytes, et à l'inverse, augmente la glycogenèse et l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique (Ceddia et coll., 1999). Cependant, en plus de son rôle sur le contrôle du métabolisme énergétique, la leptine joue un rôle important dans la reproduction, l'hématopoïèse et l'anorexie (Houseknecht et coll., 1998).

II.2.2 Le récepteur de la leptine

Le récepteur de la leptine de souris a été cloné en 1995 (Tartaglia et coll., 1995). Ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs de cytokines de classe 1. Chez la souris, 5 sous-types de récepteurs de la leptine issus de l'épissage alternatif du gène db ont été décrits (Ob-R-a à -e) (Figure 9). Une sixième isoforme a été détectée chez le rat (r-OB-Rf) (Wang et coll., 1996). Dans la littérature, les isoformes du récepteur à la leptine sont classés en deux familles : la forme longue (Ob-RL) correspondant au récepteur Ob-Rb, et la forme courte (OB-RS) correspondant aux quatre autres isoformes.

Toutes les isoformes du récepteur ont la même partie extracellulaire permettant la fixation de la leptine, mais elles diffèrent dans leur partie intracellulaire. La forme longue Ob-Rb est la seule à avoir une partie C-terminale intracellulaire entière et fonctionnelle pour la transduction du signal par la voie JAK-STAT (Bates et coll., 2003; Bates et coll., 2005). La protéine et son ARNm ont été principalement détectés dans l'hypothalamus, en particulier au niveau du noyau arqué et de façon moindre, au niveau des noyaux ventro-, dorso-médians, latéraux, et du noyau paraventriculaire (Schwartz et coll., 1996; Fei et coll., 1997; Friedman et Halaas, 1998). Par ailleurs, son ARNm a été retrouvé au niveau rénal, hépatique, cardiaque, splénique et pancréatique (Emilsson et coll., 1997).

Les formes courtes ont une partie intracellulaire réduite voire inexistante selon l'isoforme (Figure 9). Leur rôle n'est pas encore clairement identifié, mais ils pourraient notamment intervenir dans le transport unidirectionnel de la leptine au travers de la barrière hémato-encéphalique (Lee et coll., 1996; Tartaglia, 1997; Kastin et coll., 1999). L'ARNm des formes courtes du récepteur a été détectée au niveau du cerveau et plus particulièrement de l'hypothalamus et du plexus choroïde (Ob-Ra), du tissu adipeux (Ob-R-a, -c, -d), des testicules (Ob-R-a, -d) et du cœur (Ob-R-c, -d) (Lee et coll., 1996).

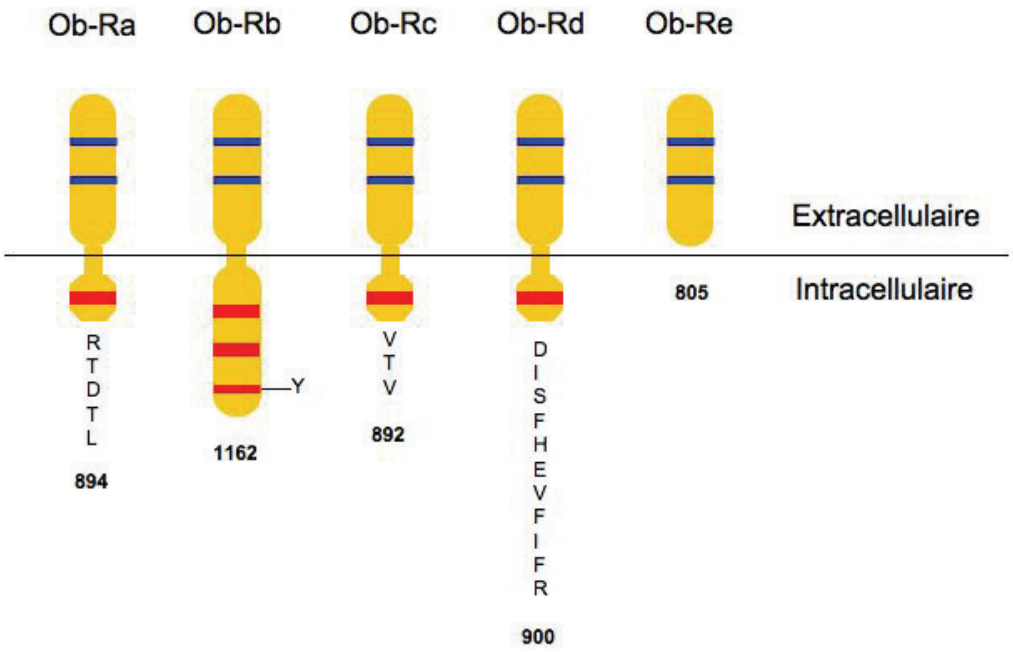


Figure 9. Présentation des différentes isoformes du récepteur de la leptine (d'après Friedman and Halaas 1998)

II.2.3 Mécanisme d'action

Deux voies neuronales principales sont impliquées dans l'action centrale de la leptine : la leptine active une voie catabolique représentée par les neurones à pro-opiomélanocortine (POMC) et « cocaïne and amphetamine-regulated transcript » (CART), et inhibe une voie anabolique représentée par les neurones à neuropeptide Y (NPY) et « agouti-regulated protein » (AgRP).

La fixation de la leptine sur les récepteurs des neurones à POMC provoque la sécrétion de l'α-melanocyte-stimulating hormone (αMSH) qui se fixe sur des récepteurs à mélanocortines (MC-R), en particulier sur MC-3R et MC-4R.

La fixation de la leptine sur les récepteurs des neurones à NPY inhibe la synthèse de ce dernier. Ces phénomènes contribuent à la diminution de la prise alimentaire et à l'augmentation de la dépense énergétique.

En situation de jeûne, il y a sécrétion de NPY et d'AgRP (antagoniste des récepteurs MC-3R et MC-4R) dans le noyau paraventriculaire et l'hypothalamus latéral, provoquant une augmentation de l'appétit, une diminution de la dépense énergétique et donc facilite l'installation de l'obésité (Ahima et coll., 1996; Mizuno et coll., 1998; Rahmouni et Haynes, 2001) (Figure 10).

Le fait d'invalider la voie de signalisation de la leptine entraîne donc un déséquilibre de la balance énergétique, en favorisant la prise alimentaire et en diminuant la dépense énergétique.

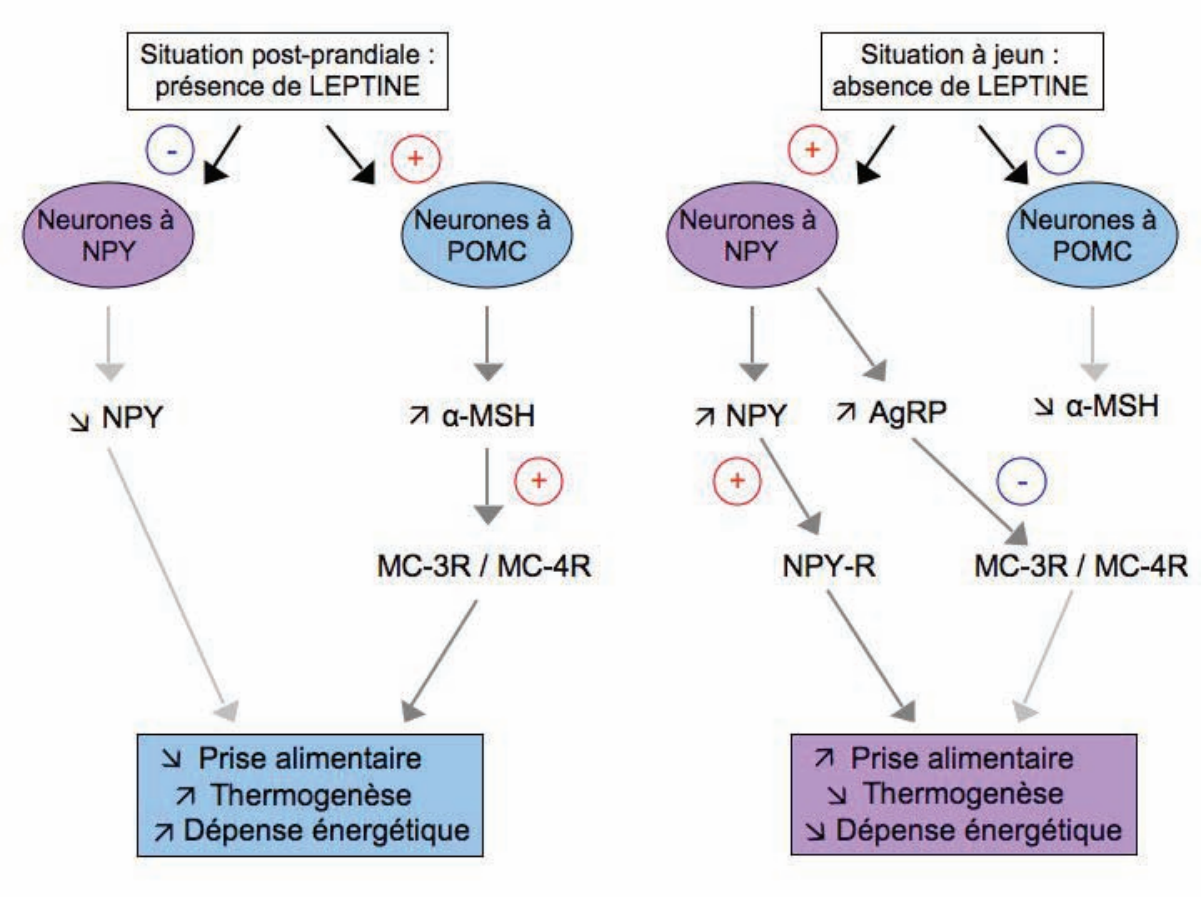


Figure 10. Schéma du mécanisme d'action de la leptine (d'après Friedman and Halaas, 1998).

II.2.4 Modèles animaux de syndrome métabolique

Plusieurs modèles murins de résistance à la leptine ou à son récepteur sont connus :

- le rat SHROB (spontaneous hypertensive obese rat), ayant une mutation spontanée du codon 763 du gène du récepteur à la leptine (fa^k), menant à l'absence d'expression de la protéine. Ces rats sont modèles de syndrome métabolique, avec hypertension et sans hyperglycémie à jeun.
- Le rat SHHF (spontaneously hypertensive, heart failure) porte la même mutation fa^k que les SHROB, et développe en plus du syndrome métabolique une insuffisance

cardiaque congestive. Ces rats sont modèles de syndrome métabolique, avec hypertension et diabète de type 2, en plus d'une insuffisance cardiaque.

- Le rat JCR :LA-cp (James C Russell corpulent) : la mutation fa^k a été introduite dans 2 souches standard différentes, SHR/N et LA/N. La souche JCR :LA-cp a été isolée par Russel et coll. et correspond à la souche LA/N après seulement 5 croisements. (Russell et coll., 1989a). En plus d'être modèle de syndrome métabolique, cette souche de rat est la seule à developper spontanément des lésions d'athérosclérose à environ 20 mois (Russell et coll., 1989a; Russell et coll., 1989b).
- Le rat Zucker et le rat ZDF : le rat Zucker, utilisé comme modèle dans cette étude, est plus largement développé ci-dessous. La souche ZDF (Zucker diabetic fatty) a été créée à partir de mâles Zucker obèses présentant une hyperglycémie à jeun, afin de créer un modèle de syndrome métabolique avec diabète de type 2.

Les modèles animaux ayant la voie de la leptine invalidée illustrent la résistance à la leptine observée chez des patients obèses. En revanche, chez l'homme, rares sont les cas où cette résistance est liée à une mutation. Cette différence peut représenter une limite dans l'utilisation de ces modèles où la résistance à la leptine est irréversible tandis que chez l'homme elle ne l'est pas. Hormis cette différence, la pathologie développée par les modèles décrits plus haut semble proche de la pathologie humaine, en particulier dans les modèles comprenant de l'hypertension artérielle.

Les modèles de syndrome métabolique induit par l'alimentation semblent plus représentatifs de la pathogenèse de ce syndrome chez l'homme. Cependant, l'apport calorique (notamment l'apport en graisses) nécessaire pour entraîner des troubles métaboliques doit être supérieur chez le rongeur, car ces modèles sont beaucoup moins sensibles que l'homme à l'apparition de troubles métaboliques.

Le développement du syndrome métabolique humain est multifactoriel ; il dépend non seulement de conditions environnementales particulières comme l'augmentation de l'apport calorique ou la sédentarité mais également de prédispositions génétiques. Une limite importante dans l'utilisation des modèles animaux serait également qu'au sein d'une même souche, le fond génétique des animaux est identique.

L'avantage des modèles invalidés pour la leptine est le changement de comportement observé, ce qui se rapproche le plus de la situation chez l'homme. En effet, la sensation de satiété n'existant plus, les rats sont alors hyperphagiques (Bray et York, 1972 ; Cruce et coll., 1974) ; les rats adaptent leur consommation de nourriture en fonction d'un poids « idéal » à atteindre. Ce poids augmente avec l'âge, et il est régulièrement plus élevé chez les Zucker obèses que chez les témoins (Gosselin et Cabanac, 1996). De plus, le goût est

également modifié chez le rat Zucker obèse ; Greenberg et coll. ont démontré que la préférence pour les graines des obèses passait par des mécanismes gustatifs (Greenberg et Weatherford, 1990), démontrant une implication comportementale de la mutation de la leptine. Concernant l'appétence, critère important chez l'homme, les données sur le rat Zucker sont plus divergentes. Par exemple, Enns et coll. démontrent que le libre choix d'aliment (choix entre soja, saccharine et lard) par l'obèse est qualitativement le même que celui des témoins (Enns et Grinker, 1983). Au contraire, Matsuo et coll. montrent qu'en situation de libre choix de nourriture entre protéines (caséine), glucides (sucrose) et graisses (huile hydrogénée de noix de coco), les rats obèses augmentent surtout leur prise de graisses par rapport aux témoins (Matsuo et coll., 1984).

Dans ce travail, le modèle de syndrome métabolique choisi est le rat Zucker. Ces rats présentent toutes les caractéristiques du syndrome trouvé chez l'homme, et ne présente pas de pathologies associées (insuffisance cardiaque, athérosclérose ou hyperglycémie) lorsqu'ils sont jeunes. De plus, malgré une mutation spontanée, la modification comportementale du rat Zucker en fait un bon modèle de facteur environnemental influençant la rigidité artérielle. Ainsi, l'étude permet de mettre en évidence uniquement les effets de l'obésité sur le phénotype artériel, et sur l'augmentation du risque cardiovasculaire associé au syndrome métabolique humain.

II.2.4.1 Le rat Zucker

En 1961, Zucker et coll. ont observé un phénotype obèse lié à une mutation spontanée apparue dans leur colonie de rats 13M (Zucker et Zucker, 1963) qui a été nommée fatty ou fa. Cette mutation autosomale récessive affecte le gène du récepteur de la leptine sur sa partie extracellulaire, mais elle est différente de celle retrouvée chez les rats SHROB, SHHF ou JCR (Yen et coll., 1977). Cette mutation, située au niveau du codon 269, entraîne un changement d'acide aminé (glutamine → proline) et la production d'une protéine tronquée (Iida et coll., 1996b; 1996a ; Takaya et coll., 1996). Lors d'expériences sur des cellules exprimant le récepteur muté ou non, il a été montré que les récepteurs mutés avaient une affinité plus faible pour la leptine, et que la transduction du signal était altérée (White et coll., 1997; Yamashita et coll., 1997). Ceci a été confirmé in vivo par Cusin et coll. qui ont montré que chez les rats Zucker, une injection intra-cérébroventriculaire de leptine entraîne une diminution du poids corporel durant les 6 jours suivant l'injection et une diminution du NPY au niveau du noyau arqué et du noyau paraventriculaire. En revanche, ces effets ont été observés à des doses jusqu'à 10 fois supérieures par rapport à celles utilisées chez le rat normal (Cusin et coll., 1996).

Les rats Zucker obèses (homozygotes pour la mutation) accumulent une quantité excessive de masse adipeuse durant les 3 premières semaines de vie en augmentant leur efficacité énergétique (Markewicz et coll., 1993; Meierfrankenfeld et coll., 1996) ; néanmoins, ils grandissent de la même façon que leurs contrôles les 22 premiers jours de leur vie (Truett et coll., 2000), ils ne sont pas visiblement obèses. Le taux de croissance des rats obèses augmente radicalement après le 22^{e} jour de vie (Truett et coll., 2000). Cette large augmentation du taux de croissance sur un seul jour dans le développement postnatal correspond au début d'une robuste hyperphagie chez les obèses, et est accompagnée par l'émergence de l'hyperinsulinémie, d'une tolérance anormale au glucose et d'une résistance périphérique à l'insuline (Lavaud et coll., 1996). Ces troubles sont parfois accompagnés d'une hyperglycémie.

Le facteur prédominant menant à la détérioration de l'état métabolique des rats Zucker est l'insulino-résistance associée à l'obésité de ces rats (Szocs et coll., 2008), qui font partie des caractéristiques générales de ce modèle. Le développement de la résistance à l'insuline s'effectuerait en deux phases. Tout d'abord, une sécrétion excessive d'insuline et une diminution de la clairance hépatique de cette hormone entraînerait l'hyperinsulinémie. La sécrétion excessive d'insuline pourrait être due à une augmentation de la sensibilité des cellules β pancréatiques et de l'activité du système nerveux parasympathique (Krief et Bazin, 1991). Sous l'action de l'insuline, la lipogenèse dans le tissu adipeux blanc est augmentée et entraîne une augmentation de la masse adipeuse (Argiles, 1989). Cependant, chez le jeune rat Zucker obèse, alors que la sensibilité à l'insuline est normale dans le tissu adipeux blanc, elle est réduite dans le muscle squelettique (Penicaud et coll., 1987).
La seconde étape est une désensibilisation progressive du tissu adipeux blanc et des tissus périphériques à l'insuline durant le vieillissement du rat Zucker obèse, menant à la résistance à l'insuline (Argiles, 1989). Parallèlement, les rats Zucker obèses développent une dyslipidémie (hypertriglycéridémie, hypercholestérolémie, augmentation des acides gras plasmatiques) (Szocs et coll., 2008).

II.2.4.2 Effets de l'insulino-résistance chez le rat Zucker

La résistance à l'insuline représente une anomalie métabolique commune, menant aux maladies cardiovasculaires.
L'insulino-résistance n'est pas simplement un problème de captation du glucose en réponse à l'insuline, mais un syndrome multifactoriel qui est associé à une dyslipidémie, une hyperinsulinémie, l'obésité, l'hypertension et l'athérosclérose (Kohler, 2002).

L'insulino-résistance est associée à des perturbations importantes des capacités sécrétoires du tissu adipeux. Plusieurs productions du tissu adipeux possèdent des impacts tissulaires et vasculaires non négligeables, en particulier sur l'endothélium (Rajala et Scherer, 2003). Les principales adipokines sécrétées par l'adipocyte sont la leptine et l'adiponectine. Elles stimulent la production de NO vasculaire et agissent sur la cellule endothéliale (Vecchione et coll., 2002; Chen et coll., 2003). La production la leptine est régulée par l'insuline (Boucher et coll., 2005). L'adiponectine, production stricte de l'adipocyte, exerce des effets anti-inflammatoires et protecteurs de l'intégrité vasculaire et cardiaque (Hug et Lodish, 2005). Ainsi, chez l'obèse, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires à tropisme vasculaire (TNFα, leptine, interleukine-6 (IL-6), IL-1β et IL-8) est augmentée alors que parallèlement les taux d'adiponectine sont réduits.

Les animaux obèses et insulino-résistants (rats Zucker fa/fa et rats JCR-LA-cp) sont connus pour être affectés par des dysfonctions vasculaires. Des études entreprises sur des vaisseaux (aorte et microvaisseaux) de rats Zucker fa/fa ont révélé des altérations des voies du signal insulinique. Un déficit de phosphorylation des substrats du récepteur à l'insuline-1 (IRS-1) a été décrit. Il est associé à la réduction de la phosphorylation et de l'activation des deux enzymes en aval d'IRS-1, la PI3K (phosphoinositol 3 kinase) et de la PKB/Akt (phosphokinase B / Akt) (Jiang et coll., 1999; O'Brien et coll., 2000). En revanche, cette insulinorésistance n'affecte pas la voie des Ras-MAPK.

Des études physiologiques ont montré que la fonction endothéliale mesurée par vasodilatation induite par l'insuline est réduite chez les patients insulino-résistants et diabétiques (Steinberg et coll., 1996), suggérant que les cellules vasculaires sont aussi résistantes à l'insuline pour certaines de ces actions physiologiques. D'autres effets de l'insuline, comme son action de facteur de croissance sur les CML, n'est pas affecté. Cela s'explique par la liaison de l'activation de PI3K à la production de NO, alors que l'activation de la voie Raf-MAPK (non affectée par l'insulino-résistance) est associée à la croissance des cellules vasculaires et l'expression de protéines de la MEC (Jiang et coll., 1999).

De façon similaire à l'insuline, l'adiponectine possède la capacité de stimuler la production de NO à travers l'activité de PI3K (Zeng et Quon, 1996; Zeng et coll., 2000). En effet, l'adiponectine peut augmenter et mimer les actions métaboliques de l'insuline en augmentant l'oxydation des acides gras (Fruebis et coll., 2001), le dépôt de glucose dans le muscle squelettique médié par l'insuline (Yamauchi et coll., 2001; Yamauchi et coll., 2002), aussi bien que diminuer la sortie du glucose hépatique.

Il est possible que l'adiponectine ait des actions directes ou indirectes sur l'endothélium vasculaire, et que ces actions peuvent être médiées par AMPK (adenosine monophosphate-

activated protein) ou la signalisation NFκB (nuclear factor κB). L'adiponectine pourrait avoir une action synergique avec l'insuline dans l'endothélium, comme cela se passe au niveau du foie (Berg et coll., 2001). De plus, la liaison de l'adiponectine aux cellules endothéliales a également été décrite (Ouchi et coll., 2000).

Le taux d'expression des récepteurs à l'adiponectine (AdipoR1 et AdipoR2) n'est pas trouvé réduit chez les rats Zucker obèses (Beylot et coll., 2006) (alors qu'il est réduit chez les souris ob/ob et db/db). Ainsi, le rôle exact des AdipoRs dans la résistance à l'insuline reste débattu et s'avère différent en fonction du modèle étudié et de la cause de l'insulino-résistance (Metais et coll., 2008).

L'augmentation de la réactivité des artères a été mise en évidence chez le rat Zucker obèse à partir de la 13^{e} semaine, ainsi qu'un remodelage vasculaire au niveau de artères de résistance et de l'aorte (Sista et coll., 2005). L'expression plus importante de protéines matricielles (fibronectine, collagène IV) ainsi qu'une augmentation de la tension développée chez les rats obèses suggèrent une hyper-rigidité artérielle avant l'âge de 20 semaines (Cox et Kikta, 1992).

II.2.5 Implication des acides gras libres dans le syndome métabolique et la fonction vasculaire

Une grande perturbation métabolique liée à l'insulino-résistance est une augmentation des acides gras libres plasmatiques (AGL) par la perte de l'effet antilipolytique de l'insuline (Gallagher et coll., 2010).

II.2.5.1 Définition des acides gras

En chimie, un acide gras est un acide carboxylique à chaîne aliphatique. Il est retrouvé dans les graisses animales et végétales, les huiles ou les cires sous forme estérifiée (Moussard, 2006). Les acides gras naturels possèdent une chaîne carbonée de 4 à 36 atomes de carbone.

En biochimie, les acides gras sont une catégorie des lipides qui comprend entre autres les acides gras et leurs dérivés (acides gras méthylés, hydroxylés, hydropéroxylés, etc.) et les éicosanoïdes. Ces derniers dérivent de l'acide arachidonique et ont souvent un rôle d'hormones.

Les acides gras diffèrent par la longueur de leur chaîne hydrocarbonée et par la présence éventuelle de doubles liaisons. La longueur des acides gras des cellules varie généralement entre 14 et 20 carbones. Un acide gras saturé est un acide gras dont tous les atomes de carbone sont saturés en hydrogène, que l'on retrouve dans les graisses « solides » telles que le beurre, ou dans les viandes grasses.
Un acide gras insaturé est un acide gras qui comporte une ou plusieurs doubles liaisons carbone-carbone, que l'on retrouve dans les huiles alimentaires (Karp et coll., 2004).

En biologie, les acides gras possèdent plusieurs fonctions (Karp et coll., 2004) :
- *Rôle métabolique* : les acides gras sont stockés sous forme de triglycérides (3 acides gras reliés à une molécule de glycérol) dans les adipocytes. La lipolyse ou β oxydation consiste à dégrader des acides gras en unités acétyl en produisant de l'énergie sous la forme d'ATP.
- *Rôle structural* : les acides gras servent à la synthèse d'autres lipides, notamment les phospholipides qui forment les membranes cellulaires. La composition en acides gras de ces phospholipides donne aux membranes leurs propriétés physiques (élasticité, viscosité).
- *Rôle de messager* : les acides gras sont les précurseurs de plusieurs messagers intra- et extracellulaires. Par exemple, l'acide arachidonique est le précurseur des eïcosanoïdes, hormones intervenant dans l'inflammation, la coagulation sanguine, etc.

II.2.5.2 Effets des acides gras sur les gros troncs artériels

Puisque les AGL sont augmentés dans le plasma de patients obèses, de nombreuses études se sont intéressées à l'effet de différents AGL sur la fonction vasculaire. Il a été démontré qu'une perfusion d'AGL dans un muscle réduit le recrutement des capillaires et la sensibilité à l'insuline chez l'homme sain ou obèse (de Jongh et coll., 2004).
Sur des cultures de CMLv humaines, il a été démontré que les AGL pouvait induire leur apoptose (Rho et coll., 2007; Artwohl et coll., 2009). D'autres études ont montré que l'acide oléique pouvait induire la prolifération (Yun et coll., 2006) ou la migration (Greene et coll., 2001) des CMLv en culture. Les voies de signalisations impliquées dans ces modifications sont des voies de l'inflammation telles que NFκB (Oberbach et coll., 2010) ou encore les voies ERK1/2, p38MAPK et Akt (Schauer et Reusch, 2009).
En complément de ces modifications spécifiques sur les CML, d'autres études montrent des modifications de la cellule endothéliale. Les AGL (acides palmitique, oléique et linoléique) augmentent les activités IKKβ, puis NFκB, menant à une inhibition de l'activation de la eNOS et de la production de NO induites par l'insuline (Kim et coll., 2005). Les voies p38MAPK et JNK sont également activées dans les CE (Jiang et coll., 2010). De plus,

l'acide palmitique induit la production de EROs via l'activation de la NADPH oxydase de façon PKC-dépendante, aussi bien dans les CML que dans les CE (Inoguchi et coll., 2000).

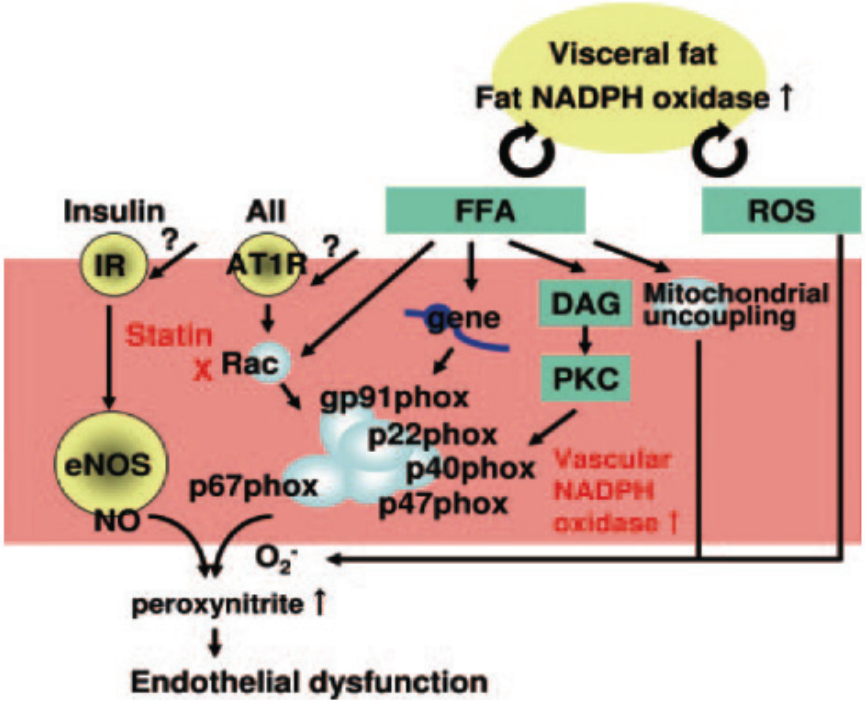


Figure 11. Schéma des voies de signalisation impliquées dans la lipotoxicité, entraînant la dysfonction endothéliale (d'après Chinen et coll., 2007)

A partir de tous ces travaux, le concept de « lipotoxicité » commence à emmerger, comme schématisé figure 11. La graisse viscérale est la principale source de diffusion des AGL et des EROs. Les AGL circulants induisent la production de EROs vasculaires via la sur-régulation de la NADPH oxydase vasculaire. Les EROs produits localement et les EROs dérivés des graisses réagissent de façon concomitante avec le NO, pour générer du peroxynitrite, et finalement nuisent à la vasodilatation GMPc-dépendante. Les statines peuvent bloquer la production de EROs induite par les AGL par l'inhibition de l'expression de la NADPH oxydase et par l'inactivation de Rac.

Il existe une controverse sur les effets des AGL sur l'activation de eNOS médiée par l'insuline et la signalisation de l'angiotensine Receptor de type 1 (AT1R) (Chinen et coll., 2007).

Il est ainsi possible que les AGL puissent participer à la dysfonction vasculaire observée chez les rats Zucker, et pourraient de ce fait être une cible thérapeutique envisageable.

III Facteurs génétiques : l'exemple de la mutation de Klotho

III.1 Introduction

Laurent et ses collaborateurs (2005) suggèrent que des facteurs génétiques, non pris en compte par les facteurs de risques cardiovasculaires classiques (âge, sexe, tabagisme, cholestérolémie…), pourraient influencer la rigidité pariétale artérielle. Les auteurs justifient cette idée en avançant trois arguments : d'une part, la corrélation entre rigidité pariétale artérielle et mortalité cardiovasculaire demeure significative après ajustement pour les facteurs de risques cardiovasculaires classiques (âge, sexe, pression artérielle…) (Laurent et coll., 2001a; Laurent, 2005) D'autre part, la valeur prédictive de survenue d'événements cardiovasculaires est plus élevée chez les patients considérés à faible risque cardiovasculaire (Boutouyrie et coll., 2002). Enfin, la rigidité pariétale aortique est directement influencée (partie I) par la composition et la structure de la paroi aortique. Or, il semble que des facteurs génétiques pourraient, au moins en partie, jouer un rôle sur ces éléments, même si, à ce jour, la plupart de ces mécanismes restent inconnus.

Par exemple, Yasmin et ses collaborateurs ont montré que l'activité de l'élastase était sous l'influence du polymorphisme génique de la MMP-9 et qu'ainsi, les variations génétiques de cette protéine, en modifiant la dégradation de l'élastine, pouvaient jouer un rôle sur la structure du réseau élastique et ainsi être impliquées dans le mécanisme d'augmentation de la rigidité de la paroi des artères (Yasmin et coll., 2006). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que des modifications de rigidité pariétale artérielle étaient liées à un polymorphisme pour un certain nombre de gènes, tels que ceux codant, par exemple, pour le récepteur AT_1 de l'angiotensine II (Benetos et coll., 1996; Benetos et Safar, 1996), le *plasminogen activator inhibitor-1* (Mourad et coll., 2005), ou encore les récepteurs de l'endothéline (Lajemi et coll., 2001), sans que le mécanisme pathogène sous-jacent n'ait été établi.

III.2 Polymorphisme de Klotho chez l'homme

Différentes études ont montrées que le gène Klotho pourrait contribuer à la pathophysiologie de la maladie coronaire. En effet, Arking et coll. ont rapporté une association entre la présence d'un variant fonctionnel du gène Klotho humain, KL-VS, et la maladie coronaire (Arking et coll., 2003; Arking et coll., 2005). Dans ces études, les sujets présentant l'allèle mutant montre un risque significativement important de maladie coronaire

comparé aux sujets porteurs de l'allèle sauvage. Par ailleurs, Arking *et coll*. montrent une association entre la présence de cet allèle et les taux d'HDL-cholestérol, la PAS, et l'augmentation du risque d'infarctus, suggérant ainsi l'existence d'une association entre le gène klotho et la pathologie athérosclérotique chez des sujets caucasiens (Arking et coll., 2002). Récemment, Rhee *et coll*. ont montré que les sujets présentant l'allèle T pour le polymorphisme C1818T présentaient une légère prévalence de maladies coronaires (Rhee et coll., 2006).

Dans une étude cas-contrôles réalisée sur une large population caucasienne et familiale (5028 sujets), Freathy *et coll*., n'ont pas trouvé de preuve démontrant que le variant fonctionel V352 du gène klotho constituerait un facteur de risque du diabète de type 2 (Freathy et coll., 2006). Ce résultat avait déjà été démontré par deux études précédentes (Arking et coll., 2002; Arking et coll., 2003).

L'existence d'une possible association entre d'autres polymorphismes du gène Klotho et la densité minérale osseuse a été étudié par Kawano *et coll*. dans des populations caucasienne et japonaise (Kawano et coll., 2002). Il ressort de cette étude que, dans la population japonaise, les mutations G-395A, C1818T et C2298T présentent une fréquence modérée ; de plus, les polymorphismes G-395A et C1818T sont significativement associées à la densité osseuse minérale. Plus récemment, Zhang *et coll*. ont trouvé une association significative entre le polymorphisme G-395A du gène Klotho et la présence/absence d'une arthrose de la main (Zhang et coll., 2007), tandis que Riancho *et coll*. ont montré que le génotype Klotho n'est pas associée à la densité minérale osseuse chez la femme préménauposée, mais l'est chez la femme postménauposée, suggérant ainsi que les variants du gène Klotho influencent le vieillissement osseux (Riancho et coll., 2007).

Ainsi, chez l'homme (86% d'homologie du gène KL avec celui de la souris), certains polymorphismes de Klotho sont associés à des pathologies semblables à celles retrouvées chez la souris KL $^{-/-}$, notamment ostéoporose, risque de maladies coronaires et infarctus. Pour comprendre les mécanismes responsables de ces pathologies, nous avons choisi d'étudier la souris déficiente pour le gène Klotho. Plus particulièrement, nous voulions caractériser le phénotype artériel de ces souris, encore mal connu, en nous intéressant aux souris hétérozygotes, qui se rapprochent au mieux du polymorphisme retrouvé chez l'homme.

III.3 La protéine Klotho

Le gène Klotho (kl), composé de 5 exons et 4 introns, est situé su le chromosome 13q12 chez l'homme et chez la souris (Kuro-o et coll., 1997). Dans l'exon 3, il existe un site

d'épissage alternatif menant à deux transcrits : une forme sécrétée et une forme transmembranaire de la protéine Klotho. La forme transmembranaire correspond à la longueur totale du transcrit, soit 1014 acides aminés (130 kDa). Le transcrit alternatif code pour la protéine sécrétée avec 550 acides aminés (65-70 kDa). La forme transmembranaire peut également être libérée dans la circulation sanguine après clivage enzymatique de sa partie transmembranaire (Matsumura et coll., 1998).

La protéine Klotho partage une homologie de séquence de 20-40% avec les β-glucosidases (enzymes impliquées dans la digestion des fragments osidiques de substrats) des bactéries et des plantes, ainsi qu'avec la lactase glycosylceramidase des mammifères (Tohyama et coll., 2004). Klotho possède également une homologie de structure avec la famille des β-glycosidases, mais sans l'activité enzymatique correspondante, ceci étant probablement dû à l'absence de résidus glutamate essentiels (Nabeshima, 2002).

Bien que l'inactivation de Klotho cause des troubles multiples liés au vieillissement dans presque tous les organes et les tissus, le gène klotho n'est exprimé que dans certains tissus. Chez la souris, Klotho est principalement exprimé dans le rein et le plexus choroïde du cerveau. Une faible expression est également trouvée dans la glande pituitaire, le placenta, le muscle squelettique, la vessie, le pancreas, le colon, l'oreille interne, les ovaires et les testicules (Kuro-o et coll., 1997; Kamemori et coll., 2002).

III.4 Compréhension actuelle des mécanismes d'action de Klotho

III.4.1 Klotho agit comme une hormone circulante

La protéine Klotho et ses métabolites agissent comme un facteur humoral, supporté par les faits suivants :

- la parabiose (connection chirurgicale entre 2 animaux, permettant l'échange des facteurs humoraux) entre des souris Klotho hétérozygote et sauvage permet un rétablissement complet de la fonction endothéliale de l'hétérozygote (Saito et coll., 2000)
- La forme transmembranaire clivée de la protéine Klotho existe dans le sang, l'urine et le fluide cérébrospinal (Imura et coll., 2004).
- Chez le rat Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF), l'apport du gène Klotho dans un plasmide réduit les dommages rénaux induits par l'angiotensine II, bien que l'expression de Klotho soit principalement observée dans le foie (Mitani et coll., 2002)

La protéine Klotho arrive dans la circulation sanguine de 3 façons différentes :

- *L'épissage alternatif* : le gène Klotho peut produire une forme sécrétée de la protéine, qui est libérée dans l'espace extracellulaire, puis dans la circulation sanguine.
- *Le clivage protéolytique* : la forme transmembranaire de Klotho peut être clivée par ADAM10 (A Disintegrin And Metalloprotease domain) et ADAM17, membres de la famille des métalloprotéinases, pour générer des fragments de 130 (α-cut) et 68 (β-cut) kDa. ADAM10 et ADAM17 peuvent toutes deux effectuer les 2 clivages, avec un système de rétro-action positive (l'insuline initie l'activation de ADAM10 et ADAM17. Cela augmente la libération des deux fragments de la protéine Klotho et d'autres substrats de ADAM10 et ADAM17, comme TNFα, dans le milieu. Les fragments de Klotho peuvent arrêter le système en bloquant la signalisation de l'insuline). Dans la majorité des cas, c'est le fragment de 130 kDa qui est produit (Chen et coll., 2007).
- *Les mouvements de Na^+/K^+-ATPase* : Klotho est exprimée dans les cellules rénales, mais n'est pas présente à la surface cellulaire. Récemment, Imura et coll (Imura et coll., 2007) ont rapporté que les formes immatures et matures de Klotho pouvait se lier à la Na^+/K^+-ATP-ase dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Ce complexe peut être recruté à la surface cellulaire, en réponse à la fluctuation extracellulaire de Ca^{2+}. Lorsqu'elle est à la surface, Klotho peut être clivée, et sécrétée dans la circulation (Imura et coll., 2007).

III.4.2 Klotho régule les voie de l'insuline et de l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1)

Klotho inhibe la voie de l'insuline / IGF-1. En effet, les souris KL-déficiente sont hypoglycémiques et extrèmement sensibles à l'insuline (Utsugi et coll., 2000). Au contraire, les souris surexprimant Klotho sont résistantes à l'insuline (chez les mâles) et à l'IGF-1 (chez les femelles), avec des taux de glucose à jeun normaux (Kurosu et coll., 2005).

Kurosu et coll. ont surexprimé le gène klotho chez la souris (taux circulants de Klotho doublés) et ont réussi à prolonger l'espérance de vie de ces animaux de 31% par rapport aux contrôles chez les mâles et de 19% chez les femelles (Kurosu et coll., 2005). Les auteurs ont démontré que l'augmentation de la durée de vie induite par Klotho était indépendante de la prise alimentaire et de la croissance, connues pour modifier à elles seules la longévité. Les souris surexprimant Klotho ont une glycémie et un métabolisme lipidique normaux, mais présentent une résistance à l'insuline (chez les mâles) et à l'IGF-I. Au niveau cellulaire, la liaison insuline/récepteur à l'insuline (IR) et la liaison IGF-I/ Récepteur à l'IGF-1 (IGF-1R) ne sont pas modifiées. En revanche, la protéine Klotho

supprime, de manière dose dépendante, l'autophosphorylation de ces récepteurs (état caractéristique de leur activation) en se liant à un récepteur putatif. Ainsi, les voies de signalisation intracellulaire dépendantes d'IR et d'IGF-1R sont inhibées, comme l'indiquent la baisse de l'activation des protéines IRS-1 et -2 et la diminution de l'association PI3K-IRS. Cet effet inhibiteur de la phosphorylation est spécifique de l'IR et de l'IGF-1R puisque d'autres récepteurs à activité kinase, comme l'EGFR (epidemial growth factor receptor) ou le PDGFR (récepteur au PDGF), ne sont pas affectés chez les souris surexprimant Klotho. Ainsi, klotho induit une résistance à l'insuline et à l'IGF-I (Figure 12).

Yamamoto et coll. montrent que Klotho intervient aussi en aval des récepteurs, dans la voie IGF/insuline (Yamamoto et coll., 2005). L'activation de la voie de l'insuline/IGF-1 mène à l'activation (par phosphorylation) de Akt, qui à son tour phosphoryle les facteurs de transcription FOXOs (forkhead box O, les principaux étant FOXO1, FOXO3a et FOXO4). Les FOXOs phosphorylés sont exclus du noyau et inactivés. Si le processus est interrompu, les FOXOs ne sont plus phosphorylés et pourront se fixer à des séquences promotrices. Par exemple, les FOXOs sont impliqués dans le contrôle de l'expression d'enzymes anti-oxydantes, dont la manganèse superoxyde dismutase (MnSOD, ou SOD2) et la catalase (Kops et coll., 2002). Ces enzymes permettent de réduire les taux cellulaires d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) et de protéger ainsi l'organisme contre cette cause majeure du vieillissement (Figure 12).

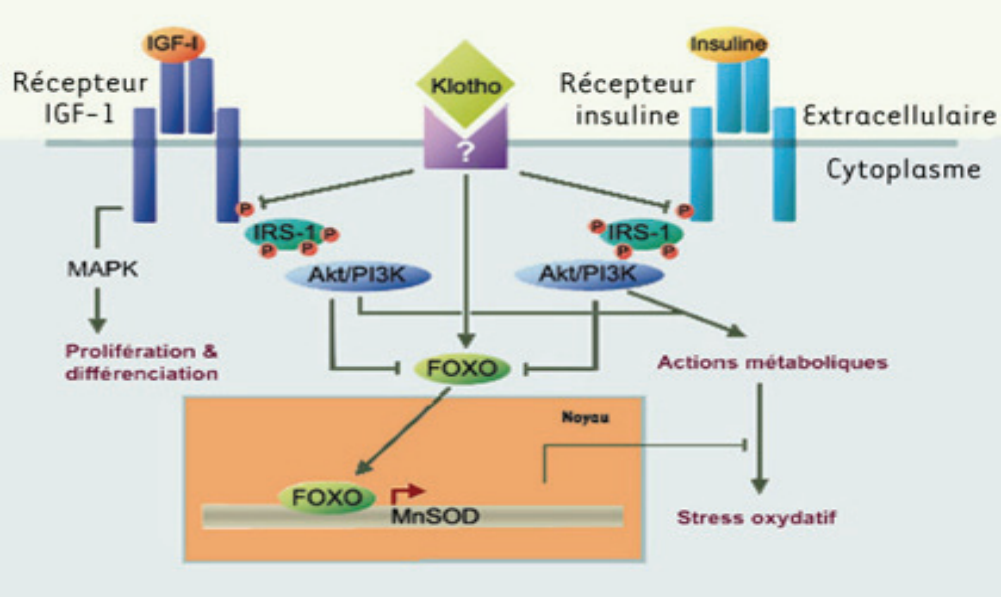


Figure 12. Rôle de Klotho dans les voies de signalisation de l'IGF et de l'insuline.
La liaison de Klotho à son récepteur putatif induit l'inhibition de la phosphorylation des récepteurs IGF et insuline, ce qui empêche l'activation du complexe IRS-1. PI3K et de la

cascade de signalisation en aval. D'autre part, klotho entraîne la translocation des facteurs de transcription FOXO dans la noyau, permettant l'expression d'enzymes anti-oxydantes comme la MnSOD (manganèse superoxyde dismutase). IRS-1 : insulin receptor substrate-1 ; PI3K : phosphatidyl inositol-3 kinase ; AKT : protéine kinase B/Akt ; MAPK : mitogen-activated protein kinase. (d'après Kappeler, 2006)

En conclusion, la protéine Klotho ralentit le vieillissement en inhibant la signalisation IGF/insuline et en augmentant la résistance au stress oxydatif.

III.4.3 Klotho agit comme un cofacteur essentiel de FGF23

Le fibroblast growth factor 23 (FGF23) est le seul membre de la famille des FGF qui présente une action hormonale : produit par l'os, il régule différentes fonctions rénales (inhibe la réabsorption osseuse des ions phosphates dans les tubules rénaux proximaux). Il a également été montré qu'il participe à l'homéostasie du phosphate et qu'il est un régulateur négatif de la synthèse de la vitamine D (Mohammadi et coll., 2005).
Les souris déficientes en FGF23 présentent un phénotype similaire à celui retrouvé chez la souris Klotho-déficiente : hyperphosphatémie, hypercalcémie, taux élevés de vitamine D (Razzaque et Lanske, 2006). Ceci suggère l'existence d'un mécanisme commun. L'association de la protéine Klotho aux récepteurs du FGF (FGFR) permet la fixation avec une haute affinité de FGF23 au complexe Klotho-FGFR (Kuro-o, 2006; Kurosu et coll., 2006 ; Urakawa et coll., 2006), et suggère ainsi que Klotho est un cofacteur essentiel de la voie de signalisation de FGF 23 (dont la fonction est totalement inhibée en absence de Klotho (Urakawa et coll., 2006)), voie de régulation de la vitamine D et des taux sériques de calcium et de phosphate (Figure 13).

Chez la souris, l'absence de Klotho perturbe la signalisation Klotho-FGF23 et mène à une surproduction de $1,25(OH)_2D_3$ (un métabolite actif de la vitamine D) (Kuro-o et coll., 1997). Des taux sériques élevés de $1,25(OH)_2D_3$ entraînent une absorption du phosphate et du calcium au niveau intestinal, menant à une hyperphosphatémie et une hypercalcémie chez ces mutants (Nabeshima, 2006). Cette surproduction de $1,25(OH)_2D_3$ est responsable des phénotypes de vieillissement accéléré chez la souris. La diminution de la vitamine D sérique, par carence alimentaire (Tsujikawa et coll., 2003) ou par ablation du gène codant pour la 1α-hydroxylase (enzyme essentielle pour la biosynthèse de $1,25(OH)_2D_3$) (Nabeshima, 2006) permet d'antagoniser les phénotypes du vieillissement accéléré, et d'allonger la durée de vie des souris déficientes pour Klotho.

De plus, l'élévation des taux sériques de calcium et de phosphate sont des prédispositions aux calcifications. Ainsi, les souris déficientes pour Klotho présentent de nombreuses calcifications ectopiques des vaisseaux sanguins et des tissus mous (Kuro-o et coll., 1997).

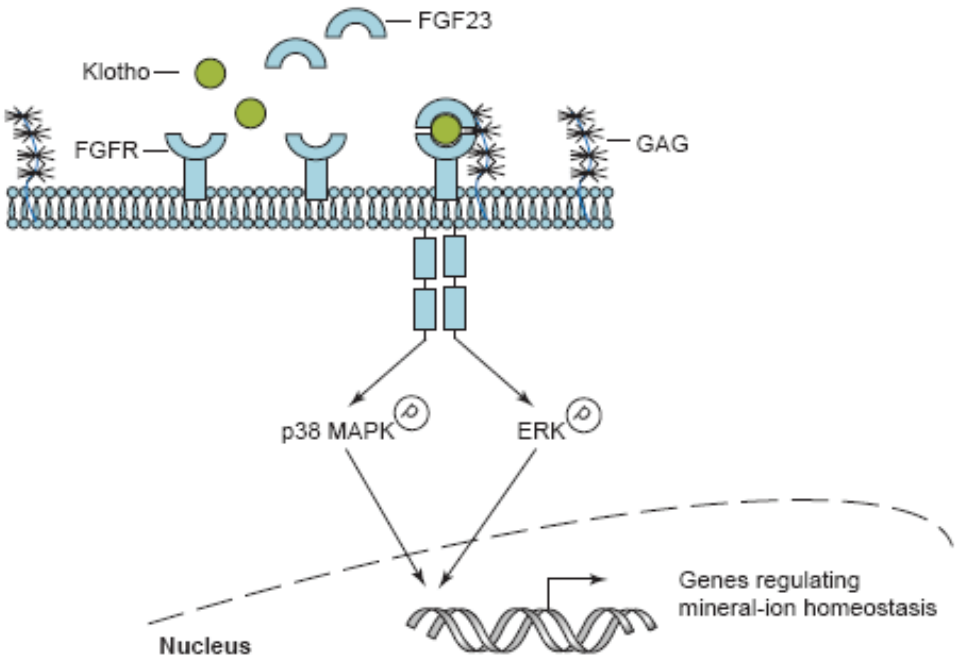


Figure 13. Interaction entre FGF23 et son récepteur.
FGF23 peut se lier avec différents récepteurs à FGF (FGFRs) avec des affinités différentes, et peut phosphoryler ERK et p38 MAPK pour induire l'expression de molécules qui régulent l'homéostasie ionique. Il faut remarquer que la liaison FGF23-FGFR utilise des glycosaminoglycanes (GAG) et Klotho comme co-facteurs (d'après Razzaque et Lanske, 2006)

III.4.4 Klotho agit comme une β-glucuronidase, et active les canaux TRPV5

Le canal calcique TRPV5 (transient receptor potential vanilloid 5) est exprimé dans les cellules épithéliales des tubules contournés distaux. Il fonctionne comme une porte d'entrée pour la réabsorption du calcium transcellulaire et participe au maintien de l'homéostasie du calcium. (Hoenderop et coll., 2005; Nijenhuis et coll., 2005) Bien que faible, l'activité β-glucuronidase de Klotho joue un rôle important dans l'activation des canaux TRPV5 (Chang et coll., 2005). En effet, Klotho, présente dans les urines, hydrolyse les résidus glucidiques présents du côté extracellulaire N-terminal de TRPV5, ce qui retient TRPV5 à la membrane plasmique. Cela augmente donc l'influx de Ca^{2+} dans les reins. Klotho est exclusivement co-exprimé avec TRPV5 dans les cellules épithéliales des tubules

contournés distaux, ce qui forme une région spécialisée du néphron, où la réabsorption transépithéliale de Ca^{2+} est activement régulée (de Groot et coll., 2008). Cette co-localisation est considérée importante pour le contrôle de l'homéostasie du calcium.

III.4.5 Klotho est une hormone « anti-vieillissement »

Wnt est l'un des facteurs sécrétés essentiels à la prolifération et l'entretien des cellules souches. Cependant, la stimulation chronique de la signalisation Wnt peut conduire à un épuisement et une déplétion rapide de ces cellules. Le dysfonctionnement de la voie de signalisation Wnt mène à la sénescence cellulaire (les cellules deviennent quiescentes, ne se divisent plus), mécanisme contribuant au processus de vieillissement. (Kirstetter et coll., 2006; Scheller et coll., 2006) Il a été démontré que Klotho pouvait se lier à de multiples isoformes de Wnt, empêchant ainsi la liaison avec son récepteur, et l'activation de la voie de sénescence. Cela explique plusieurs phénotypes de vieillissement observés chez la souris déficiente pour Klotho. Par exemple, l'allopéthie (perte des poils) peut être expliquée par la réduction du nombre de cellules souches épidermiques. Ces cellules présentent une activité plus élevée de la voie Wnt, avec une augmentation d'un marqueur de la sénescence cellulaire, la β-galactosidase (Figure 14).

Klotho est ainsi une protéine circulante possédant plusieurs modes d'actions, sur différentes voies de signalisation, avec des effets sur la plupart des organes. La figure 14 résume les voies de signalisation dans lesquelles Klotho est impliquée.

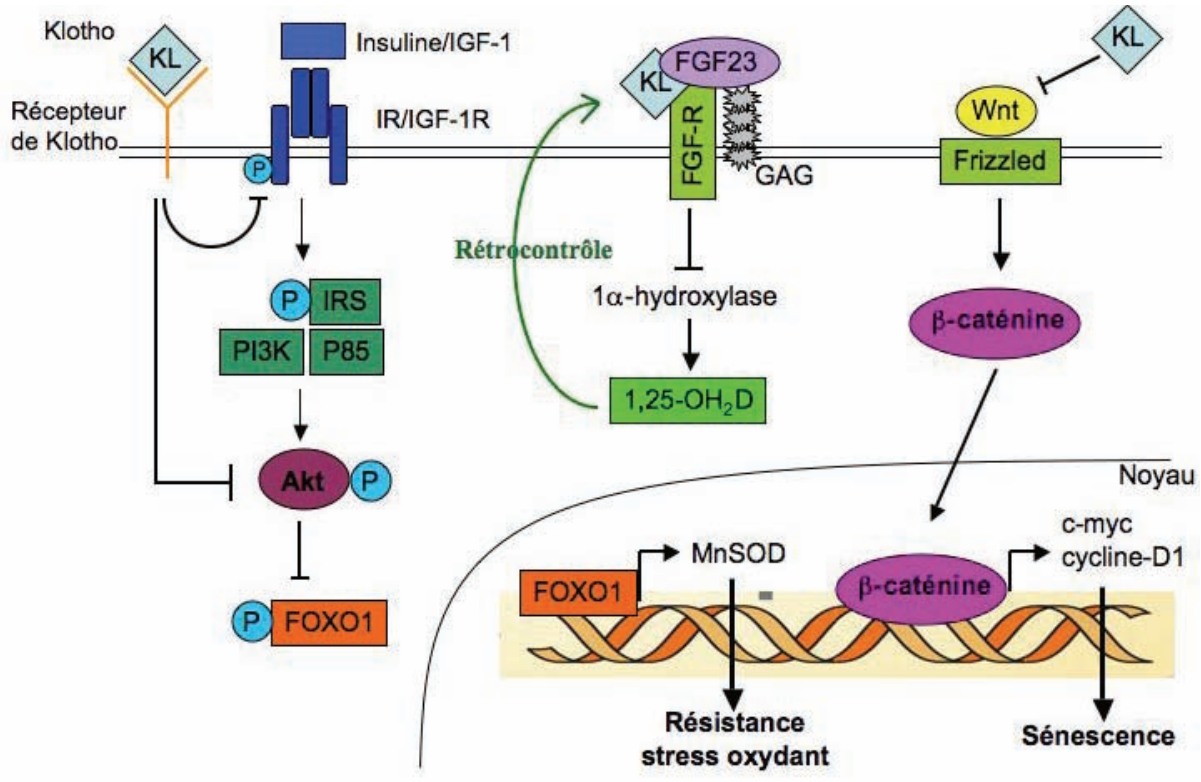


Figure 14. Schéma récapitulatif des mécanismes connus de Klotho

III.5 Implication du stress oxydant

Nous venons de voir que Klotho peut agir sur les défenses anti-oxydantes des cellules, notamment sur l'expression de la SOD. Pour mieux comprendre ces implications, ce paragraphe rappelle brièvement le stress oxydant, ses effets cellulaires et les principaux mécanismes de défense.

III.5.1 Définition

Le stress oxydant radicalaire est l'un des facteurs qui participent à l'installation de dysfonctionnements cellulaires. Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre les mécanismes pro-oxydants et anti-oxydants, entraînant des dommages cellulaires irréversibles (Beckman et Ames, 1998). Il est favorisé par divers agents aussi bien endogènes (métabolisme, inflammation, cycle rédox) qu'exogènes (radiations UV et ionisantes, tabagisme, alcool). Les dommages provoqués par le stress oxydant atteignent aussi bien l'ADN (ruptures de brins, mutations) que les lipides (peroxydation) et les protéines (oxydation, dénaturation) (Inoue, 1994). L'ensemble de ces évènements entraîne le développement d'altérations cellulaires qui peuvent aboutir à des perturbations de fonctionnement de certains organes. Le stress oxydant n'entraîne pas seulement une

toxicité cellulaire, il est capable de générer au niveau vasculaire des signaux intracellulaires pouvant conduire à la croissance, l'apoptose ou la survie des cellules.

Les espèces radicalaires les plus importantes sont celles de l'oxygène (EROs). L'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ issu de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire est produit par presque toutes les cellules en aérobie, moyennant un apport d'énergie, ou en présence d'enzymes (NADPH ou xanthine oxydase) et est susceptible de donner lieu à des réactions radicalaires (Moussard, 2006). Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2, produit par la dismutation de l'anion superoxyde (par la superoxyde dismutase, SOD), ou par la réduction de l'oxygène a la propriété de traverser les membranes biologiques (Figure 16). Il possède un fort pouvoir oxydant et est capable, en présence de métaux de transition (Fe^{2+}, Cu^{2+}), de générer le très réactif radical hydroxyle $^{\cdot}OH$. Le monoxyde d'azote NO est produit à partir de la L-arginine sous l'action des NO-synthases (NOS), en présence d'oxygène et de cofacteurs. De part ses propriétés lipophiles et hydrophiles et par sa demi-vie relativement longue, le NO est capable de diffuser largement dans l'environnement cellulaire (Pacher et coll., 2007). Le NO est impliqué dans de nombreuses réactions d'oxydo-réduction : il peut réagir avec l'oxygène pour donner des nitrates, ou avec certaines espèces radicalaires telles que l'anion superoxyde pour former l'anion peroxynitrite $ONOO^-$ (Pacher et coll., 2007) (Figure 15).

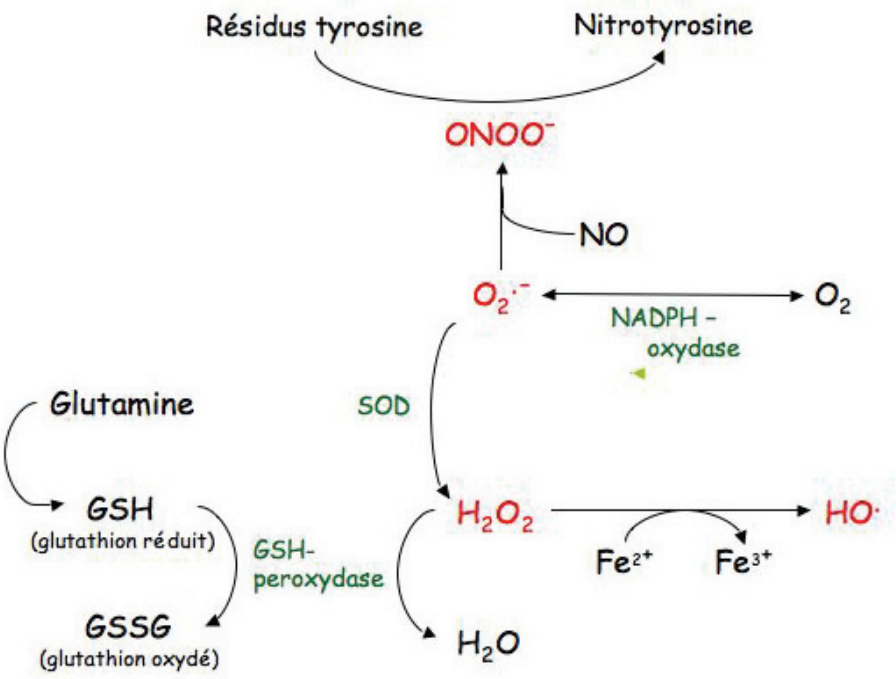


Figure 15. Schéma de formation et catabolisme des radicaux libres (d'après Moussard, 2006)

III.5.2 Systèmes de défense contre les radicaux libres

Les effets potentiellement délétères des espèces radicalaires sont contrôlées par la présence de systèmes de protection efficaces, les anti-oxydants, qui maintiennent les EROs à de faibles concentrations. Ces systèmes peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques. L'équilibre entre la production de radicaux libres et les défenses antioxydantes permet de préserver l'intégrité de la cellule (Aitken et Fisher, 1994).

Les superoxydes dismutases (SOD) catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), empêchant la génération du peroxynitrite. Cette enzyme doit être couplée à des enzymes qui dégradent le H_2O_2, comme les catalases ou les glutathion peroxydases, afin d'éviter l'augmentation des concentrations en H_2O_2 qui peut induire la formation de radical hydroxyle (Moussard, 2006). Les catalases sont des enzymes localisées à l'intérieur des peroxysomes qui permettent de transformer le H_2O_2 en oxygène moléculaire et en eau. Les glutathion peroxydases (GPx) sont des enzymes tétramériques à sélénium, cytoplasmiques et mitochondriales, qui peuvent réduire le H_2O_2 en eau, en utilisant les capacités réductrices du couple glutathion / glutathion disulfure (Moussard, 2006). Le glutathion est un tripeptide qui, sous sa forme réduite (GSH), agit comme antioxydant. Les fonctions du GSH incluent le maintien des thiols des protéines et de certains composés sous leur forme réduite, comme les vitamines C ou E. Le GSH est un composé piégeur pouvant réagir avec l'hydroxyle ou un peroxyde pour donner le radical thyil (GS.), pouvant lui-même réagir avec l'oxygène et entraîner une série de réactions, les radicaux formés pouvant se recombiner en glutathion disulfure, stoppant ainsi la réaction radicalaire en chaîne (Moussard, 2006). Le glutathion joue un rôle majeur dans la protection de l'organisme contre les radicaux libres, sa déplétion est donc susceptible d'entraîner un stress oxydant important.

III.6 Phénotypes de la souris déficiente pour Klotho

En 1997, Kuro-o et coll. décrivent une souris ayant une faible espérance de vie (deux mois en moyenne, au lieu de 24), un vieillissement accélérée et des pathologies semblables à celles observées chez l'homme âgé : athérosclérose, ostéopénie, calcifications ectopiques et emphysème pulmonaire. Cette souris homozygote, nommée *kl/kl*, est en réalité un mutant sévèrement hypomorphe, c'est-à-dire que la mutation conduit à l'expression d'une protéine qui conserve une partie de son activité (Kuro-o et coll., 1997).

En 2003, Tsujikawa et al mettent au point une nouvelle mutation du gène klotho. Ils l'inactivent totalement en insérant une cassette dans la partie codante du gène. Les souris

mutantes homozygotes n'expriment plus du tout la protéine Klotho, ce sont des mutants nul. Elles seront nommées *kl*$^{-/-}$ pour les distinguer des souris *kl/kl*. Mis à part la mutation, l'étude de Tsujikawa affirme que les phénotypes des deux souches sont très similaires (Tsujikawa et coll., 2003).

Parmi les différents mécanismes présentés, la voie du FGF23 semble la plus importante. La normalisation du taux de vitamine D chez des souris *kl*$^{-/-}$ ou Fgf23$^{-/-}$ après alimentation sans vitamine D ou inhibition (knockout) de l'α-1-hydroxylase entraîne l'annulation du phénotype progéroïde (Tsujikawa et coll., 2003; Nabeshima, 2006). Parallèlement, les souris *kl*$^{-/-}$ ayant une alimentation dépourvue en vitamine D ont une durée de vie plus longue comparées à celle de souris *kl*$^{-/-}$ IRS hétérozygotes. Ainsi, la normalisation par une alimentation sans vitamine D de l'hypersensibilité à l'insuline chez la souris *kl*$^{-/-}$ suggère que la réponse à l'insuline est secondaire à une altération du métabolisme minéral. (Bellino, 2006)

Un phénotype supplémentaire de la souris *kl/kl*, secondaire au métabolisme de la vitamine D, correspond à des calcifications ectopiques et vasculaires. De nombreux organes sont touchés : l'estomac, les bronches, le plexus choroïde, la peau, les testicules et le muscle cardiaque. Au niveau vasculaire, l'aorte présente des calcifications médiales étendues, tout comme les artères de résistance, qui montrent également un épaississement intimal. Ces calcifications apparaissent vers 4 semaines et s'étendent avec l'âge (Kuro-o et coll., 1997).

Plusieurs études se sont intéressées à ce caractère. Deux études similaires, de Saito et coll (Saito et coll., 1998) et Nagai et coll (Nagai et coll., 2000) rapportent que chez les souris homozygotes, la calcification de l'aorte est si importante qu'elle montre une absence complète de contraction à la noradrénaline ou de dilatation à l'acétylcholine. Les souris Kl+/- présentent un phénotype intermédiaire entre les Kl+/+ et les Kl-/- (Figure 16). Ces travaux démontrent également que Klotho améliore la production de NO par des dosages urinaires de NO_2^- et NO_3^- (des métabolites du NO) après une période de parabiose entre des souris Kl+/+ et Kl+/-.

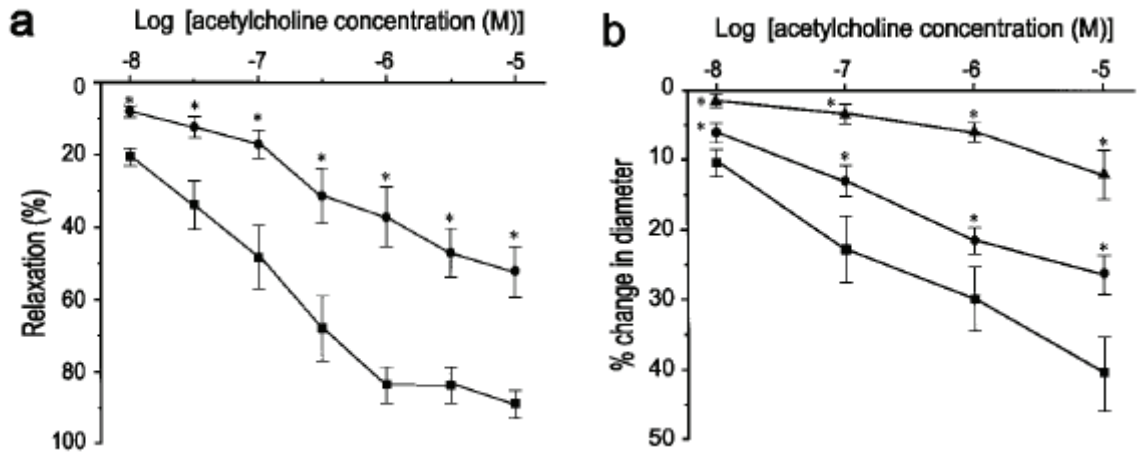


Figure 16. Vasodilatation endothélium-dépendante en réponse à l'acétylcholine chez la souris Klotho.
(A) Relaxation endothélium-dépendante de l'aorte. La relaxation putative maximale est considérée comme le niveau de référence avant la pré-contraction par la noradrénaline. La réponse à chaque concentration est exprimée en pourcentage de la relaxation maximum. Carrés, souris Kl+/+ (n=7 ; 3 mâles, 4 femelles) ; Cercles, souris Kl+/- (n=7, 4 mâles, 3 femelles) *p< 0.05 versus souris Kl+/+ par un test T.
(B) Dilatation endothélium-dépendante des artérioles. Le changement de diamètre (%) des artérioles est montré en réponse à l'acétylcholine. Carrés, souris Kl+/+ (n=7) ; Cercles, souris Kl+/- (n=7) ; triangles, souris homozygotes Kl-/- (n=7). *p < 0.05 versus souris Kl+/+ par ANOVA. (d'après Saito et coll, 1998).

Les effets vasculaires de Klotho ont également été étudiés sur des modèles de rats hypertendus après injection du gène klotho dans un adénovirus. Saito et coll ont montré chez le rat OLETF (hypertendu, obèse et dyslipidémique) que l'injection de Klotho pouvait réduire l'hypertension artérielle et améliorer la dysfonction endothéliale via une augmentation de la production de NO (Figure 17) (Saito et coll., 2000). Wang et coll ont également montré chez le rat SHR que l'injection de Klotho permettait une diminution de la pression artérielle et une diminution de l'activité de la NADPH oxydase, qui est une source importante de EROs (Wang et Sun, 2009).

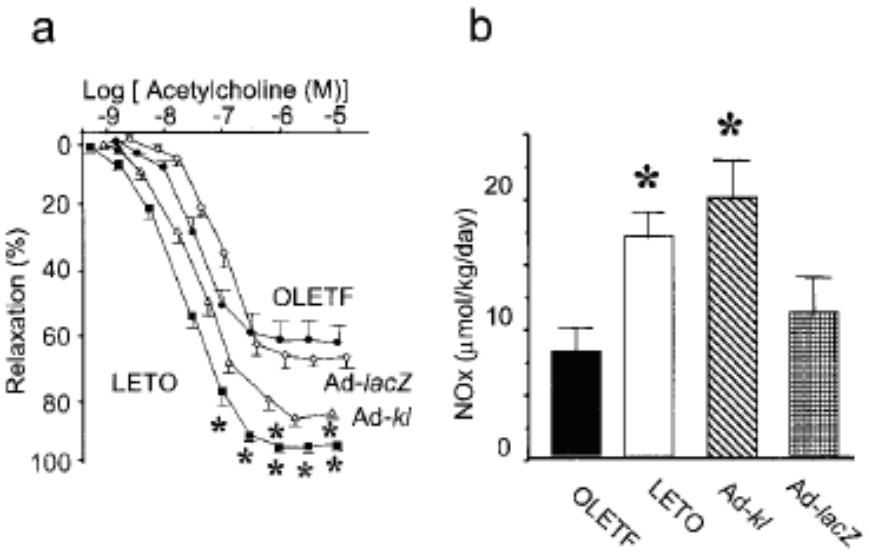


Figure 17. Vasodilatation endothélium-dépendante et métabolites du NO chez les rats OLETF.
(A) Relaxation endothélium-dépendante de l'aorte en réponse à l'acétylcholine. La transfection du gène klotho (Ad-kl) a pour conséquence la restauration de la relaxation induite par l'acétylcholine chez les rats OLETF, mais il n'y a pas de changement chez les rats OLETF transfectés avec le gène de LacZ (Ad-lacZ). *p < 0.05 versus les rats OLETF.
(B) Les métabolites du NO mesurés dans les urines sont significativement augmentés chez les rats OLETF après la transfection du gène klotho. *p < 0.05 vs rats OLETF.
(Traitement : injection dans la jambe 1x/sem pendant 3 sem ; LETO = contrôle maigre du OLETF). (d'après Saito et coll., 2000)

Le mécanisme par lequel Klotho permet une synthèse de NO, ou du moins une meilleure biodisponibilité, n'est pas encore clairement identifié. Klotho pourrait réguler la eNOS (Nakamura et coll., 2002), permettant une plus grande production de NO, mais Klotho pourrait également agir sur la production de EROs (par la diminution de l'activité de la NADPH oxydase), permettant un ralentissement de la métabolisation du NO (Wang et Sun, 2009).

Malgré ces quelques pistes, peu d'études s'intéressent au phénotype artériel des souris Klotho. A ce jour, aucune étude n'est publiée sur la rigidité artérielle de ces souris. De plus, très peu d'études s'intéressent au phénotype artériel des souris hétérozygotes Kl+/-, qui se rapprocheraient le plus des variants fonctionnels retrouvés chez l'homme. La vérification des hypothèses mécanistiques avancées chez le rat serait intéressante à tester chez la souris.

HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

Ce travail a pour objectif de caractériser l'état des gros troncs artériels, et d'étudier les manifestations du vieillissement artériel dans deux modèles animaux. Dans les deux parties de ce travail de thèse, nous avons insisté sur la durée des études (les animaux sont caractérisés à un âge avancé), avec une logique de suivi, avec un instantané à deux âges différents pour chaque modèle. Pour les deux modèles caractérisés, nous avons étudié l'impact du stress oxydant sur l'apparition des manifestations du vieillissement artériel

→ Un défi essentiel est de comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'apparition de la dysfonction artérielle et de la rigidité pendant le cours naturel du vieillissement, de l'obésité, ou de l'association des deux.
Le modèle du rat Zucker imite le syndrome métabolique humain et représente un outil important pour la compréhension de la physiopathologie des complications cardiovasculaires, permettant l'étude des interactions entre l'adiposité viscérale et le vieillissement.
Le rat Zucker obèse affiche de nombreux aspects de dysfonctionnement métabolique, telles que la résistance à l'insuline, l'hypertension, des taux augmentés de lipides et une obésité marquée (Van Zwieten et coll., 1996). À notre connaissance, aucune étude n'a été publiée sur la fonction vasculaire chez des rats obèses en fin de vie.
Ainsi, notre objectif est d'évaluer l'impact de l'obésité et des troubles métaboliques associés sur des altérations liées à l'âge de la rigidité et de la fonction artérielle, avec une attention particulière accordée à la participation des AGL dans le processus. Nous avons étudié des rats Zucker obèses (OZR) "très vieux" (80 semaines d'âge) et leurs contrôles maigres (LZR) de même souche génétique, que nous avons comparés à des OZR et des LZR "adulte" âgés de 25 semaines. Nous démontrons que le vieillissement, l'obésité et les interactions de ces deux facteurs influencent la structure et la fonction vasculaire, un phénotype qui pourrait dépendre de la réactivité artérielle aux AGL de manière âge- ou obésité-dépendante.

→ Un des problèmes majeurs pour développer de nouvelles approches thérapeutiques contre la rigidité des gros troncs artériels est l'absence de modèles animaux spécifiques de vieillissement artériel accéléré présentant les phénotypes de la rigidité artérielle humaine comme une hypertension systolique. En effet, les modèles classiques (rats SHR, Dahl) ne présentent pas nécessairement un vieillissement accéléré. De plus, des difficultés telles que des études de courte durée ou des animaux jeunes sont des limites importantes car les manifestations du vieillissement artériel se développent à un âge tardif.

Les souris Kl-/- présente une augmentation des taux circulants de vitamine D active, et une diminution des capacités anti-oxydantes ; ces modifications pourraient entraîner, dans certaines conditions, un vieillissement accéléré de la paroi artérielle chez la souris Kl-/- et Kl+/-. Ainsi, l'étude du phénotype artériel de la souris Kl-/-, mais aussi de la souris Kl+/-, à différents stades du processus de vieillissement, permettra de préciser le développement d'un vieillissement artériel accéléré dans ce modèle.

Nous avons choisi de caractériser le phénotype artériel des souris Kl+/- à deux âges : 6 mois et 12 mois, en comparaison de leurs contrôles Kl+/+ aux mêmes âges. L'étude des souris Kl-/- n'a pas été possible pour deux raisons principales : ces souris ne survivent pas jusqu'aux âges étudiés, et les expérimentations fonctionnelles *in vivo* tels que les mesures invasives d'échotracking et de VOP n'ont pas été techniquement possibles sur des animaux aussi petits (8g en moyenne).

MATERIEL ET METHODES

I Etude sur les rats Zucker

I.1 Animaux

Les rats Zucker utilisés pour cette étude sont issus de l'élevage de notre laboratoire. Les animaux ont été hébergés dans notre animalerie selon les conditions d'élevage en vigueur (température 22-24°C, humidité 55-60%, cycles jour-nuit de 12h, alimentation standard et boisson à volonté). Cette souche de rat est disponible sous trois génotypes (fa/fa, FA/fa et FA/FA) et deux phénotypes puisque seul le génotype fa/fa génère des animaux obèses, les deux autres sont dits « leans » ou « maigres ». Tous les animaux utilisés dans nos protocoles sont de génotypes respectifs fa/fa pour les obèses et FA/fa ou FA/FA pour les maigres.

Les expériences ont été réalisées en accord avec les recommandations de la communauté européenne (directives 86/609/EEC) et du comité d'éthique de l'INSERM.

L'étude comprend 44 mâles obèses (rats Zucker obèses, OZR) et 46 mâles maigres (rats Zucker maigres, LZR), âgés de 25 et 80 semaines. Les mesures de rigidité artérielle ont été effectuées sur 37 LZR et 36 OZR. Les mesures de la biochimie sanguine ont été faites sur une partie de ces rats (19 LZR et 18 OZR). Une partie des aortes thoraciques de ces rats ont été utilisées pour la quantification biochimique de la matrice extracellulaire (27 LZR et 23 OZR), et l'autre partie pour les Western blots (18 LZR et 18 OZR). Les expériences de réactivité vasculaire ont été effectuées sur les artères carotides de 9 LZR et 8 OZR.

I.2 Mesure de la pression artérielle chez l'animal éveillé

Les mesures hémodynamiques réalisées *in vivo* chez l'animal conscient sont effectuées par pléthysmographie. Cette méthode permet d'étudier les variations du volume sanguin dans un organe en utilisant des techniques de mesure de déplacement de volume.

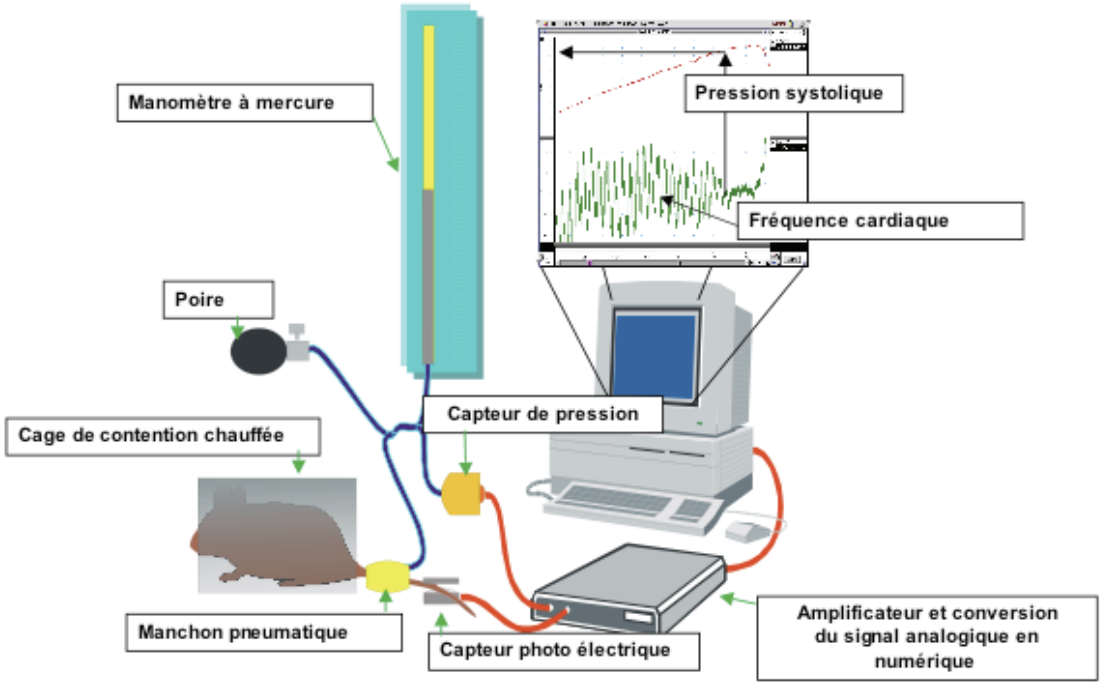


Figure 18. Schéma de la technique « tail-cuff » de mesure de pression artérielle chez les souris éveillées, à partir de l'artère caudale.

Les rats sont placés dans une boîte de contention sur une plateforme chauffante (Hatteras Instruments, Blood Pressure Analysis System, model SC-1000), afin de s'assurer de la bonne dilatation des artères périphériques. La pression est mesurée sur l'artère caudale: la queue de l'animal est passée à travers un manchon gonflable (ballonnet) qui comprime l'artère caudale lorsque la pression dans ce ballonnet augmente. Lorsque la pression du ballonnet est égale à la pression systolique de l'artère, celle-ci est écrasée empêchant la circulation du sang. L'arrêt de la circulation du sang dans l'artère caudale est détecté par un capteur photoélectrique et est interprété par l'enregistreur comme étant la valeur de la pression systolique (Figure 18).

Afin d'obtenir des signaux reproductibles, les animaux sont entraînés pendant une semaine avant les mesures de pression artérielle afin d'éviter les éventuelles modifications des paramètres physiologiques induits par le stress de la boîte de contention. Seules les mesures obtenues après cette semaine d'entraînement sont prises en compte pour les calculs déterminant la pression artérielle.

I.3 Fonction vasculaire

I.3.1 Evaluation de la rigidité artérielle in vivo

I.3.1.1 Préparation de l'animal

Les rats sont anesthésiés avec de l'isoflurane (3,5%, débit d'oxygène 1,5L). Un cathéter de polyéthylène (PE-50, longueur 15 cm, diamètre interne 0,58 mm, diamètre externe 0,96 mm ; BioSeb, France) est introduit dans l'artère carotide gauche puis l'artère carotide droite est recouverte de gel échographique. Un deuxième cathéter (PE-10, longueur 15 cm, diamètre interne 0,28 mm, diamètre externe 0,61 mm ; BioSeb, France) est alors introduit dans l'aorte abdominale via l'artère fémorale gauche. Les deux cathéters sont reliés à des capteurs de pression (P23XL, Becton Dickinson). Les mesures des pressions systoliques (PAS) et diastolique (PAD) nous permettent de déterminer la pression pulsée (PP, qui correspond à la différence algébrique PAS-PAD) ainsi que la pression artérielle moyenne (PAM, qui correspond à PAD+PP/3).

I.3.1.2 Etude des propriétés mécaniques artérielles : echotracking de l'artère carotide

Les paramètres mesurés sont les variations de pression et de diamètre de l'artère au cours du cycle cardiaque. Ces variations systolo-diastoliques du diamètre carotidien sont mesurées *in vivo* chez l'animal par des techniques utilisant les ultrasons, dérivées de l'échographie, complétées par des méthodes de poursuite d'échos (echotracking). Ces techniques ont déjà été décrites et validées chez le rat (Osborne-Pellegrin et coll., 2010) et chez la souris (Louis et coll., 2007).

Une sonde ultrasonique est positionnée au dessus de la carotide primitive droite de l'animal anesthésié afin d'enregistrer les échos vibratoires des parois internes et externes de l'artère, visualisées sur un écran oscilloscopique (Philips PM 3057) (Figure 19). Les distances entre les interfaces acoustiques « sang-paroi artérielle» sont alors mesurées au cours du cycle cardiaque et permettent ainsi de déterminer le diamètre et la surface de la lumière artérielle *in vivo* (Labat et coll., 2001). Les variations pulsatiles du diamètre et de la pression sont mesurées pendant trois périodes successives de 4 secondes. A l'aide de ces deux mesures simultanées, la courbe pression-diamètre est reconstituée dans l'intervalle de pression systolo-diastolique selon une fonction arc-tangente décrite par trois paramètres indépendants α, β, γ.

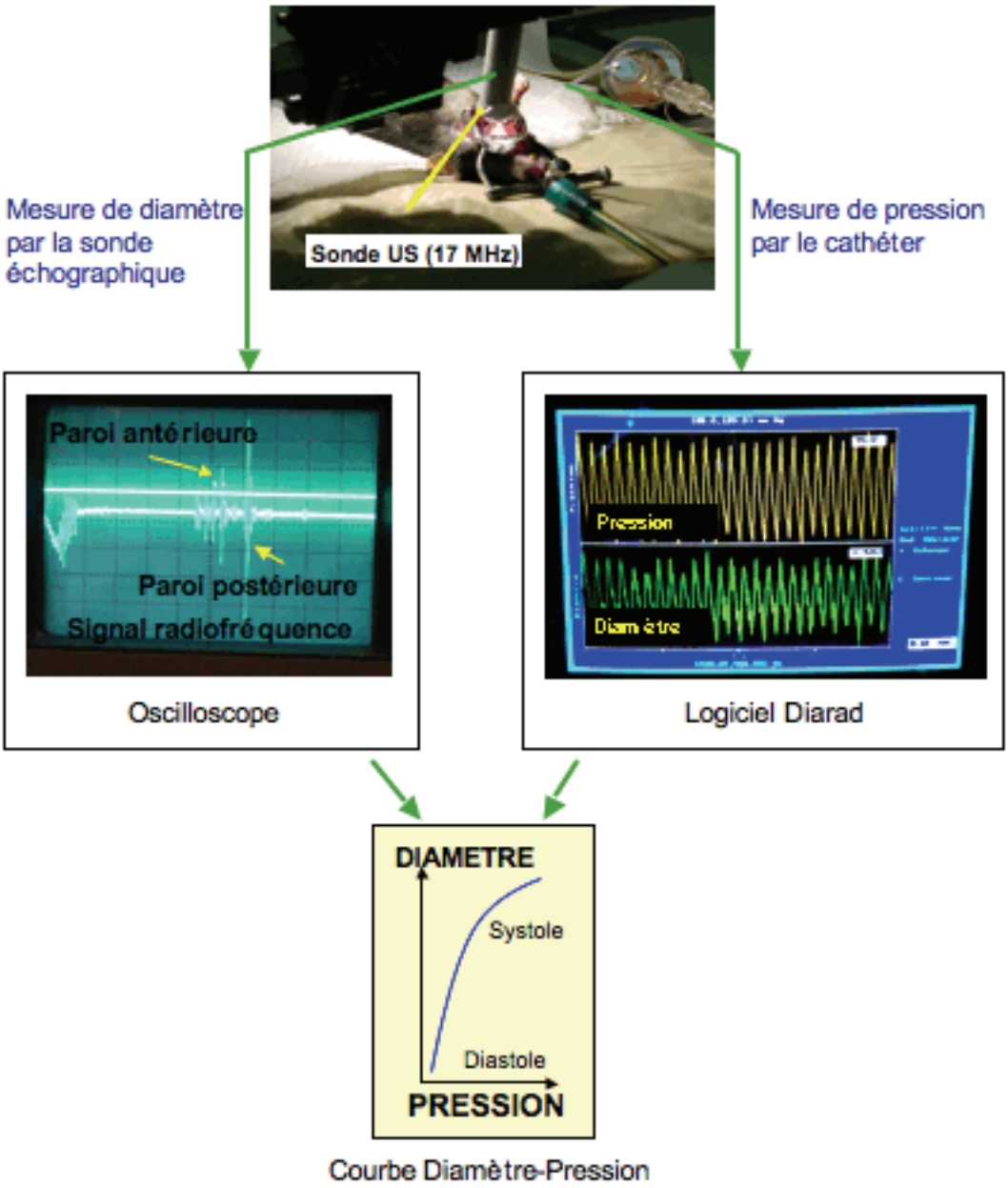


Figure 19. Schéma d'obtention des courbes Pression-Diamètre carotidien par la technique d'echotracking chez la souris. Sonde US : sonde ultrasonique.

Le calcul des paramètres mécaniques s'effectue comme suit :

Les modifications de la lumière artérielle en fonction de la pression artérielle (courbe pression-diamètre) sont calculées à partir de ces trois paramètres α, β, γ selon le modèle décrit par Langewouters (Tardy et al, 1991).

$$LCSA = \alpha [\pi/2 + \tan^{-1} (P-\beta)/4]$$

où LCSA (Lumen Cross Sectionnal Area) représente la surface sectionnelle de la lumière artérielle et P la pression.

La distensibilité est le rapport de la compliance circonférentielle à la surface de la lumière.

$$\text{Distensibilité} = (1/\text{LCSA}) \times (\delta\text{LCSA}/\delta\text{P})$$

Le module élastique incrémentiel (Einc) permet d'évaluer les propriétés mécaniques intrinsèques du matériau constituant la paroi, indépendamment de la géométrie de l'artère.

$$\text{Einc} = 3/\ \text{Distensibilité} \times (1 + \text{LCSA-MCSA})$$

où la MCSA (Media Cross Sectionnal Area) représente la surface sectionnelle de la média. Les mesures de MCSA nécessaires au calcul du module élastique sont déterminées *in vitro* par méthode histomorphométrique après fixation au formol. La surface de la lumière artérielle ainsi que la distensibilité sont calculés *in vivo* à la PAM.

L'élasticité du matériau est évaluée à partir des courbes reliant la contrainte circonférentielle subie par l'artère au Einc. La contrainte circonférentielle WS (Wall Stress) témoigne de l'impact de la pression sur la paroi du vaisseau. Elle se calcule à partir des valeurs de LCSA et de MCSA pour différents niveaux de pression artérielle.

$$\text{WS} = 2\ \text{LCSA} \times \text{P/MCSA}$$

I.3.1.3 Rigidité aortique : vitesse de l'onde de pouls (VOP)

Après les mesures d'échotracking, le cathéter carotidien est repoussé jusqu'à ce que son extrémité se situe dans la crosse aortique.

La pression artérielle est alors enregistrée simultanément au niveau de l'aorte abdominale (pression périphérique, cathéter fémoral) et de l'aorte thoracique (pression centrale, cathéter carotidien) (Figure 20). Le décalage de temps (Δt) mesuré entre les pieds d'onde du signal thoracique et du signal abdominal correspond au temps que met l'onde de pouls pour parcourir la distance (L) entre les deux cathéters (mesurée *in situ* manuellement après sacrifice de l'animal). La VOP est alors calculée comme étant le rapport L/ Δt.

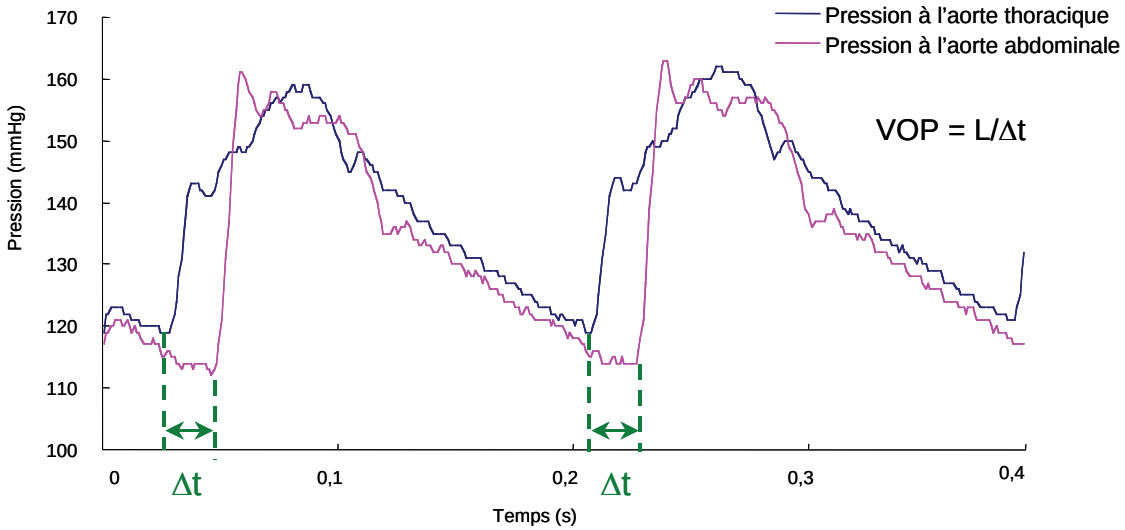


Figure 20. Exemple de courbes de pression au niveau de l'aorte thoracique et de l'aorte abdominale enregistrées chez un rat Zucker obèse afin de mesurer la VOP

I.3.2 Prélèvements tissulaires

Une fois les mesures décrites précédemment effectuées, le rat est sacrifié par exsanguination. Les mesures *in situ* de distances entre les deux cathéters sont effectuées. Les gros troncs artériels et d'autres organes (cœur, reins, foie, graisse blanche) sont prélevés et conservés dans l'azote liquide, avant d'être stockés à -80°C. La carotide droite des rats est canulée à ses deux extrémités dans une cuve à organe contenant du sérum physiologique, puis perfusée avec du formaldéhyde (Solution de Formaline 10 %, Sigma) sous une pression constante correspondant à la PAM de l'animal pendant 2h. Cela permet de préserver la géométrie de l'artère.

I.3.3 Réactivité vasculaire

Les animaux sont sacrifiés à l'âge de 25 ou 80 semaines par exsanguination. L'artère carotide est prélevée et immédiatement placée dans une solution physiologique saline (PSS) de la composition suivante (valeurs en mM): NaCl 130,0 ; KCl 3,7 ; CaCl2 1,6 ; NaHCO314,9 ; MgSO4 1,2 ; KH2PO4 1,2 et glucose 11,0. Après avoir soigneusement nettoyé le tissu adipeux et conjonctif, les artères ont été coupées en anneaux de 3 mm de long et montées sur un myographe (Danish MyoTechnology, Aarhus, Danemark). Les anneaux sont oxygénés en continu par un mélange gazeux (75% N2 ; 15% O2 ; 5% CO2) dans un bain de PSS à 37 °C. Pour l'évaluation des phénomènes endothélium-indépendants, l'endothélium a été enlevé des anneaux carotidiens en frottant doucement l'intérieur des anneaux sur un crochet de l'appareil.

La tension des anneaux artériels est équilibrée pendant 40 min pour atteindre la tension physiologique de repos de 1,0 g (ou 4,9 mN). Au cours de la période d'équilibration, le bain de PSS est changé toutes les 15 min. À la fin de l'équilibration, l'intégrité fonctionnelle de l'endothélium est testée par la capacité des anneaux précontractés avec une concentration de phényléphrine (Phe) ED70 à se relâcher en réponse à l'acétylcholine (Ach) 10^{-5}M.

Les réponses contractiles à la Phe et les réponses dilatatrices à l'Ach et au nitroprussiate de sodium (SNP) ont été déterminées par l'addition cumulée des agonistes pour donner la concentration finale indiquée sur les courbes. Les anneaux ont été incubés avec 0,5 mM d'acide palmitique, 0,5 mM d'acide linoléique, l'association des deux ou 1% de BSA (albumine sérique bovine, véhicule) pendant 30 min avant l'obtention des courbes concentration-réponse à l'Ach. Les anneaux sans endothélium ont été incubés avec 0,5 mM d'acide linoléique ou 1% de BSA (véhicule) pendant 30 min avant l'obtention des courbes concentration-réponse au SNP. Lorsque les réponses dilatatrices à l'Ach sont étudiées, les tissus sont précontractés avec 10^{-5}M Phe. Lorsque la réponse contractile à la Phe atteint un plateau, l'Ach est alors ajoutée de manière cumulative.

I.3.4 Prélèvements sanguins et tests biochimiques

Les rats ont été mis à jeun la veille de la prise de sang. Les animaux sont anesthésiés avec de l'isoflurane (3%, débit d'oxygène 1,5L), et 2 ml de sang est prélevé *via* la veine jugulaire à l'aide d'une seringue héparinée. Les différentes mesures de la glycémie, des électrolytes et des lipides ont été faites par des automates. Les taux plasmatiques de NEFA (Non-Esterified Fatty Acids, acides gras libres non estérifiés) ont été mesurés par une méthode enzymatique (kit NEFA-RH, Wako Chemicals GmbH, Neuss, Allemagne). Les adipokines et l'insuline plasmatiques ont été mesurées par des kits ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Rat adiponectine Elisa Kit, Circulex, CycLex Co. Ltd, Nagano, Japon ; RayBio Elisa kit Rat leptine, RayBiotech, Norcross, Etats-Unis ; Ultra sensible Rat insuline Elisa Kit, Crystal Chem, Downers Grove, USA).

I.3.5 Mesure des NEFA

La méthode enzymatique utilisant l'Acyl-CoA oxydase s'est largement répandue en raison de son excellente spécificité et de son mode opératoire concis. Le coffret NEFA-HR pour le dosage des NEFA repose sur la méthode enzymatique utilisant la 3-Méthyl-N-Ethyl-N-(β-Hydroxyéthyl)-Aniline (MEHA) comme agent coloré en violet.

Principe de la méthode

Sous l'action de l'Acyl-CoA synthétase (ACS), et en présence de coenzyme A et de sel trisodique d'adénosine 5-triphosphate (ATP), les acides gras non estérifiés de l'échantillon sont transformés en Acyl-CoA, AMP et acide pyrophosphorique (PPi) (Figure 21, équation 1). Grâce à l'Acyl-CoA oxydase (ACOD), l'Acyl-CoA obtenu est oxydé et libère du 2,3-trans-Enoyl-CoA et du peroxyde d'hydrogène (H2O2) (Figure 21, équation 2). En présence de peroxydase (POD), le peroxyde d'hydrogène libéré conduit à la formation d'un pigment bleu violet par condensation oxydative avec la 3-Méthyl-N-Ethyl-N-(β-Hydroxyéthyl)-Aniline (MEHA) et la 4-amino-antipyrine (4-AA). La concentration en acides gras non estérifiés (NEFA) s'obtient par la mesure de l'absorbance du composé coloré en bleu violet.

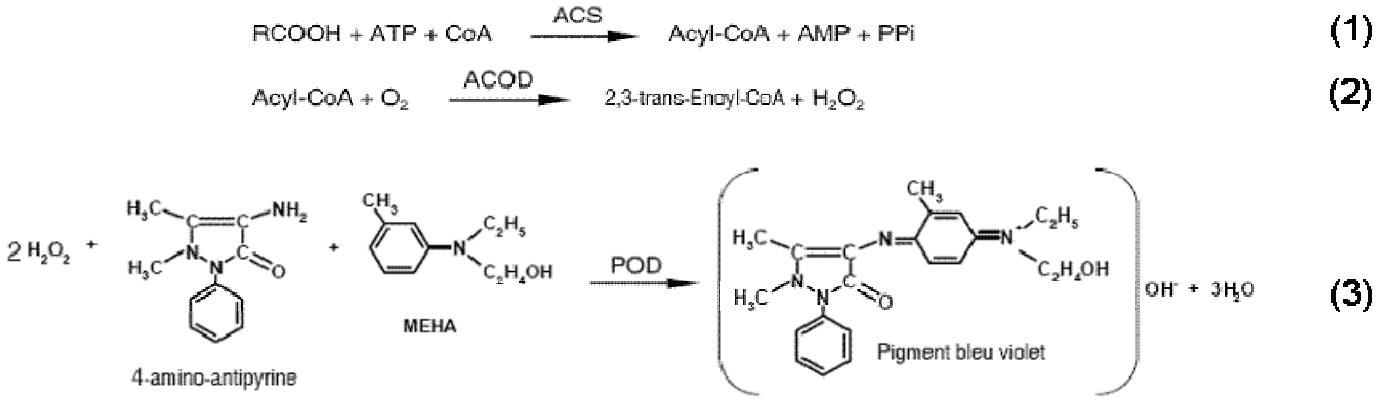


Figure 21. Réactions chimiques utilisées dans le kit commercial de dosage colorimétrique des acides gras non estérifiés.

I.3.6 Mesure des adipokines par ELISA

Les trousses commerciales utilisées pour le dosage de l'adiponectine, de la leptine et de l'insuline utilisent la technique quantitative immunoenzymatique ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) en sandwich. Un anticorps polyclonal spécifique pour l'antigène a été pré-enduit sur une microplaque. Les calibrateurs et les échantillons sont déposés dans les puits, ainsi l'antigène présent est lié par l'anticorps immobilisé sur la plaque. Après lavage des substances non fixées, un anticorps polyclonal conjugué à une enzyme spécifique de l'antigène est ajouté aux puits. Après un lavage pour enlever les anticorps conjugués non liés, le conjugué restant est mis en contact avec son substrat. La réaction est arrêtée par addition d'une solution acide et l'absorbance du produit jaune résultant est mesurée à 450 nm. L'absorbance est proportionnelle à la concentration d'antigène. Une courbe standard est

construite en traçant les valeurs d'absorbance en fonction des concentrations d'antigène des calibrateurs, et les concentrations des échantillons inconnus sont déterminées en utilisant cette courbe standard.

I.3.7 Structure artérielle

I.3.7.1 Histomorphométrie carotidienne

Après 24h de conservation dans le formol, les carotides subissent une série de bains d'alcool et de xylène permettant leur déshydratation et leur inclusion dans la paraffine :

- 3 bains de PBS de 1h
- Passage dans l'éthanol 50° (les artères peuvent être conservées ainsi plusieurs semaines).
- 4 bains d'alcool 80° de 10 min
- 4 bains d'alcool 95° de 20 min.
- 5 bains d'alcool absolu de 20 min
- 2 bains de xylène de 30 min
- Passage de 15-20 min en paraffine liquide (55°, dans l'étuve)
- Laisser les prélèvements 1 nuit en paraffine chaude (55°) avant d'inclure, c'est-à-dire placer le prélèvement dans la position voulue dans un moule en métal, et laisser se solidifier la paraffine à 4° avant de démouler.

Les blocs de paraffine sont coupés en sections de 5 µm d'épaisseur avec un microtome. Les coupes obtenues sont étalées sur des lames en verre poli et dégraissé à l'aide d'une goutte d'eau. Les lames sont mises à sécher à 37° toute une nuit avant d'être colorées. Les prélèvements sont déparaffinés et réhydratés (2 bains de xylène de 5 min, 1 bain d'alcool absolu de 5 min, 1 bain d'alcool 70° de 5 min et 1 bain d'eau distillée de 5 min) Après réhydratation, les lames sont colorées avec la méthode de Weigert et à l'hématoxyline (bain de 2 min dans la solution commerciale Hematoxylin Gill's Formula de Vector. Les noyaux sont colorés en bleu.) puis déshydratées (bains de 5 min chacun d'alcool 70°, d'alcool absolu et 2 bains de xylène) et montées dans le milieu Eukitt (Klinder GMBH & Co). Ces colorations permettent la quantification par analyse d'images du nombre de noyaux, de l'épaisseur et de la surface de la media grâce à un logiciel d'analyse d'images (Quancoul).

I.3.7.2 Méthode de Weigert

C'est une coloration élective des fibres élastiques par le réactif de weigert : solution de résorcine et de fuschine précipitée par le perchlorure de fer. Une contre-coloration au picro indigo carmin (méthode de VAN GIESON) est également effectuée.

- Solution de weigert	30 à 60mn
- Eau courante	
- Alcool chlorhydrique	quelques secondes en agitant
- Eau distillée	
- Picro indigo carmin	l0 min
- Eau courante	
- Alcool 70°	5 min
- Alcool 95°	5 min
- Alcool 100° - Toluène	5 min
- Monter à l'Eukitt	

I.3.7.3 Quantification biochimique de l'élastine insoluble et du collagène

L'élastine insoluble, la quantité totale de collagène et les protéines cellulaires sont quantifiées à partir de la média de l'aorte thoracique descendante des rats Zucker. Sous un microscope opératoire, les segments aortiques sont ouverts longitudinalement, leur longueur est mesurée et la média est séparée de l'adventice. Les segments de média sont pesés (poids humide). Ils sont ensuite délipidés et déshydratés et leur poids sec est alors déterminé. Les protéines cellulaires sont extraites avec une solution de SDS 0,3 %, et quantifiées par la méthode de Lowry. L'élastine est purifiée par la méthode « hot alkali » (3 × 15 min dans 0,1 N de NaOH à 98°C) et quantifiée par pesée. Les protéines extracellulaires, autres que l'élastine, qui sont extraites par le NaOH à chaud sont hydrolysées et le collagène est quantifié par dosage de l'hydroxyproline dans l'hydrolysat (sachant que le collagène contient 12,77% d'hydroxy-proline).

I.3.8 Western Blot

Les lysats tissulaires sont préparés par homogénéisation des aortes thoraciques dans un tampon de lyse contenant des inhibiteurs de phosphatases et de protéases (Roche). Les protéines sont ensuite soumises à une électrophorèse dans un gel d'acrylamide SDS-PAGE 10% et transférés sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-C Extra, Amersham Bioscience).

Après 1 h de saturation (lait écrémé en poudre 5% resuspendu dans un tampon TBST (Tris-Base 0,1 M, NaCl 0,15, Tween 20 0,1%), les membranes ont été incubées une nuit à 4 °C sous agitation avec les anticorps primaires. Tous les anticorps ont été dilués dans du TBST +5% de BSA. Les anticorps dirigés contre les formes phosphorylées et natives de ERK1/2, p38 MAPK, Akt, NFκB et IκBα (Cell Signaling) sont utilisés dilués au 1:500 (formes phosphorylés) et au 1:1000 (formes natives), respectivement. Les anticorps dirigés contre les intégrines, -α1 (Santa Cruz),-α5 (Millipore),-αV (Chemicon Int.),-β1 (Chemicon Int.), et la

taline (Sigma) sont utilisés dilués au 1:1000. L'anticorps contre la fibronectine (Chemicon Int.) est utilisé dilué au 1:400, et contre la tubuline (Sigma) au 1:7000. Après incubation avec les anticorps primaires, les membranes sont rincées trois fois avec le TBST. Ensuite, elles sont incubées pendant 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin (GE Healthcare) à une dilution 1:2000. Après quatre lavages au TBST, les bandes de protéines sont détectées par chimioluminescence avec le système Immun-Star™ selon les recommandations du fabriquant (Biorad). Les intensités des bandes sont quantifiées par densitométrie avec un système de traitement informatisé de l'image (LAS-4000, Fuji).

I.3.9 Analyse statistique

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne +/- erreur standard à la moyenne (ESM). Les données ont été analysées par l'utilisation d'un Trend ANOVA, couplé à un test de Fisher pour les comparaisons multiples afin d'évaluer l'influence de l'âge et de la souche et de leur interaction sur les différentes variables. Les différences entre les courbes dose-réponse sont examinées par la sensibilité (pD2) et l'effet maximal (Emax). L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel NCSS package 6,0 (JL Hintze, Kaysville, UT). Les valeurs P <0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

II Etude sur les souris Klotho

II.1 Animaux

II.1.1 Obtention des souris transgéniques Klotho

Les souris, de fond génétique hybride C57BL/6J et 129S5/SvEvBrd, ont été obtenues par excision des exons 2 et 3 du gène codant pour la protéine, par la société Lexicon Genetics (souris Knock-out). Les couples reproducteurs sont commercialisés par le Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC) de Davis, Californie. Les souris sont accueillies dans une animalerie transgénique et élevées selon les lois en vigueur.

II.1.2 Animaux inclus dans l'étude

Pour cette étude du phénotypage artériel des souris Klotho dans des conditions basales, nous avons étudié les souris sauvages, Kl+/+ et les souris hétérozygotes, Kl+/- aux âges de

6 et 12 mois. Un total de 26 femelles et 18 mâles ont étés phénotypés à 6 mois, ainsi que 13 femelles et 18 mâles à l'âge de 12 mois.

II.2 Mesure de la pression artérielle chez l'animal éveillé

Les mesures de pression artérielle chez la souris consciente sont effectuées par pléthysmographie, avec le même appareil et selon le même protocole que pour les rats Zucker.

II.3 Evaluation de la rigidité artérielle *in vivo*

II.3.1 Préparation de l'animal

Les souris sont anesthésiées avec de l'isoflurane (2,5%, débit d'oxygène 1,5L). La carotide gauche est cathétérisée avec un cathéter de polyéthylène de taille PE-5, et l'artère fémorale gauche est cathétérisée avec un cathéter de polyéthylène de taille PE-8. Les capteurs de pression, les interfaces d'acquisition et les protocoles utilisés afin d'obtenir les mesures de rigidité carotidienne et aortique (echotracking et VOP) sont les mêmes que pour les rats Zucker.

II.3.2 Mesure de la VOP

La pression artérielle est enregistrée simultanément au niveau de l'aorte abdominale (pression périphérique, cathéter fémoral) et de l'aorte thoracique (pression centrale, cathéter carotidien) (Figure 18). Le décalage de temps (Δt) mesuré entre les pieds d'onde du signal thoracique et du signal abdominal correspond au temps que met l'onde de pouls pour parcourir la distance (L) entre les deux cathéters (mesurée *in situ* manuellement après sacrifice de l'animal). La VOP est alors calculée comme étant le rapport L/ Δt.

Des ajustements de la VOP mesurée ont étés calculés selon les formules suivantes :

Ajustement à la pression artérielle : $\beta\text{-index} = 2{,}11 \times (VOP^2/PAD)$

Ajustement à la fréquence cardiaque : $\Delta t = \Delta t_{mesurée} + (0{,}131 \times (160 - HP_{mesurée}))$

où HP = période cardiaque de l'animal.

Ici 160 correspond à 160 ms, temps pour 1 cycle cardiaque à la fréquence de 375 bpm.

II.4 Prélèvements tissulaires

Une fois les mesures décrites précédemment effectuées, la souris est sacrifiée par exsanguination. Le sang est récupéré sur des tubes pré-enduits avec de l'EDTA, et le plasma est aliquoté après 10 minutes de centrifugation à 3000 tours/min. Les mesures *in situ* de distances entre les deux cathéters sont effectuées. Les gros troncs artériels et les autres organes (cœur, reins, foie, graisse blanche, graisse brune, cerveau, rate, thymus, intestin, vessie, muscle, poumons, organes reproducteurs) sont prélevés et conservés dans l'azote liquide, avant d'être stockés à -80°C. La carotide droite des souris est canulée à ses deux extrémités dans une cuve à organe contenant du sérum physiologique puis perfusée avec du formaldéhyde (Solution de Formaline 10 %, Sigma) sous une pression constante correspondant à la PAM de l'animal pendant 2h. Cela permet de préserver la géométrie de l'artère.

II.5 Histomorphométrie carotidienne

Les carotides de souris sont incluses en paraffine et colorées par la méthode de Weigert afin de mesurer la géométrie de l'artère, en suivant le même protocole que pour les rats Zucker.

II.6 Marqueurs du stress oxydant

II.6.1 Dosage du glutathion

Le glutathion réduit (GSH) a été mesuré dans le plasma des souris Klotho à l'aide d'un kit commercialisé par Cayman Chemical, USA.

La technique repose sur un procédé de recyclage enzymatique, en utilisant la Gluthation réductase. Le groupement thiol du GSH réagit avec l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB, réactif de Ellman) pour former un composé coloré, l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB). Le disulfure mixte GSTNB (entre GSH et TNB) qui est produit simultanément est réduit par la glutathion réductase pour recycler le GSH et produire plus de TNB (Figure 22). Le taux de TNB produit est directement proportionnel à cette réaction de recyclage, qui est à son tour directement proportionnelle à la concentration en GSH de l'échantillon. Ainsi, la mesure de l'absorbance du TNB à 405 nm par un lecteur de microplaque donne une estimation de GSH contenu dans l'échantillon.

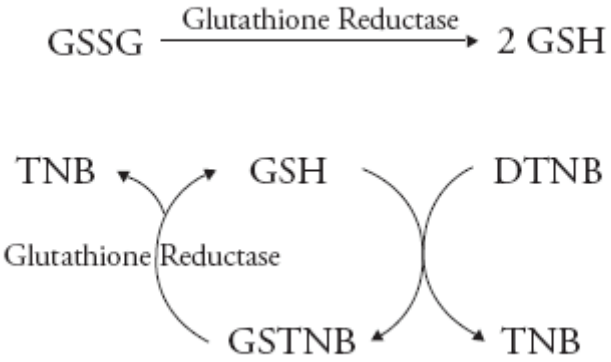


Figure 22. Réactions chimiques utilisées dans le kit commercial pour le dosage du glutathion réduit (GSH).

Presque tous les échantillons biologiques utilisés pour la mesure de GSH contiennent de grandes quantités de protéines. Il est nécessaire d'enlever autant de protéines que possible de l'échantillon pour éviter les interférences dues à des particules et aux groupements thiols des protéines dans le dosage. Les échantillons ont ainsi été préalablement déprotéinisés selon le protocole suivant :

- Rajouter un volume équivalent de solution MPA (l'acide métaphosphorique 0,1 g/ml) à l'échantillon plasmatique. Vortexer.
- Incuber à température ambiante pendant 5 min.
- Centrifuger à 2500 g pendant 10 min
- Collecter délicatement le surnageant. A ce stade, le surnageant peut être conservé pour une période supérieure à 6 mois à -20°C sans dégradation du GSH ou GSSG.
- Ajouter 50 µl de solution TEAM (triéthanolamine 0,1M) par ml de surnageant et vortexer immédiatement ;
- Concentrer par lyophilisation ;
- Reconstituer l'échantillon avec le 1/3 en volume initial de tampon MES (acide 2-(N-morpholino)ethanesulphonique 0,4M ; phosphate 0,1M ; 2mM d'EDTA, pH 6.0).

L'échantillon est prêt pour le dosage du GSH total.

II.6.2 Dosage des TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances)

Pour évaluer la péroxydation lipidique, nous avons analysé les concentrations en TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) dans le plasma par colorimétrie à l'aide d'un kit commercialisé par Cayman Chemical. Les lipides peroxydés sont instables et se décomposent pour former une série de composés carbonylés, dont le malondialdéhyde (MDA). Le MDA réagit à haute température avec l'acide thiobarbiturique (TBA, ajouté à l'échantillon en présence de soude, d'acide acétique et de SDS) pour former le complexe MDA-TBA (Figure 23). Ce complexe peut être dosé, avec ce kit, par colorimétrie à 540 nm.

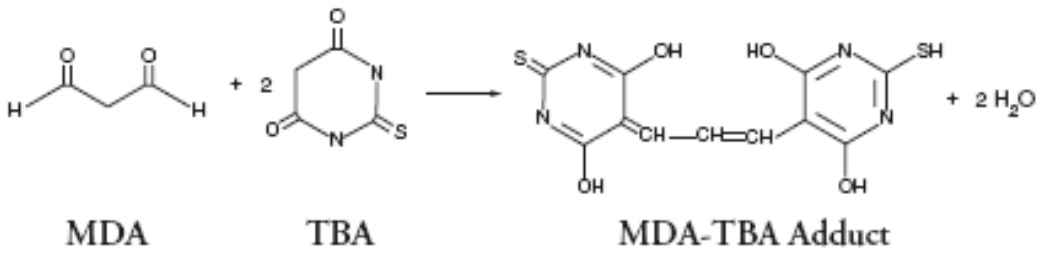


Figure 23. Réaction chimique utilisée dans le kit commercial de dosage de péroxydation lipidique.

II.6.3 Dosage de la superoxide dismutase

La superoxide dismutase (SOD) est une métalloenzyme catalysant la dismutation de l'anion superoxide en peroxyde d'hydrogène et en dioxygène. Cette enzyme est la première étape du mécanisme de défense antioxydant de la cellule.

Pour évaluer les quantités disponibles de SOD dans le plasma des souris, nous avons utilisé un kit de mesure commercialisé par Cayman Chemicals. Ce kit utilise un sel de tétrazolium pour détecter les radicaux superoxides générés par la xanthine oxydase et l'hypoxanthine (Figure 24). Une unité de SOD est définie par la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber 50% de la dismutation du radical superoxyde.

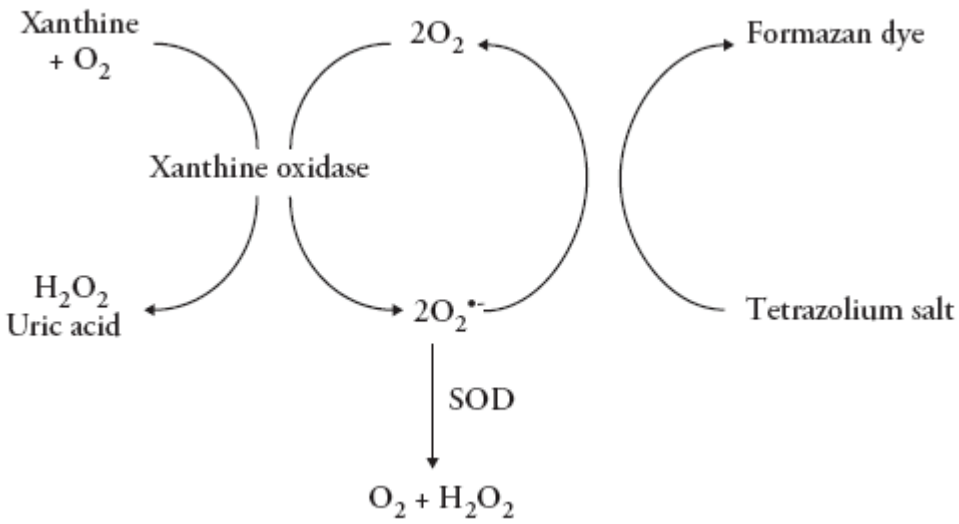


Figure 24. Réactions chimiques utilisées dans le kit commercial de dosage de l'activité superoxyde dismutase.

II.7 Génotypage

Les souris Klotho sauvages (Kl+/+) et hétérozygotes (Kl+/-) présentent le même phénotype. Un génotypage est nécessaire pour les distinguer.

II.7.1 Extraction d'ADN

Un petit bout de queue est coupé et digérer selon le protocole suivant.
Le tissu est immergé dans un tampon SE (NaCl 5M, EDTA pH 8, SDS 10%) avec 1% de protéinase K (20 mg/ml). La digestion se fait sur la nuit à 55°C.
Le lendemain, il est ajouté aux échantillons du NaCl saturé (6M). Après une centrifugation à 10 000 trs/min pendant 2 min, le surnageant contenant l'ADN est récupéré. Un volume équivalent d'isopropanol est ajouté. Après une nouvelle centrifugation de 5 min à 14 000 trs/min, le culot d'ADN est lavé à l'éthanol 70%, séché à température ambiante, puis resuspendu dans de l'eau ultrapure. L'ADN est dénaturé 10 min à 85°C puis plongé dans la glace. Il est conservé sur la glace jusqu'à son utilisation pour la PCR, puis il est stocké à -20°C.

II.7.2 Amplification du gène Klotho par PCR

A la fin de l'extraction d'ADN, une amplification en PCR multiplex est effectuée. Les amorces des gènes mutés et sauvages sont fournis par le fournisseur des souris et sont les suivants :

Gène sauvage : 5'- GATGGGGTCGACGTCA-3' et 5'- TAAAGGAGGAAAGCCATTGTC-3'
Gène muté : 5'- GCAGCGCATCGCCTTCTATC -3' et 5'- ATGCTCCAGACATTCTCAGC -3'

Chacune de ces amorces est ajoutée a une concentration de 0,5 mM au mélange réactionnel contenant 1 U de Taq polymérase, le tampon de la Taq 1x, 3 mM de MgCl2, 0,2 mM de dNTP.
Pour chaque échantillon, un tube de PCR est préparé avec environ 50 ng d'ADN génomique, 20 µL de mélange réactionnel et de l'eau ultrapure jusqu'à un volume de 50 µL.
Le programme de PCR utilisé comprend 3 étapes :

- Etape 1 (1 x) :
    - 2 minutes à 94°C
- Etape 2 (30 x) :
    - 1 minute à 94°C
    - 1 minute à 60°C
    - 1 minute à 72°C
- Etape 3 (1 x) :
    - 7 minutes à 72°

II.7.3 Visualisation

Ces produits de PCR sont ensuite mis à migrer à 80-100 V pendant 30 à 45 min dans un gel d'agarose à 1,2% contenant 0,1% de bromure d'éthidium.
A la fin de la migration, l'ADN amplifié est visible à la lumière ultraviolette. Les échantillons provenant des souris sauvages Kl+/+ présentent une seule bande de 186 paires de bases (pb). Les échantillons provenant des souris hétérozygotes Kl+/- présentent 2 bandes de 186 pb et 455 pb.

RESULTATS

I Etude sur les rats Zucker

I.1 Paramètres morphologiques, hémodynamiques et métaboliques

Le tableau 2 montre l'ensemble des paramètres hémodynamiques et métaboliques en fonction du vieillissement ou de l'obésité. Les poids corporel, rénal et cardiaque des rats âgés de 80 semaines sont supérieurs à ceux des rats âgés de 25 semaines (tableau 2). A l'âge de 80 semaines, le OZR montre des poids corporel, rénal et cardiaque plus élevés que son contrôle, le LZR. Après ajustement du poids des organes au poids corporel, l'index des poids cardiaque et rénal ne sont pas significativement augmentés avec l'âge chez le LZR. Par contre, le poids de ces organes est supérieur chez le OZR comparativement au LZR à l'âge de 25 semaines, et ces poids augmentent significativement avec l'âge chez le OZR.

Chez le LZR, le vieillissement est associé à une diminution de fréquence cardiaque (FC) et de PAS chez l'animal conscient, ainsi qu'à une augmentation des taux plasmatiques de glucose, de cholestérol et de leptine. Chez le OZR, le vieillissement induit une augmentation des taux plasmatiques de glucose, de triglycérides, de leptine et de créatinine, tandis que les niveaux d'insuline, de HOMA-IR, de HDL-cholestérol et le taux d'hématocrite sont réduits. L'obésité est également associée à des troubles précoces et tardifs. A l'âge de 25 semaines, les OZR présentent une augmentation de PAS chez l'animal conscient, d'insuline, de HOMA-IR, de cholestérol total et de la fraction HDL, des acides gras libres (AGL) et de la leptine comparativement aux LZR. A l'âge de 80 semaines, les OZR présentent des valeurs plus élevées de la PAS chez l'animal conscient, de cholestérol total et de la fraction HDL, des triglycérides, des AGL, de leptine et de créatinine comparativement aux LZR. En revanche, ils avaient une valeur inférieure d'hématocrite.

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que le vieillissement et le syndrome métabolique ont chacun leur propre impact sur les paramètres hémodynamiques et métaboliques, mais que l'interaction du vieillissement et de l'obésité a également interféré avec l'ampleur du phénotype. Par ailleurs, chez le OZR à 80 semaines, comparativement à l'âge de 25 semaines, la baisse de l'indice HOMA-IR et des taux d'AGL sont la conséquence d'une carence en insuline.

Tableau 2 Paramètres morphologiques, hémodynamiques et métaboliques des rats Zucker âgés de 25 et 80 semaines

	LZR		OZR		ANOVA		
	25 sem	**80 sem**	**25 sem**	**80 sem**	**Age**	**Souche**	**Interaction**
Poids corporel (g)	350 ± 26	432 ± 23 *	486 ± 23 †	531 ± 27 *†	< 0.001	< 0.01	NS
Poids cardiaque (g)	1.09 ± 0.09	1.49 ± 0.08 *	1.18 ± 0.08	1.79 ± 0.09 *†	< 0.01	< 0.001	NS
Index du poids cardiaque	3.12 ± 0.08	3.44 ± 0.11	2.47 ± 0.11 †	3.57 ± 0.27 *	< 0.001	NS	< 0.05
Poids rénal (g)	1.17 ± 0.10	1.53 ± 0.08 *	1.29 ± 0.09	1.90 ± 0.10 *†	< 0.01	< 0.001	NS
Index du poids rénal	3.31 ± 0.09	3.54 ± 0.08	2.67 ± 0.07 †	3.88 ± 0.43 *	< 0.001	NS	< 0.05
PAS consciente (mmHg)	158 ± 2	134 ± 8 *	165 ± 2 †	178 ± 10 †	NS	< 0.05	< 0.01
FC consciente (bpm)	431 ± 21	365 ± 14 *	405 ± 16	391 ± 14	< 0.05	NS	NS
Glucose (mmol/L)	8.0 ± 0.3	11.5 ± 0.8 *	9.4 ± 0.7	13.6 ± 2.3 *	< 0.01	NS	NS
Insuline (ng/mL)	0.66 ± 0.06	2.02 ± 0.48 *	10.5 ± 1.43 †	2.1 ± 0.71 *	< 0.001	< 0.001	< 0.001
HOMA-IR	32 ± 4	154 ± 88	592 ± 114 †	181 ± 113 *	< 0.05	< 0.001	< 0.001
Cholestérol (mmol/L)	1.2 ± 0.1	2.5 ± 0.1 *	5.6 ± 0.3 †	6.1 ± 0.4 †	< 0.001	< 0.001	NS
HDL Cholestérol (mmol/L)	0.73 ± 0.03	0.65 ± 0.03	2.47 ± 0.1 †	1.43 ± 0.1 * †	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Triglycérides (mmol/L)	0.15 ± 0.01	0.57 ± 0.08 *	1.55 ± 0.35 †	2.81 ± 0.75 * †	< 0.05	< 0.001	NS
AGL (µg/µL)	310 ± 34	151 ± 31	1 866 ± 177 †	383 ± 66 * †	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Leptine (ng/ml)	0.4 ± 0.1	2.9 ± 0.7 *	33.1 ± 3.0 †	176.4 ± 66.2 * †	< 0.05	< 0.001	NS
Hématocrite (%)	44 ± 8	40 ± 2	42 ± 2	27 ± 5 * †	NS	< 0.001	< 0.05
Créatinine (mmol/L)	42 ± 2	53 ± 2	41 ± 1	128 ± 42 * †	< 0.01	< 0.05	< 0.05

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. * P < 0,05, 80 semaines vs 25 semaines pour la même souche ; † P < 0.05, obèse vs maigre au même âge (n= 14-21 pour chaque groupe). LZR : Lean Zucker Rat ; OZR : Obese Zucker Rat ; HOMA-IR : Homeostasis model of assessment – insulin resistance, Indice de sensibilité à l'insuline ; FC : fréquence cardiaque ; PAS : pression artérielle systolique ; AGL : acides gras libres ; HDL : high density lipoprotéines, lipoprotéines de haute densité.

I.2 Caractéristiques vasculaires fonctionnelles *in vivo*

La méthode d'échotracking a été utilisée pour mesurer les paramètres mécaniques de la carotide. Les animaux de 80 semaines présentent une distensibilité carotidienne plus faible par rapport aux animaux de 25 semaines (Figure 25A). Il existe une diminution de la compliance à la PAM chez les OZR comparés aux LZR, qui est significative aux deux âges (Tableau 3). Les animaux de 80 semaines ont une diminution de leur PAM et de la contrainte circonférentielle (wall stress, WS) par rapport aux rats âgés de 25 semaines (Tableau 3). Un effet de l'âge ($p < 0,001$) a été observé pour le module élastique (Einc) mesuré à la PAM : les valeurs sont inférieures chez les animaux de 80 semaines par rapport aux rats de 25 semaines (Tableau 3), et cette différence est significative uniquement chez les OZR. Ce résultat s'explique par la baisse de la PAM chez les vieux rats, et ne reflète pas une amélioration des propriétés élastiques chez les animaux de 80 semaines. La courbe Einc / WS représente les propriétés intrinsèques mécaniques de la paroi carotidienne (Figure 25B). En effet, la courbe Einc / WS est décalée vers la gauche, un effet qui est accentué chez le OZR ($p < 0,05$), montrant une augmentation de la rigidité des artères carotides des animaux à l'âge de 80 semaines. Dans la figure 25C, il est montré que pour un Einc donné, la contrainte circonférentielle moyenne appliquée à la paroi carotidienne (MWS) est significativement plus faible chez les animaux âgés, et significativement diminuée chez les OZR par rapport aux LZR à 80 semaines. Ces résultats démontrent que, *in vivo*, l'obésité et le syndrome métabolique associé accentue la rigidité artérielle chez le rat à l'âge de 80 semaines.

Table 3 : Paramètres hémodynamique et mécanique artérielle chez les LZR et OZR ages de 25 et 80 semaines

	LZR		OZR		ANOVA		
	25 wk	**80 wk**	**25 wk**	**80 wk**	**Age**	**Strain**	**Interaction**
PAM (mmHg)	111 ± 7	87 ± 6 *	130 ± 6	82 ± 8 *	< 0.001	NS	NS
Diamètre à PAM (mm)	1.21 ± 0.04	1.24 ± 0.04	1.16 ± 0.04	1.08 ± 0.04 †	NS	< 0.01	NS
MCSA (mm^2)	0.112 ± 0.011	0.170 ± 0.010 *	0.099 ± 0.010	0.170 ± 0.011 *	< 0.001	NS	NS
Distensibilité à PAM ($mm\ Hg^{-1}.10^{-3}$)	5.74 ± 0,46	5.42 ± 0.40	4.25 ± 0.39 †	5.22 ± 0.47	NS	NS	NS
Distensibilité à 100 mmHg	5.46 ± 0.78	2.46 ± 0.25 *	6.66 ± 0.52	2.09 ± 0.32 *	< 0.001	NS	NS
Compliance à PAM	6.65 ± 0.56	6.45 ± 0.48	4.42 ± 0.47 †	4.64 ± 0.58 †	NS	< 0.001	NS
Wall Stress à PAM (kPa)	339 ± 37	175 ± 32 *	379 ± 31	124 ± 38 *	< 0.001	NS	NS
Einc à PAM (kPa)	973 ± 144	702 ± 125	1 279 ± 122	674 ± 149 *	< 0.001	NS	NS

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. * P < 0,05, 80 semaines vs 25 semaines pour la même souche ; † P < 0.05, obèse vs maigre au même âge (n= 14-21 pour chaque groupe). LZR : Lean Zucker Rat ; OZR : Obese Zucker Rat ; Einc : module élastique ; PAM : pression artérielle moyenne ; MCSA : media cross sectional area, surface médiale de coupe trans-sectionnelle.

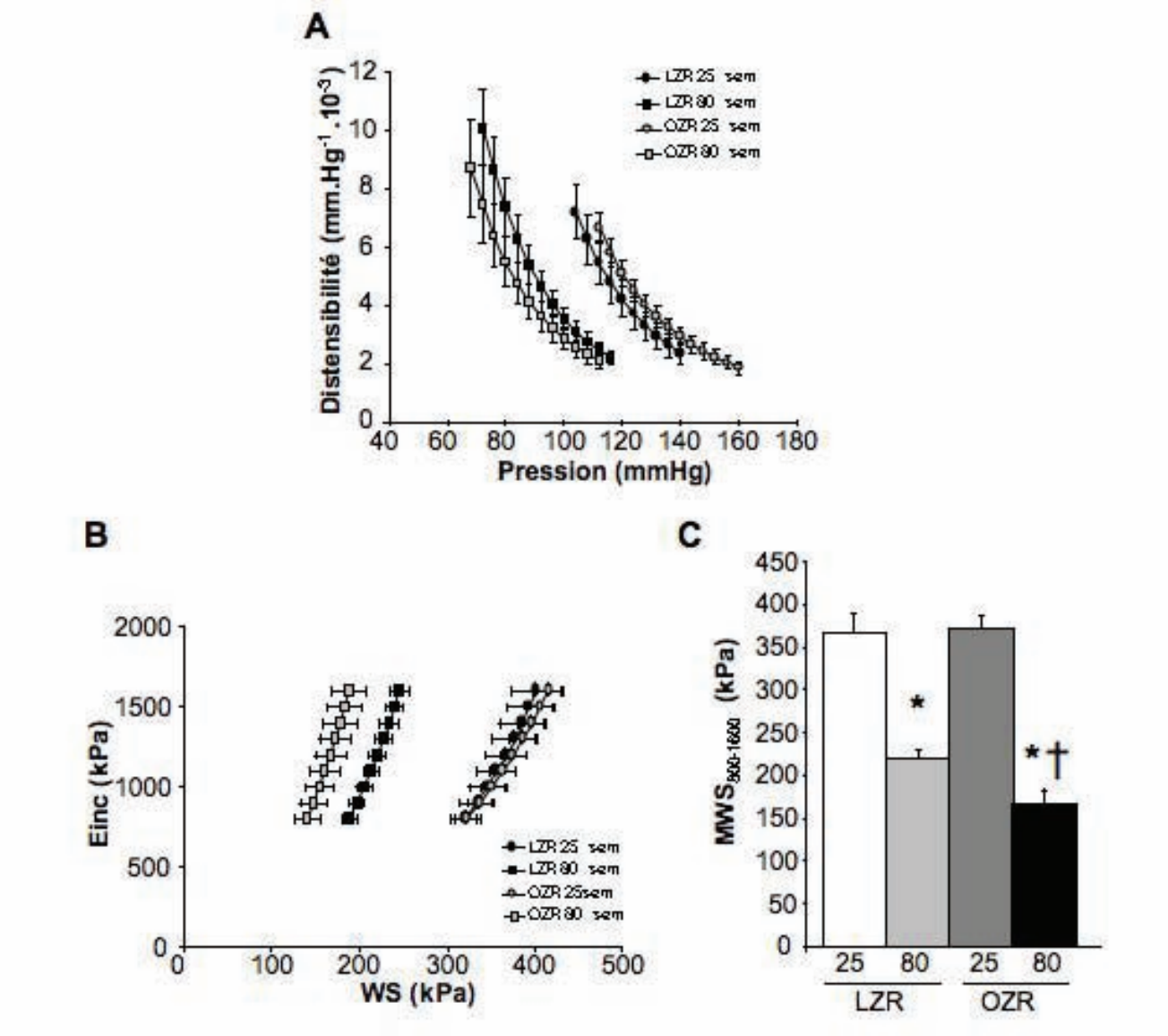


Figure 25. Propriétés mécaniques des artères carotides chez les LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines.

A, Courbe de la distensibilité carotidienne en fonction de la pression artérielle. B, Courbe du module élastique incrémentiel (Einc) en fonction de la contrainte circonférentielle (WS) chez les rats maigres et obèses âgés de 25 et 80 semaines. C, Contrainte pariétale carotidienne moyenne dans une gamme de module élastique de 800 à 1600 kPa ($MWS_{800-1600}$) chez les mêmes rats (ANOVA, âge: $p < 10^{-6}$, souche: $P < 0,05$, d'interaction: $p = 0,3$). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. * $P < 0,05$, 80 semaines vs 25 semaines chez la même souche; † $P < 0,05$, OZR vs. LZR au même âge (n = 14 à 21 dans chaque groupe).

I.3 Structure artérielle

A l'âge de 80 semaines, les LZR présentent une augmentation de leur MCSA et de l'épaisseur de la paroi carotidienne (tableau 4), comparativement aux LZR de 25 semaines. Les OZR âgés de 80 semaines ont également une MCSA, une épaisseur, et un périmètre augmentés par rapport aux OZR de 25 semaines (tableau 4). A l'âge de 80 semaines, les OZR ont un périmètre réduit, comparativement aux LZR. La densité cellulaire (évaluée par la densité nucléaire) était la même dans tous les groupes (tableau 4).

Les rats âgés de 80 semaines présentent des différences significatives dans la composition de l'aorte par rapport aux rats de 25 semaines (augmentation du poids sec, des protéines cellulaires et du collagène, diminution de l'élastine et du ratio élastine/collagène) (Figure 26A-E). Les OZR âgés de 80 semaines présentent une augmentation significative de la fibronectine totale, comparativement aux OZR âgés de 25 semaines (Figure 26F). En outre, comparativement aux LZR de 80 semaines, les OZR du même âge ont une augmentation du poids sec de l'aorte et de la teneur en protéines cellulaires, ainsi qu'une réduction des niveaux d'élastine et du rapport élastine/collagène (Figure 26A-C, E). Enfin, les OZR âgés de 80 semaines montrent une augmentation de la fibronectine totale par rapport aux LZR de même âge (Figure 26F).

Ces données démontrent que la géométrie de la carotide et les composants de la matrice des gros troncs artériels (artères carotides et l'aorte) ont été modifiés par le vieillissement, comme attendu, mais aussi que ces changements liés à l'âge ont été accentués chez les vieux OZR.

Table 4. Histomorphométrie carotidienne chez les LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines

	LZR		OZR		ANOVA		
	25 wk	**80 wk**	**25 wk**	**80 wk**	**Age**	**Strain**	**Interaction**
Epaisseur de la Media (µm)	44 ± 3	63 ± 3 *	47 ± 3	67 ± 3 *	< 0.001	NS	NS
MCSA (mm^2)	0.112 ± 0.011	0.170 ± 0.010 *	0.099 ± 0.010	0.170 ± 0.011 *	< 0.001	NS	NS
Périmètre interne (um)	2777 ± 81	2 822 ± 54	2536 ± 81 *	2 725 ± 63	NS	< 0.05	NS
Nombre de noyaux /section	103 ± 4	156 ± 3 *	92 ± 4	162 ± 4 *	< 0.001	NS	NS
Densité nucléaire ($mm^2.10^{-3}$)	0.93 ± 0.03	1.01 ± 0.02	0.85 ± 0.03	0.99 ± 0.03	NS	NS	NS

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. * P < 0,05, 80 semaines vs 25 semaines pour la même souche ; † P < 0.05, obèse vs maigre au même âge (n= 7-11 pour chaque groupe). LZR : Lean Zucker Rat ; OZR : Obese Zucker Rat ; MCSA : Media cross-sectionnal area.

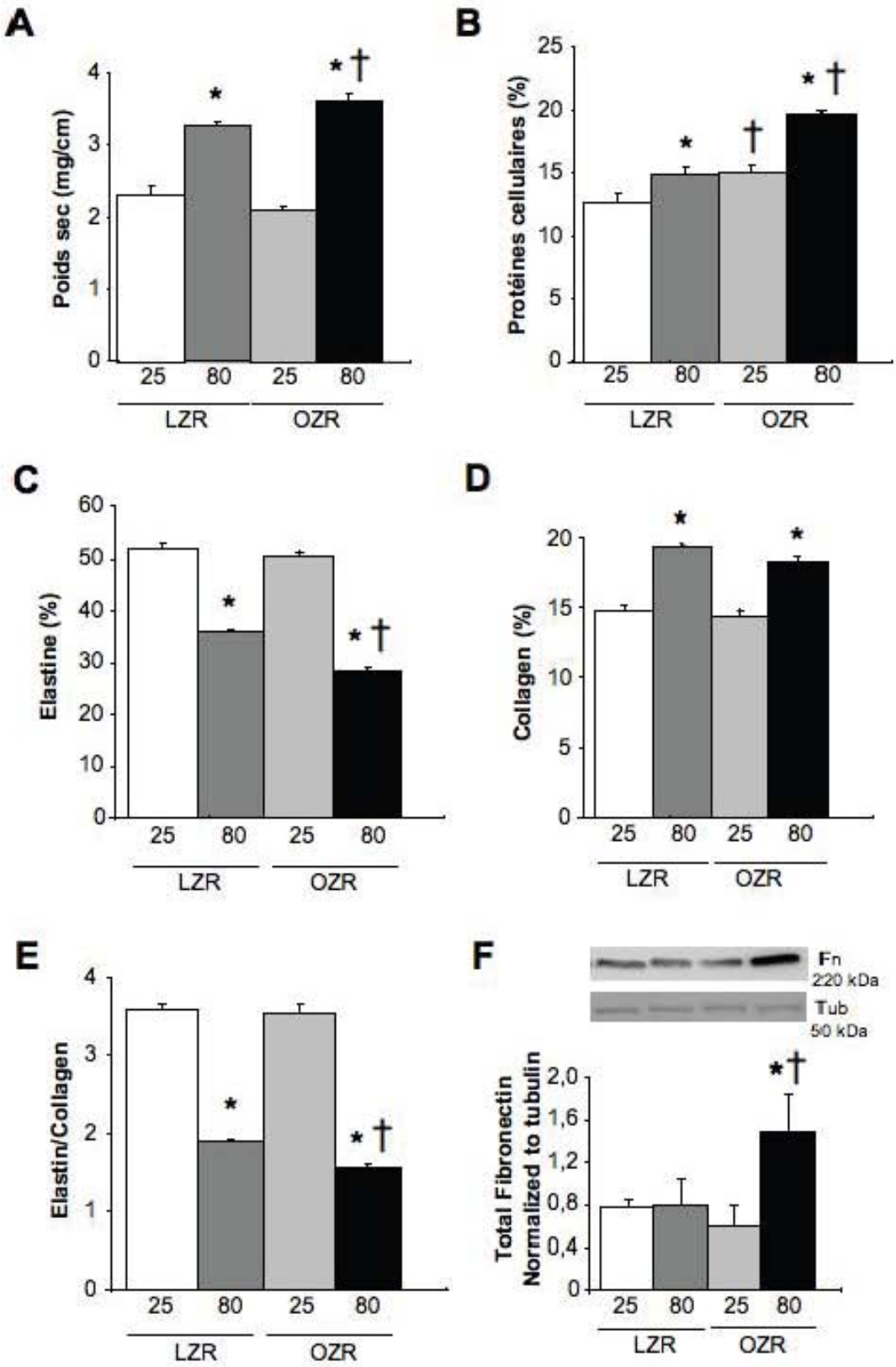


Figure 26. Composition de la média aortique chez les LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines.

A, Poids sec de la média de l'aorte thoracique. Composition de la média en protéines cellulaires (B), en élastine (C) et en collagène (D), exprimés en % du poids sec. E, Rapport élastine / collagène. F, Niveau de protéines de la fibronectine totale, normalisé à celui de la tubuline, utilisée comme protéine de contrôle. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. (n = 10-14 dans chaque groupe). * P < 0,05, 80 semaines vs 25 semaines chez la même souche; † P < 0,05, OZR vs. LZR au même âge

I.4 Réactivité vasculaire *in vitro*

La fonction vasculaire de la carotide a été explorée *in vitro* avec la méthode de myographie. La réponse à la phényléphrine (Phe) est dépendante à la fois de la souche et de l'âge (Figure 27A), puisque la sensibilité (pD2) et l'effet maximal (Emax) sont différentiellement perturbés : le pD2 est réduit chez les LZR à l'âge de 80 semaines par rapport aux LZR âgés de 25 semaines, tandis que le Emax est diminué chez les OZR âgés de 80 semaines par rapport aux LZR du même âge (Figure 27A et Tableau 5).

A l'âge de 80 semaines, la relaxation endothélium-dépendante est altérée chez les OZR par rapport aux LZR (Figure 27B). Le Emax de l'acétylcholine (ACh) est significativement diminué chez les OZR à l'âge de 80 semaines, comparativement aux LZR du même âge (Figure 27B). Lorsque nous avons évalué la relaxation endothélium-indépendante sur les anneaux sans endothélium stimulés par le nitroprussiate de sodium (SNP), un donneur de NO, aucune différence significative n'a été observée entre OZR et LZR (Figure 27C). Ces données indiquent que *in vitro*, les vieux OZR présentent une dysfonction vasculaire qui est dépendante de l'endothélium.

Table 5 : Réactivité vasculaire chez les LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines

	LZR		OZR		ANOVA		
	25 sem	**80 sem**	**25 sem**	**80 sem**	**Age**	**Souche**	**Interaction**
Phényléphrine							
Emax (mN)	7.70 ± 0.66	9.68 ± 0.73	7.85 ± 0.58	5.92 ± 0.43 †	NS	NS	< 0.05
pD2	7.10 ± 0.10	6.73 ± 0.09 *	6.82 ± 0.09 †	6.90 ± 0.09	NS	NS	< 0.05
Acétylcholine							
Emax (%)	79 ± 1	79 ± 4	74 ± 3	64 ± 6 †	NS	< 0.05	NS
pD2	6.11 ± 0.14	6.61 ± 0.30	6.00 ± 0.23	6.28 ± 0.19	NS	NS	NS
Nitroprussiate de sodium							
Emax (%)	98 ± 2	101 ± 1	101 ± 3	100 ± 3	NS	NS	NS
pD2	7.53 ± 0.24	7.79 ± 0.10	7.12 ± 0.10	7.63 ± 0.23	NS	NS	NS

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. * P < 0,05, 80 semaines vs 25 semaines pour la même souche ; † P < 0.05, obèse vs maigre au même âge (n= 7-11 pour chaque groupe). LZR : Lean Zucker Rat ; OZR : Obese Zucker Rat ; Emax : effet maximal en réponse à l'agent ; pD2 : sensibilité à l'agent. (au moins 3 anneaux/animal, dans 3-5 animaux dans chaque groupe).

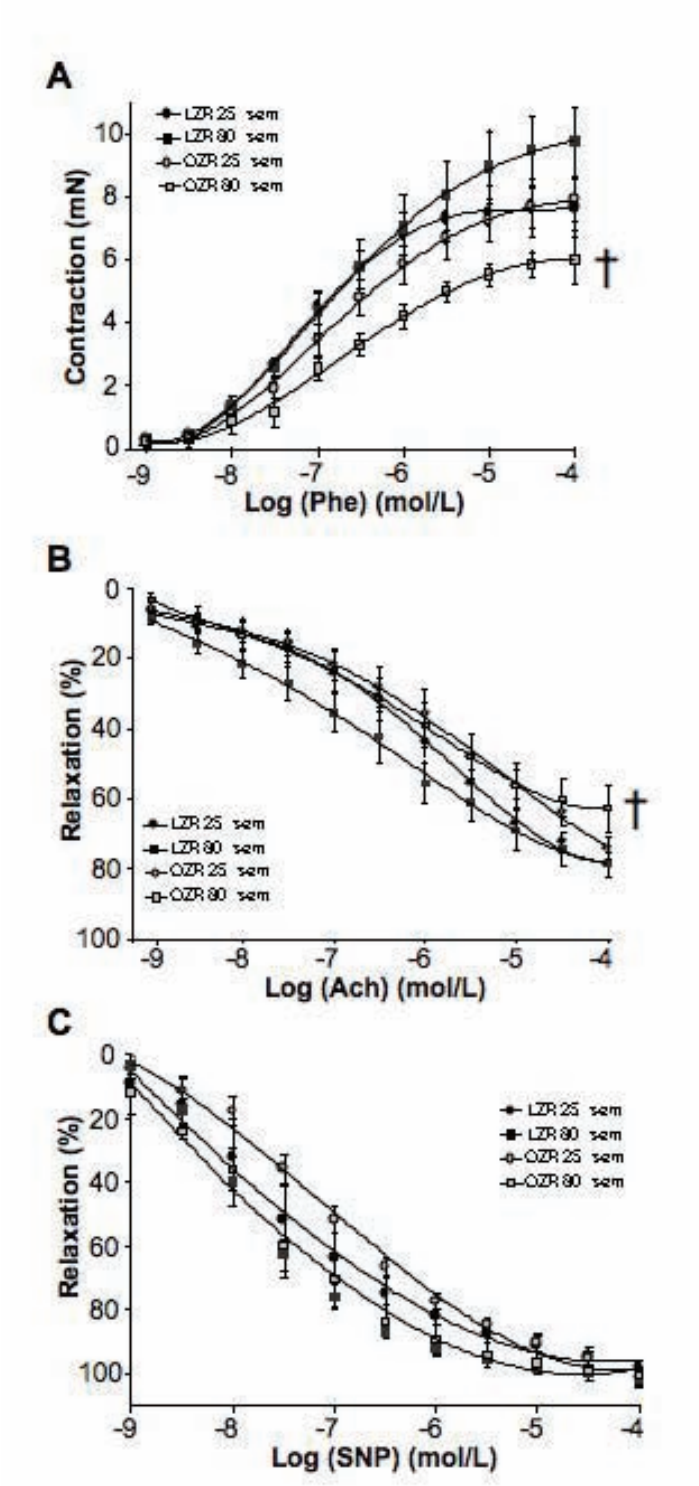


Figure 27. Réactivité vasculaire dans les artères carotides des LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines.

Les courbes dose-réponse des artères carotides chez les rats maigres et obèses âgés de 25 et 80 semaines à la phényléphrine (Phe) (A), à l'acétylcholine (Ach) (B) et au nitroprussiate de sodium (SNP) (C). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. (n = 3-5 dans

chaque groupe). * P < 0,05, 80 semaines vs 25 semaines chez la même souche; † P < 0,05, OZR vs. LZR au même âge

I.5 Altérations de voies de signalisation clés dans la paroi artérielle

Un grand nombre d'études ont montré que les voies de signalisation ERK1/2, p38MAPK et Akt exercent des rôles clés dans les propriétés fonctionnelles de la paroi artérielle, y compris la structure et la modulation du tonus vasculaire (Louis et coll., 2007). Ainsi, nous avons examiné l'expression et l'activation de ces kinases dans les aortes des rats LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines. Comme le montre la Figure 28A, les LZR montrent une augmentation de la phosphorylation de Akt, en vieillissant. Avec l'âge, les OZR présentent une diminution de phosphorylation de p38MAPK et Akt (Figure 28A et B). Les différences de phosphorylation de ces protéines ne sont pas significatives chez les OZR de 80 semaines d'âge, comparativement aux LZR du même âge. Cependant, nous montrons que la phosphorylation de p38MAPK, Akt et ERK1/2 est augmentée de façon significative chez les OZR âgés de 25 semaines par rapport aux LZR de même âge. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que les voies p38MAPK, Akt et ERK1/2 sont activées principalement chez les OZR âgés de 25 semaines, confirmant ainsi leur rôle possible dans l'apparition de la rigidité artérielle. Cependant, cette activation fait défaut dans les aortes des OZR âgés de 80 semaines.

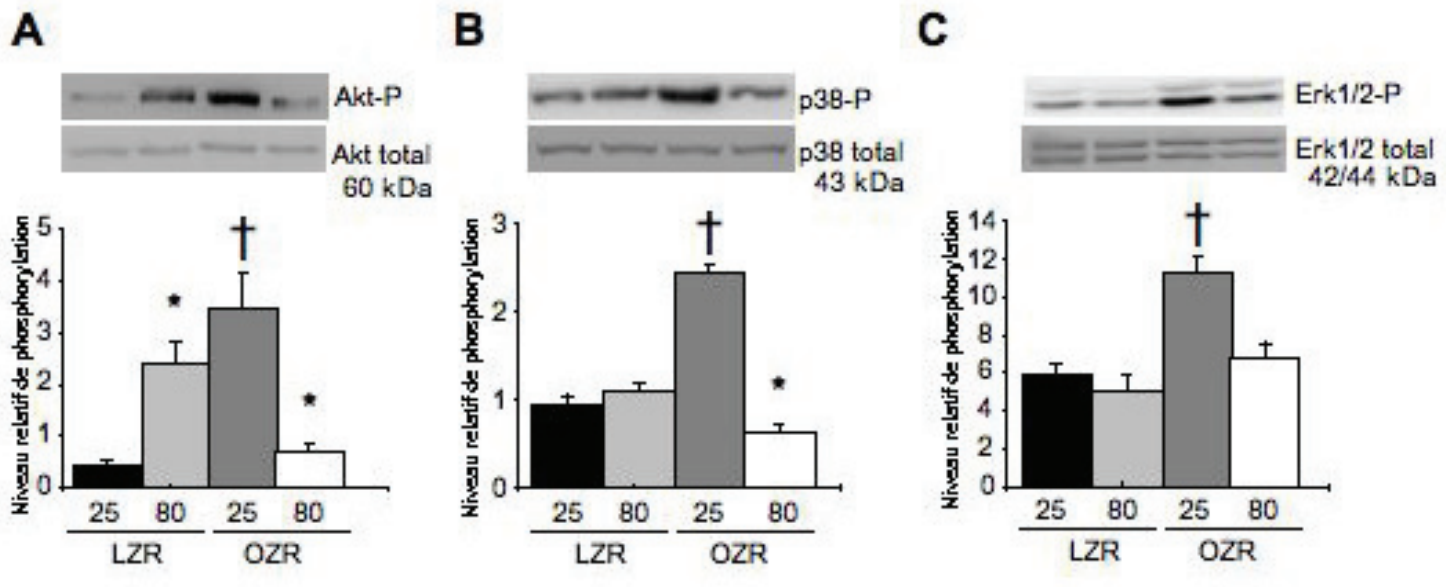


Figure 28. Activation de plusieurs kinases dans les aortes des LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines.

Analyses western blot de lysat aortique des LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines. Les niveaux de phosphorylation de p38MAPK (A), Akt (B) et ERK1/2 (C) sont normalisés à ceux

des protéines totales correspondantes. Les valeurs sont exprimées en moyennes des ratio protéines phosphorylées / protéines totales ± ESM. (n = 9 dans chaque groupe). * P < 0,05, 80 semaines vs 25 semaines chez la même souche; † P < 0,05, OZR vs. LZR au même âge.

I.6 La production d'ERO est corrélée à la déficience vasculaire chez les OZR âgés de 80 semaines

Nous avons mesuré les marqueurs du stress oxydatif pour évaluer si les ERO peuvent être responsables de l'altération de la structure et de la fonction artérielle des OZR à l'âge de 80 semaines. Les TBARS, un marqueur de la peroxydation lipidique, sont augmentés de façon significative avec le vieillissement chez les LZR (Figure 29A). A l'âge de 25 semaines, les OZR présentent une augmentation des TBARS par rapport aux LZR de même âge, sans augmentation supplémentaire à l'âge de 80 semaines. De façon intéressante, l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) n'est pas modifiée par l'âge ou par l'obésité dans notre modèle (Figure 29B).

Nous avons ensuite évalué si le stress oxydatif présent chez les OZR peut causer une inflammation systémique et / ou artérielle. Les taux plasmatiques de MCP-1 sont augmentés avec le vieillissement dans les deux souches (Figure 29C). En outre, MCP-1 est significativement augmenté chez les OZR par rapport aux LZR aux deux âges. Dans l'aorte, la phosphorylation de NFkB est légèrement augmentée avec le vieillissement chez le LZR, alors qu'elle est significativement augmentée chez les OZR à 80 semaines, comparativement à l'âge de 25 semaines (Figure 29D). Cela est cohérent à l'activation de l'inhibiteur de NFkB, IκBα (Figure 29E). Dans le même temps, les taux d'adiponectine plasmatique (facteur anti-inflammatoire) sont augmentés chez les OZR à l'âge de 25 semaines, comparativement aux LZR au même âge, tandis qu'elle est significativement réduite chez les OZR à 80 semaines comparativement aux OZR de 25 semaines (Figure 29F).

Ces données confirment le rôle possible de la peroxydation et de l'inflammation induite par les ERO dans le dysfonctionnement vasculaire des OZR âgés de 80 semaines. L'élévation des taux plasmatiques d'adiponectine pourrait prévenir la réaction pro-inflammatoire chez les obèses à 25 semaines, tandis que des niveaux plus bas chez les animaux âgés pourraient favoriser l'activation de NFκB.

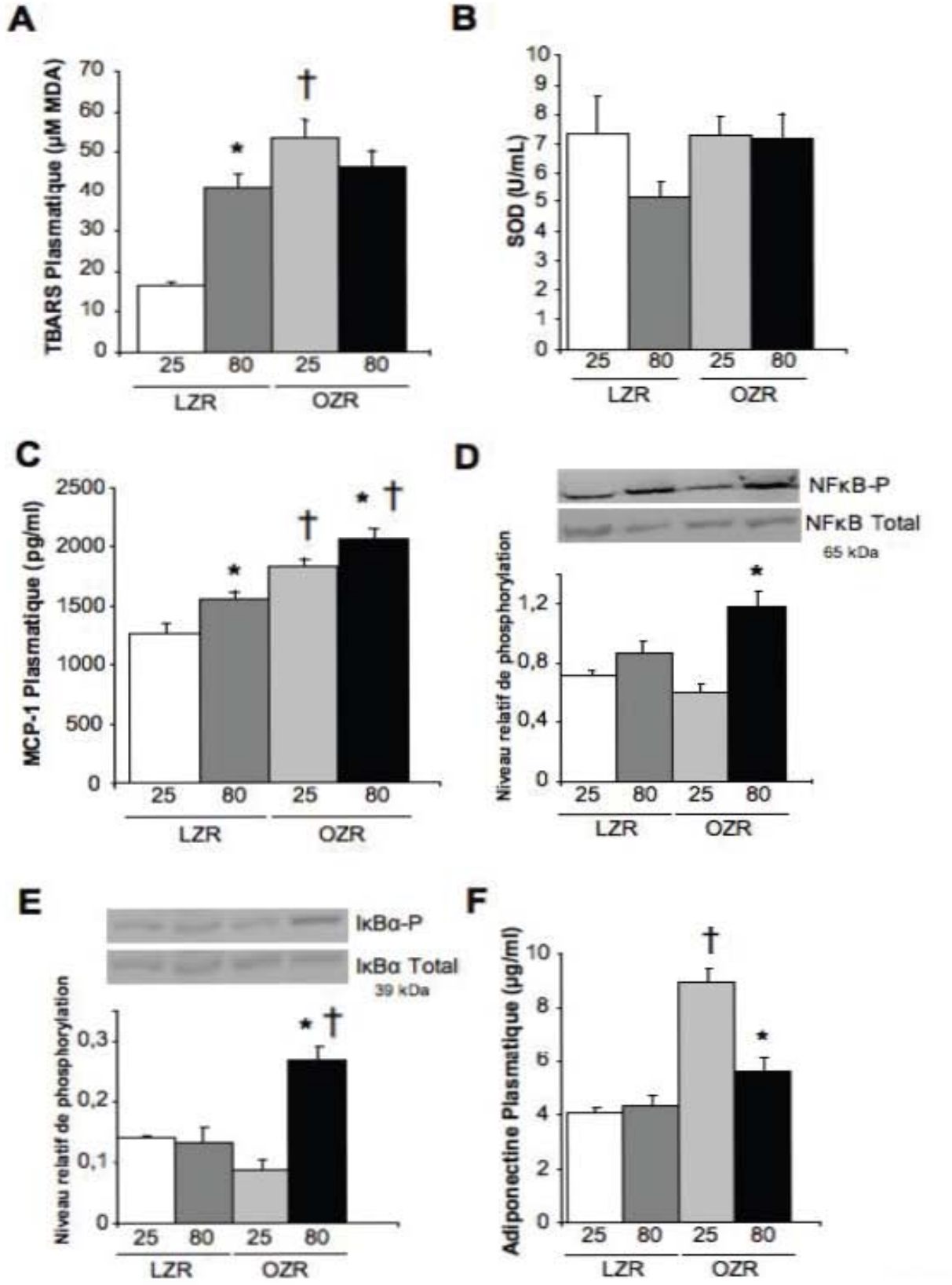


Figure 29. Stress oxydatif et état inflammatoire chez les LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines.

Elisas sur plasma et western blot de lysat aortique chez les LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines. A, Taux plasmatiques des TBARS (µM MDA) B, Activité de la superoxyde dismutase (SOD) circulante. C, Taux plasmatiques du Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1). Niveaux de phosphorylation de NFκB (D) et de IκBα (E) normalisés à ceux des protéines totales correspondantes. Les valeurs sont exprimées en moyennes des ratio protéines phosphorylées / protéines totales ± ESM. (n=9 pour chaque groupe). E. Taux plasmatique d'adiponectine. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. (n = 7-10 dans chaque groupe). * P < 0,05, 80 semaines vs 25 semaines chez la même souche; † P < 0,05, OZR vs. LZR au même âge.

I.7 Effets des AGL sur la dysfonction vasculaire chez les OZR âgés de 80 semaines

Trois sources de données nous ont incités à examiner l'implication potentielle des AGL dans les altérations de la réactivité vasculaire chez les OZR : i / les taux plasmatiques d'AGL sont fortement augmentés chez les OZR, en conséquence à l'insulinorésistance ; ii / les AGL sont connus pour influer directement sur le tonus vasculaire (Lundman et coll., 2001; Edirisinghe et coll., 2006) ; iii / les AGL produisent des ERO (Inoguchi et coll., 2000) et peuvent activer les voies ERK1/2, Akt et p38MAPK (Schauer et Reusch, 2009; Jiang et coll., 2010) qui sont impliqués dans les propriétés contractiles des gros troncs artériels. Ainsi, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle les AGL pourraient affecter la réactivité vasculaire en fonction de l'âge et de l'obésité. À cette fin, des anneaux carotidiens ont été incubés avec de l'acide linoléique, puis nous avons testé la vasoconstriction par la réponse à la Phe, et la vasorelaxation par l'effet de l'Ach.

Alors que l'acide linoléique ne provoque aucune modification chez les LZR, il augmente la contractilité à la Phe chez les OZR aux âges de 25 et 80 semaines (Figure 30A). L'incubation à l'acide linoléique n'a pas modifié la relaxation à l'acétylcholine chez les LZR aux deux âges, ou chez les OZR âgés de 25 semaines (Figure 30B). En revanche, l'acide linoléique inhibe fortement la relaxation par rapport au contrôle chez les OZR âgés de 80 semaines. En l'absence de l'endothélium, l'acide linoléique est sans effet sur la contraction (Figure 30C) et la relaxation (Figure 30D). Ainsi, une augmentation des taux d'AGL potentialise la contraction induite par la phényléphrine chez les OZR quelque soit l'âge, d'une manière dépendante de l'endothélium. En outre, les AGL modifient la relaxation endothélium-dépendante des OZR âgés de 80 semaines.

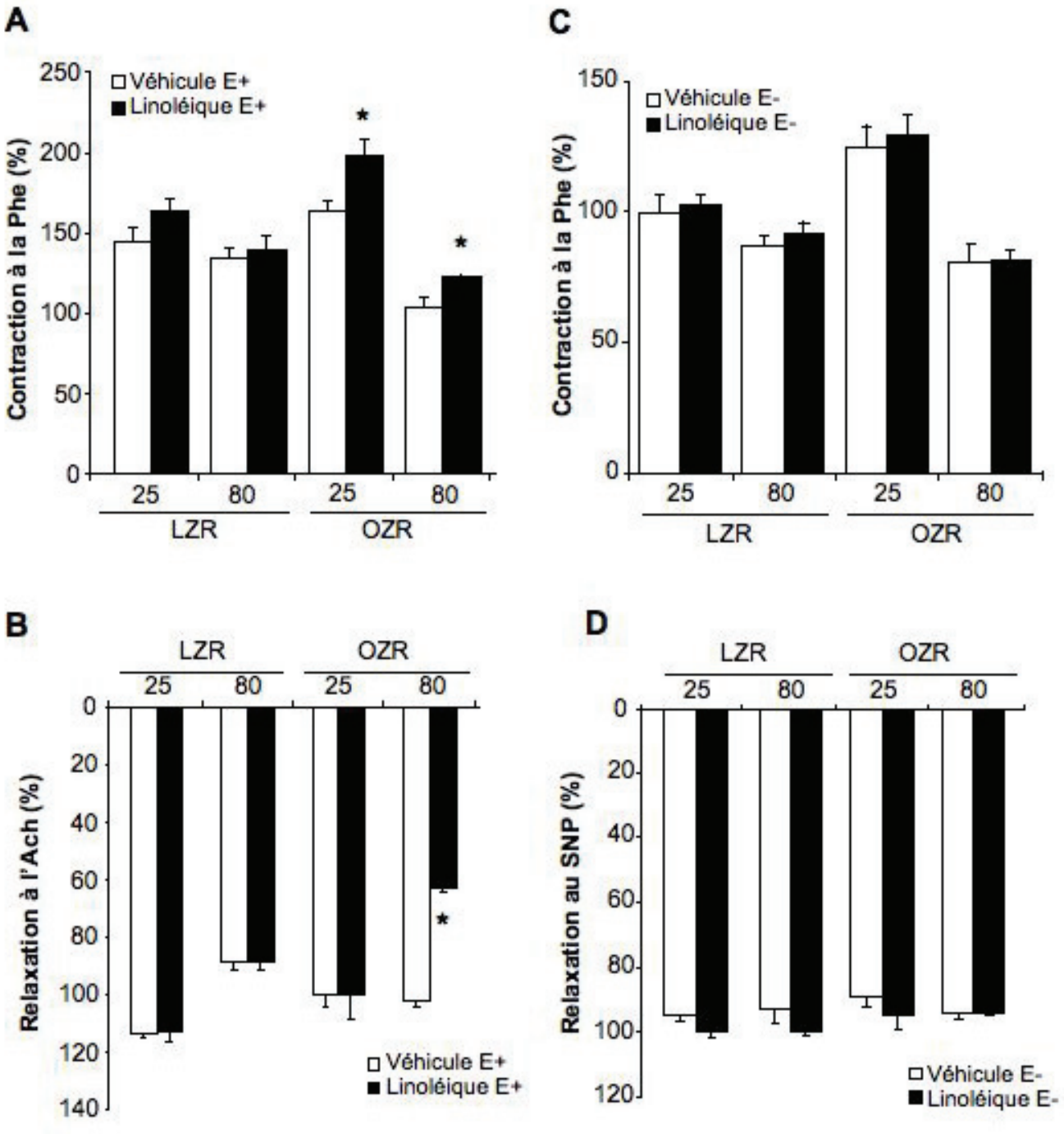


Figure 30. Effets des acides gras libres (AGL) sur la réactivité vasculaire dans des carotides de LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines.

Contraction à la Phe à la concentration 10^{-5}M (A) et relaxation à l'Ach à la concentration de 10^{-4}M (B) sur des anneaux carotidiens intacts (E+) de LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines. Contraction à la Phe à la concentration 10^{-5}M (C) et relaxation au SNP à la concentration de 10^{-4}M (D) sur des anneaux carotidiens sans endothélium (E-) de LZR et OZR âgés de 25 et 80 semaines. La contraction et la relaxation sont exprimés en % de la réponse obtenue aux mêmes agents avant le traitement (correspondant à 100%) à la BSA

(Véhicule), ou à l'acide linoléique. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. (au moins 3 anneaux/animal, dans 3 à 5 animaux pour chaque groupe). * P < 0.05, acide linoléique *vs* véhicule.

II Etude sur les souris Klotho

II.1 Caractéristiques morphologiques

Le tableau 6 présente les caractéristiques morphologiques des souris.

En vieillissant, les souris ne portant pas la mutation ($Kl^{+/+}$) ont des poids corporel et cardiaque significativement augmentés. Les poids rénal et ventriculaire ne sont pas différents entre les deux âges (6 et 12 mois). Lorsqu'on ajuste les poids des organes au poids corporel, il n'y a aucune différence pour les poids cardiaque et rénal entre les deux âges. Avec le vieillissement, les souris hétérozygotes pour la mutation ($Kl^{+/-}$) ont également une augmentation des poids corporels et cardiaque, tandis que le poids rénal ne change pas. Le poids cardiaque ajusté au poids corporel reste plus élevé chez les souris $Kl^{+/-}$ par rapport aux souris $Kl^{+/+}$, montrant une hypertrophie cardiaque chez les souris $Kl^{+/-}$ à l'âge de 12 mois.

Tableau 6 : Caractéristiques morphologiques des souris Kl +/+ et Kl +/- à 6 et 12 mois

	Kl +/+		Kl +/-		ANOVA		
	6 mois	**12 mois**	**6 mois**	**12 mois**	**Age**	**Souche**	**Interaction**
N	25	16	19	15			
Poids corporel (g)	27 ± 1	30 ± 1 *	26 ± 1	29 ± 1 *	< 0.001	NS	NS
Poids du Cœur (g)	0,170 ± 0,006	0,183 ± 0,010 *	0,160 ± 0,008	0,193 ± 0,007 *	< 0.001	NS	NS
Poids du Cœur ajusté	0,623 ± 0,014	0,602 ± 0,025	0,607 ± 0,021	0,671 ± 0,025 †	NS	< 0.05	NS
Poids moyen des Reins	0,229 ± 0,010	0,272 ± 0,013	0,245 ± 0,035	0,262 ± 0,015	NS	NS	NS
Poids des reins ajusté	0,833 ± 0,022	0,898 ± 0,035	0,896 ± 0,084	0,895 ± 0,024	NS	NS	NS
N	22	4	12	10			
Poids des ventricules du cœur	0,142 ± 0,006	0,164 ± 0,008	0,146 ± 0,008	0,153 ± 0,005	< 0.05	NS	NS

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. * P < 0,05, 6 mois vs 12 mois chez la même souche ; † P < 0,05, $Kl^{+/-}$ vs. $Kl^{+/+}$ au même âge.

Kl+/+ : souris Klotho non mutées ; Kl+/- : souris Klotho hétérozygotes pour la mutation.

II.2 Paramètres hémodynamiques chez l'animal éveillé

La figure 31 présente la PAS et la FC chez l'animal conscient en fonction de l'âge et du génotype. Avec le vieillissement, les souris $Kl^{+/+}$ montrent une augmentation significative de leur fréquence cardiaque, sans modification de leur PAS. Avec l'âge, les souris $Kl^{+/-}$ ne montrent pas de modification de leur PAS et de leur FC.

A l'âge de 6 mois, les souris $Kl^{+/-}$ présentent une augmentation significative de leur PAS par rapport aux contrôles $Kl^{+/+}$, qui disparaît à l'âge de 12 mois. En revanche, la FC est identique à l'âge de 6 mois, alors qu'elle est significativement diminuée chez les souris $Kl^{+/-}$ par rapport à leur témoin $Kl^{+/+}$ du même âge.

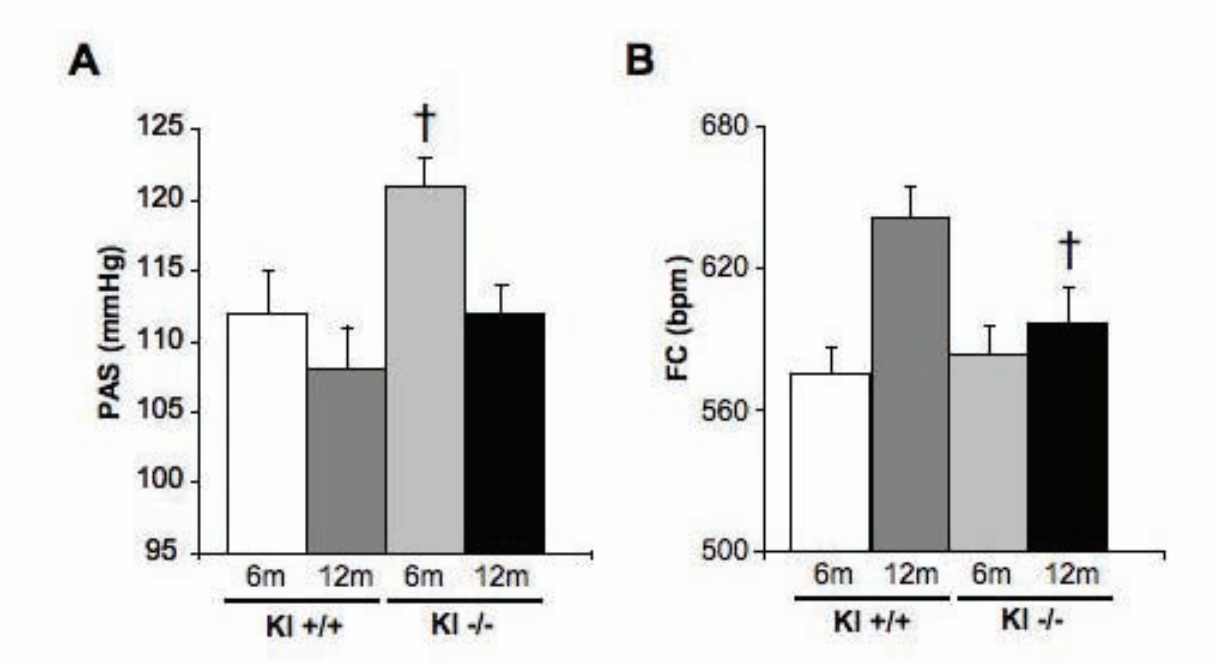


Figure 31. Hémodynamique chez l'animal éveillé.

Mesures effectuées par pléthysmographie sur les souris Kl+/+ et Kl+/- à 6 et 12 mois. A. Pression systolique. B. Fréquence cardiaqueLes valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. * P < 0,05, 6 mois vs 12 mois chez la même souche ; † P < 0,05, $Kl^{+/-}$ vs. $Kl^{+/+}$ au même âge. Kl+/+ : souris Klotho non mutées ; Kl+/- : souris Klotho hétérozygotes pour la mutation ; Einc : module élastique ; PA : pression artérielle ; PAM : pression artérielle moyenne.

II.3 Rigidité artérielle

La mécanique artérielle mesurée sur la carotide (table 7 et figure 32) correspond à une mesure de rigidité sectionnelle. Il n'y a pas de différence significative pour les mesures de pression artérielle, de fréquence cardiaque, de diamètre de l'artère ou de distensibilité que ce soit en fonction de l'âge ou du génotype. La contrainte circonférentielle mesurée à 1000 kPa est diminuée chez les Kl+/- à l'âge de 6 mois par rapport aux Kl+/- de 12 mois, mais cette différence n'existe pas entre les souris Kl+/+.

La mesure de la VOP permet une mesure de rigidité globale sur le tronc aortique. Le tableau 8 présente la mesure de la VOP ajustée ou non, ainsi que les paramètres hémodynamique des animaux pendant la mesure. La pression artérielle est identique dans tous les groupes. En revanche, la FC est diminuée chez les Kl+/- par rapport aux Kl+/+ à l'âge de 6 mois, tandis qu'elle est augmentée par rapport aux témoins Kl+/+ à l'âge de 12 mois. La VOP est identique pour les 4 groupes de souris, quelque soit l'âge ou le génotype. Le β-index (ajustement de la VOP à la pression artérielle) est diminué uniquement chez les souris Kl+/- à l'âge de 12 mois par rapport à leurs contrôles du même âge. A la vue des modifications des FC anesthésiées, nous avons choisi d'ajuster la VOP à une fréquence cardiaque arbitraire de 375 bpm (voir matériel et méthodes). Avec cet ajustement, la VOP est inversement corrélée aux FC : à l'âge de 6 mois, la VOP est significativement augmentée chez les Kl+/- par rapport aux Kl+/+, tandis qu'à l'âge de 12 mois, la VOP est diminuée chez les Kl+/- par rapport aux contrôles Kl+/+, et significativement diminuée par rapport aux Kl+/- de 6 mois.

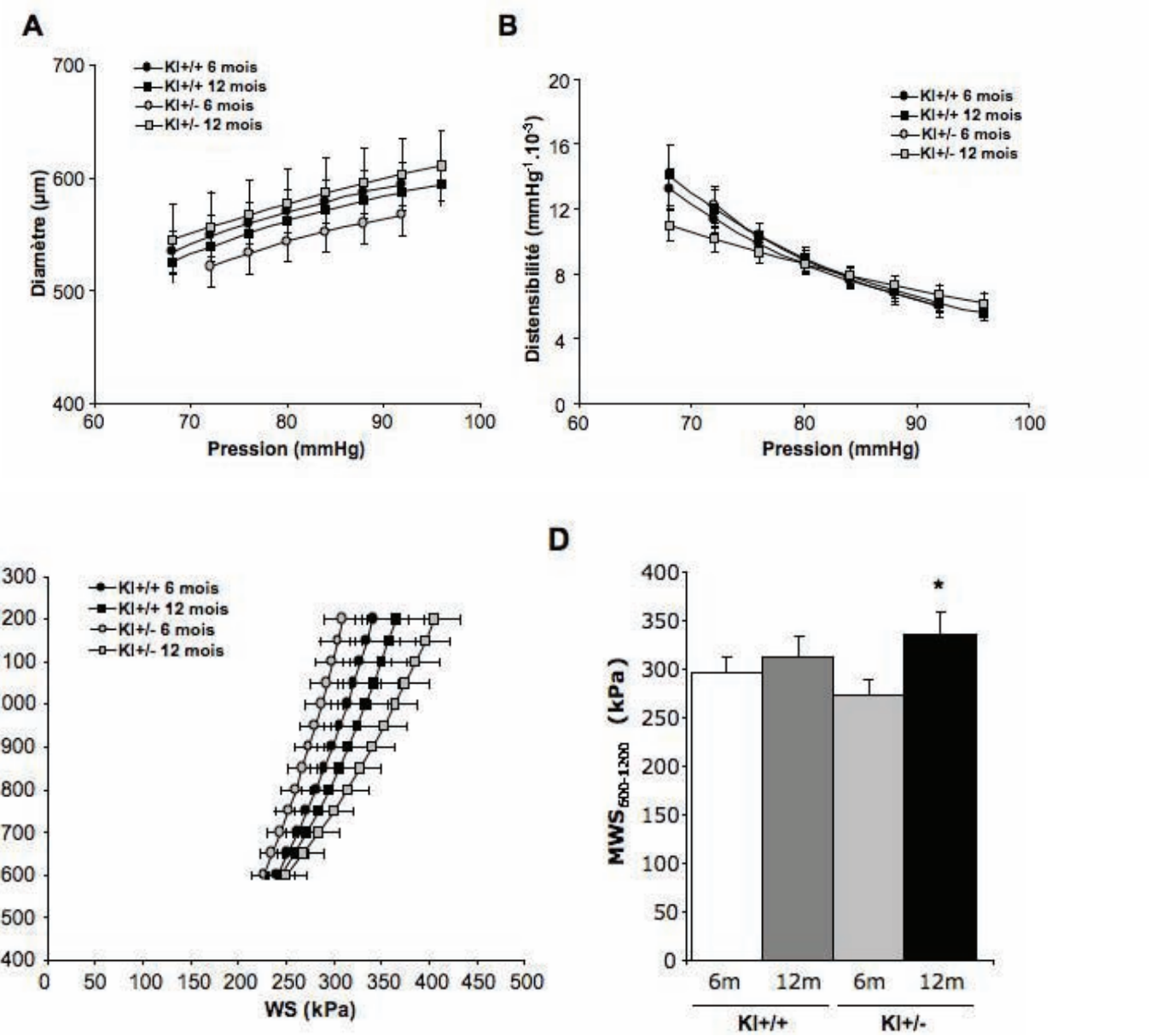


Figure 32. Propriétés mécaniques des artères carotides chez les Kl+/+ et Kl+/- âgés de 6 et 12 mois.

A. Evolution du diamètre carotidien en fonction de la pression lors d'un cycle systolo-diastolique. B, Courbe de la distensibilité carotidienne en fonction de la pression artérielle. C, Courbe du module élastique incrémentiel (Einc) en fonction de la contrainte circonférentielle (WS) chez les rats maigres et obèses âgés de 25 et 80 semaines. D, Contrainte pariétale carotidienne moyenne dans une gamme de module élastique de 600 à 1200 kPa ($MWS_{600-1200}$) chez les mêmes souris. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. (n = 13 à 28 dans chaque groupe).

Tableau 7 : Mécanique de l'artère carotidienne des souris Kl +/+ et Kl +/- à 6 et 12 mois

	Kl +/+		Kl +/-		ANOVA		
	6 mois	**12 mois**	**6 mois**	**12 mois**	**Age**	**Souche**	**Interaction**
N	28	16	16	13			
PA Diastolique (mmHg)	65 ± 1	66 ± 2	68 ± 2	68 ± 3	NS	NS	NS
PA Systolique (mmHg)	95 ± 2	96 ± 3	96 ± 3	98 ± 3	NS	NS	NS
PA Moyenne (mmHg)	75 ± 2	76 ± 2	77 ± 3	76 ± 2	NS	NS	NS
Pression Pulsée (mmHg)	29 ± 1	30 ± 3	28 ± 2	32 ± 3	NS	NS	NS
Fréquence Cardiaque (bpm)	437 ± 5	414 ± 10	433 ± 11	443 ± 7	NS	NS	NS
Diamètre Diastolique (mm)	0.50 ± 0.03	0.50 ± 0.02	0.48 ± 0.02	0.54 ± 0.04	NS	NS	NS
Diamètre Systolique (mm)	0.61 ± 0.03	0.61 ± 0.03	0.56 ± 0.02	0.64 ± 0.04	NS	NS	NS
Diamètre à PAM	0.55 ± 0.03	0.55 ± 0.03	0.52 ± 0.02	0.58 ± 0.04	NS	NS	NS
Compliance à PAM	2.63 ± 0.28	2.50 ± 0.26	2.07 ± 0.12	2.22 ± 0.24	NS	NS	NS
Distensibilité à PAM (mm $Hg^{-1}.10^{-3}$)	10.48 ± 0.79	10.29 ± 0.78	9.82 ± 0.87	8.82 ± 0.65	NS	NS	NS
Einc à PAM (kPa)	507 ± 58	485 ± 58	564 ± 111	646 ± 101	NS	NS	NS
Wall Stress à PAM (kPa)	208 ± 14	211 ± 19	199 ± 21	242 ± 28	NS	NS	NS
Distensibilité isobarique (84 mmHg)	7.59 ± 0.45	7.83 ± 0.48	7.72 ± 0.70	7.87 ± 0.61	NS	NS	NS
Wall Stress / Einc à 500 kPa	215 ± 53	222 ± 46	206 ± 46	243 ± 63	NS	NS	NS
Wall Stress / Einc à 1000 kPa	314 ± 88	334 ± 98	287 ± 69	364 ± 88 *	< 0.05	NS	NS

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. * P < 0,05, 6 mois vs 12 mois chez la même souche ; † P < 0,05, $Kl^{+/-}$ vs. $Kl^{+/+}$ au même âge. Kl+/+ : souris Klotho non mutées ; Kl+/- : souris Klotho hétérozygotes pour la mutation ; Einc : module élastique ; Wall Stress : contrainte circonférentielle ; PA : pression artérielle ; PAM : pression artérielle moyenne.

Tableau 8 : Vitesse de l'onde de pouls et mesures associées chez les souris Kl +/+ et Kl +/- à 6 et 12 mois

	Kl +/+		Kl +/-		ANOVA		
	6 mois	**12 mois**	**6 mois**	**12 mois**	**Age**	**Souche**	**Interaction**
N	21	16	16	14			
PA Systolique (mmHg)	96 ± 4	93 ± 5	99 ± 4	99 ± 3	NS	NS	NS
PA Diastolique (mmHg)	69 ± 3	65 ± 5	73 ± 4	72 ± 3	NS	NS	NS
PA Moyenne (mmHg)	82 ± 3	78 ± 5	85 ± 4	85 ± 3	NS	NS	NS
Pression Pulsée (mmHg)	28 ± 2	27 ± 3	27 ± 2	27 ± 2	NS	NS	NS
Fréquence Cardiaque (bpm)	445 ± 6	416 ± 15	407 ± 16 †	452 ± 10 †	NS	NS	< 0,001
VOP (m/s)	3,02 ± 0,15	3,62 ± 0,35	3,57 ± 0,34	3,21 ± 0,36	NS	NS	0,08
B index	0,29 ± 0,02	0,52 ± 0,09	0,42 ± 0,08	0,34 ± 0,07 *	NS	NS	< 0,05
VOP ajustée à 375 bpm (m/s)	2,49 ± 0,10	3,13 ± 0,34	5,08 ± 1,91 †	2,57 ± 0,24 *	NS	< 0,05	< 0,05

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. * P < 0,05, 6 mois vs 12 mois chez la même souche ; † P < 0,05, $Kl^{+/-}$ vs. $Kl^{+/+}$ au même âge. Kl+/+ : souris Klotho non mutées ; Kl+/- : souris Klotho hétérozygotes pour la mutation ; PA : pression artérielle ; VOP : vitesse de l'onde de pouls.

II.4 Géométrie carotidienne

Le tableau 9 présente les mesures d'histomorphométrie réalisées sur des coupes transversales des carotides. Les mesures de périmètre, d'épaisseur pariétale et de MCSA sont identiques dans les 4 groupes. Le calcul de la contrainte pariétale, en fonction de la pression intraluminale et de l'épaisseur (formule de Laplace), est identique également.

Tableau 9 : Histomorphométrie carotidienne des souris Kl +/+ et Kl +/- à 6 et 12 mois

	Kl +/+		Kl +/-		ANOVA		
	6 mois	**12 mois**	**6 mois**	**12 mois**	**Age**	**Souche**	**Interaction**
N	8	11	11	13			
Périmètre (µm)	1 273 ± 62	1 326 ± 46	1 195 ± 65	1 244 ± 45	NS	NS	NS
MCSA ($\mu m^2.10^3$)	24,6 ± 1,9	23,4 ± 1,2	25,5 ± 2,2	21,6 ±1,1	NS	NS	NS
Epaisseur moyenne (µm)	22 ± 2	20 ± 1	24 ± 2	21 ± 1	NS	NS	NS
Contrainte pariétale	778 ± 127	907 ± 80	678 ± 94	811 ± 72	NS	NS	NS

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. * P < 0,05, 6 mois vs 12 mois chez la même souche ; † P < 0,05, $Kl^{+/-}$ vs. $Kl^{+/+}$ au même âge. Kl+/+ : souris Klotho non mutées ; Kl+/- : souris Klotho hétérozygotes pour la mutation ; MCSA : media cross-sectionnal area.

II.5 Stress oxydatif

La figure 33 présente les mesures de stress oxydatif effectuées dans le plasma des souris Klotho. Avec le vieillissement, le glutathion total augmente chez les souris $Kl^{+/+}$, tandis qu'il n'y a pas de modification des TBARS et de l'activité SOD. En vieillissant, les souris $Kl^{+/-}$ présentent une diminution de l'activité SOD, sans modification des TBARS et du glutathion. A l'âge de 6 mois, les souris $Kl^{+/-}$ montrent une augmentation du glutathion total par rapport aux témoins $Kl^{+/+}$, sans modification des TBARS et de l'activité SOD. Au contraire, à l'âge de 12 mois, les souris $Kl^{+/-}$ montrent une diminution du glutathion par rapport aux contrôles $Kl^{+/+}$, là encore sans modifications des TBARS et de l'activité SOD.

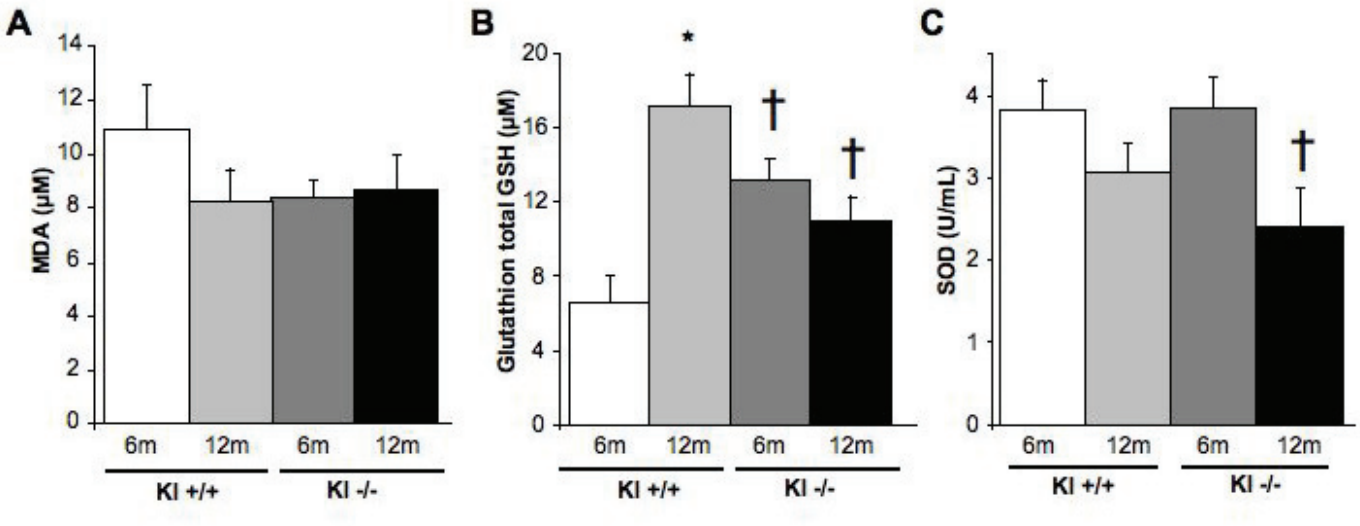


Figure 33. Etat oxydatif des souris Kl+/+ et Kl+/- âgés de 6 et 12 mois.

Elisas sur plasma chez les souris $Kl^{+/+}$ et $Kl^{+/-}$ âgées de 6 et 12 mois. A, Taux plasmatiques des TBARS (µM MDA). B, Taux plasmatiques de la forme oxydée du glutathion (GSH). C, Activité de la superoxyde dismutase (SOD) circulante. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± ESM. (n = 7-10 dans chaque groupe). * $P < 0,05$, 6 mois vs 12 mois chez la même souche ; † $P < 0,05$, $Kl^{+/-}$ vs. $Kl^{+/+}$ au même âge.

DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons montré que les manifestations du vieillissement artériel pouvaient être modifiées d'une part par l'obésité, facteur environnemental, mais aussi d'autre part, dans une moindre mesure, par la mutation de Klotho, facteur génétique.

La première partie de ce travail est la première à évaluer à la fois *in vivo* et *in vitro* le phénotype artériel de rats Zucker en fin de vie. Nous avons montré que les troubles métaboliques présents chez le rat Zucker obèse accentuaient le vieillissement artériel, démontré par une augmentation de la rigidité artérielle et des altérations de la structure de l'aorte. *In vitro*, ce modèle présente des altérations de la réactivité vasculaire carotidienne. Enfin, nous avons montré que les AGL inhibent la relaxation endothélium-dépendante et potentialisent la contraction chez les rats obèses à 80 semaines, indiquant un dysfonctionnement majeur des cellules endothéliales, alors que la fonction des cellules musculaires lisses est restée intacte. Nos données montrent clairement une action délétère de l'obésité et des troubles métaboliques associés sur le vieillissement de la fonction et de la structure des gros troncs artériels.

L'état métabolique du rat Zucker a déjà été étudié. À l'âge de 25 semaines, les OZR présentent une résistance à l'insuline et une dyslipidémie, ce qui est cohérent avec d'autres études (Kasiske et coll., 1992; Subramanian et MacLeod, 2003; Galisteo et coll., 2005). Le facteur prédominant qui entraîne une détérioration de l'état métabolique des rats Zucker est la résistance à l'insuline associée à l'obésité (Szocs et coll., 2008). A partir de 7 semaines, les rats Zucker développent une hyperglycémie, une hyperinsulinémie et une dyslipidémie (hypertriglycéridémie, hypercholestérolémie, augmentation des acides gras plasmatiques) (Szocs et coll., 2008). La plus forte expression de protéines de la matrice (fibronectine, collagène IV) (Sista et coll., 2005) et une diminution de la relaxation endothélium-dépendante (Agouni et coll., 2009) chez les animaux obèses suggèrent la rigidité artérielle avant l'âge de 20 semaines (Cox et Kikta, 1992). Ainsi, le rat Zucker a un phénotype qui rappelle le syndrome métabolique chez l'homme (Panchal et Brown, 2011). Des études analysant l'influence de l'obésité sur le vieillissement sont difficiles à élaborer chez les personnes atteintes d'un syndrome métabolique, en raison de leur forte mortalité (Benetos et coll., 2008). Par conséquent, le modèle du rat Zucker représente un modèle expérimental pertinent pour étudier les interactions de l'obésité et du vieillissement.

Notre étude montre que les vieux OZR présentent plusieurs manifestations de vieillissement accéléré comme l'insuffisance rénale avec anémie, l'hypertension artérielle

systolique et la variabilité excessive de pression artérielle observée pendant l'anesthésie. En effet, les vieux OZR ont montré une diminution plus forte de la PAS à l'anesthésie (par rapport à la mesure de la PAS de l'animal conscient) que les vieux LZR. Bien que ce phénomène peut apparaître surprenant, il a été démontré chez l'homme que pendant l'anesthésie, les sujets âgés ayant le plus mauvais état artériel ont été ceux qui ont montré la baisse la plus importante de la pression artérielle (Alecu et coll., 2010).

L'insuffisance rénale ne se trouve que chez les vieux OZR, ce qui est concordant avec une autre étude, montrant que cette maladie était la principale cause de décès chez les OZR (Johnson et coll., 1997). L'insuffisance rénale représente un déterminant important de la rigidité artérielle liée au processus du vieillissement artériel accéléré. Les altérations vasculaires observées dans cette étude sont une expression supplémentaire du vieillissement artériel excessif des OZR. De façon intéressante, la plupart de ces manifestations cardiovasculaires et rénales sont similaires à celles observées chez les patients âgés souffrant de troubles métaboliques.

Les effets du vieillissement sur la structure et la fonction artérielle ont été démontrés dans des modèles de rat non-obèses. Par exemple, Michel et al. (Michel et coll., 1994) ont trouvé chez le rat WAG/Rij une diminution du rapport élastine / collagène chez des animaux de 30 mois comparativement à des animaux de 6 mois. Chez les rats Zucker obèses, l'apparition de la rigidité artérielle a déjà été montrée, mais chez des animaux beaucoup plus jeunes (Sista et coll., 2005). Nos résultats montrent que la structure artérielle est affectée par la combinaison de l'obésité et du vieillissement. Nous avons constaté qu'à l'âge de 80 semaines, l'obésité et les désordres métaboliques associés provoquent des changements plus prononcés dans le rapport élastine / collagène.

Les changements dans la matrice extracellulaire (MEC), y compris ceux du collagène et de l'élastine, production des cellules musculaires lisses, sont influencés par les molécules d'adhésion, qui se fixent aux cellules de la matrice (Bezie et coll., 1998a). En conséquence, nous avons observé dans notre étude que la fibronectine était significativement augmentée chez les OZR à 80 semaines par rapport aux LZR de même âge. Une autre étude a démontré que la fibronectine est augmentée dans un modèle de rat hypertendu induit par le sel et l'aldostérone (Lacolley et coll., 2002). Ainsi, nos données confirment le rôle de la fibronectine dans la rigidité artérielle, cette protéine augmentant l'attachement des cellules à la MEC (Lacolley et coll., 2009).

Le tonus vasculaire mesuré sur des anneaux carotidiens isolés à partir des LZR et OZR de 25 et 80 semaines est modifié en réponse à la Phe en fonction de l'âge ou de l'adiposité (soit sur Emax soit sur pD2; Figure 3). À 80 semaines, les valeurs de Emax en

réponse à l'Ach ont été réduites chez les OZR par rapport aux LZR. L'interaction de l'âge et de l'obésité est donc nécessaire pour révéler un effet vasodilatateur de l'Ach modifié. Il n'existe actuellement pas de consensus clair dans la littérature sur ce sujet. En effet, alors que de nombreuses études ont signalé une diminution de la relaxation endothélium-dépendante en réponse à l'Ach (Walker et coll., 1999; Galisteo et coll., 2005), d'autres travaux décrivent une augmentation de la réponse à l'Ach chez les obèses à lâge de 24 (Cox et Kikta, 1992) ou 32 semaines (Subramanian et MacLeod, 2003). Ces variations semblent dépendre, au moins en partie, des différences dans la préparation artérielle utilisée, mais aussi des variations liées à l'âge. Néanmoins, nos données sur la relaxation endothélium-indépendante sont concordantes avec d'autres études (Galisteo et coll., 2005; Yang et coll., 2007) Cependant, ces mesures ont été effectuées chez des animaux jeunes, la comparaison est donc difficile à établir. Il a également été montré dans les artères mésentériques, que les OZR présentent une dysfonction endothéliale à l'âge de 12 mois (Bouvet et coll., 2007). Un des principaux résultats de notre étude est la démonstration des variations dépendantes de l'âge de la réactivité vasculaire. Dans l'ensemble, tandis que les propriétés de contraction ou de relaxation des gros troncs artériels sont perturbées dans les anneaux de carotide intacte des rats très vieux et / ou obèses en réponse à la Phe ou à l'Ach, l'effet vasodilatateur du SNP est conservé dans les anneaux sans endothélium. Ceci suggère fortement que, si la fonction endothéliale est endommagée, la réponse au NO dans les cellules musculaires lisses vasculaires reste inchangée, même chez des animaux très vieux.

Une cause connue de la réduction de la biodisponibilité du NO est l'augmentation de la production de ERO (Koh et coll., 2009). Dans notre étude, des dommages oxydatifs plus importants ont été observés chez les rats obèses par rapport aux témoins, mais l'inflammation artérielle, évaluée par l'activation de la voie NFκB, est présente chez les obèses uniquement à l'âge de 80 semaines. Fait intéressant, l'adiponectine plasmatique est augmentée chez les OZR à 25 semaines, malgré la présence d'une insulino-résistance. Il a été démontré récemment que l'adiponectine réduit l'inflammation et le stress oxydatif dans l'aorte de souris knock-out pour l'adiponectine (Lee et coll., 2011). En outre, cette étude a montré que les souris adiponectine-knock-out avaient une diminution de la vasodilatation endothélium-dépendante, ce qui suggère que l'adiponectine joue un rôle central dans la prévention de la dysfonction endothéliale. Chez les rats Zucker, des études antérieures ont rapporté des taux plasmatiques d'adiponectine soit augmentés (Oana et coll., 2005 16) soit diminués (Lacolley et coll., 2002; Galisteo et coll., 2005; Szocs et coll., 2008) chez les rats obèses. Les concentrations d'adiponectine plasmatiques élevées chez les OZR 25 semaines observées dans notre étude pourrait refléter un mécanisme de protection pour retarder l'apparition de la dysfonction endothéliale, qui est un acteur majeur de l'apparition de la rigidité artérielle. La

baisse ultérieure des taux d'adiponectine, chez les OZR à l'âge de 80 semaines, peut correspondre à un défaut dans le mécanisme de protection, résultant dans un état pro-inflammatoire, ce qui conduit à la dysfonction endothéliale, liée à la rigidité artérielle.

Il a été récemment démontré que l'élévation aiguë des AGL plasmatiques active la voie pro-inflammatoire NFκB (Nuclear Factor-KappaB) (Itani et coll., 2002), par l'intermédiaire de l'activation de PKC (protein kinase C) et IKK (IκB kinase) (Gao et coll., 2004). Certaines données suggèrent également que l'activation de IKK et de NFκB médiée par les AGL peut être, au moins en partie, médiée par le récepteur Toll like receptor-4 (Shi et coll., 2006). En outre, puisque l'activation de la voie NFκB peut se traduire par une augmentation de MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) circulant (Boden et coll., 2005), il soutient l'idée que les AGL représentent un premier lien entre l'obésité et le développement des lésions inflammatoires. Dans notre étude, les AGL plasmatiques sont augmentés chez les OZR de 25 semaines, et cela peut conduire à des dommages oxydatifs et à l'inflammation systémique. Cependant, la structure et la fonction artérielle n'ont été que légèrement modifiés à cet âge. L'augmentation précoce des AGL, entraînant une modification des voies de signalisation dans l'aorte, peut être une cause des altérations vasculaires observées à 80 semaines. En outre, les taux d'AGL plasmatiques demeurent plus élevés chez les OZR à 80 semaines comparativement aux LZR du même âge.

Les fractions d'AGL les plus importantes dans le plasma chez le rat sont les acides palmitique (25,5%) et linoléique (23.6%) (Yamazaki et coll., 1991). Ces AGL ont été testés en fonction de leur concentration plasmatique moyenne chez les rats Zucker. Dans notre étude, les acides linoléique et palmitique diminuent la relaxation induite par l'Ach chez les OZR de 80 semaines, et augmentent la contractilité maximum des anneaux carotidiens des rats obèses. Ceci est concordant avec les données obtenues dans des anneaux aortiques de lapins, où les AGL saturés antagonisent les effets de l'Ach (Edirisinghe et coll., 2006) et dans des anneaux d'artère fémorale de rats où les AGL antagonisent également ces effets (Lundman et coll., 2001). Nous avons également mis en avant que les effets des AGL sont endothélium-dépendants, puisque la relaxation induite par le SNP n'est pas affectée par les AGL. Il a été émis l'hypothèse que ce phénomène pouvait être dépendant de la génération d'ERO (Edirisinghe et coll., 2006; Chinen et coll., 2007). Une contribution originale de ce travail est la démonstration de cet effet endothélium-dépendant chez un modèle animal d'âge très avancé, les rats Zucker obèses de 80 semaines.

Nos résultats sur la contractilité *in vitro* appuyent l'hypothèse d'une action α1-adrénergique provoquée par les AGL, comme décrit précédemment chez le rat (Grekin et coll., 1997) et chez l'homme (Egan et coll., 1989; Stepniakowski et coll., 1995). En effet, Grekin et al (Grekin et coll., 1997) ont montré une augmentation de la tension artérielle après

l'administration d'acide oléique par voie intraveineuse, qui a été atténuée en utilisant la prazosine, un antagoniste α1-adrénergique. Dans les patients obèses hypertendus, l'augmentation des AGL plasmatiques réduit considérablement l'EC50 de Phe nécessaire à la vasoconstriction (Egan et coll., 1989). Par conséquent, la dysfonction endothéliale induite par les AGL observée dans notre modèle peut expliquer l'augmentation de la PAS chez les OZR à 80 semaines.

Il a également été démontré que les AGL pouvait médier la phosphorylation de Akt, p38MAPK et ERK1/2 dans les cellules musculaires lisses (Schauer et Reusch, 2009), induisant ainsi la prolifération, l'apoptose et une diminution de la production de NO respectivement. Plus spécifiquement, l'acide palmitique augmente l'activation de p38MAPK dans plusieurs types cellulaires (Gao et coll., 2010 ; Jiang et coll., 2010), ce qui entraîne l'apoptose ou l'insulino-résistance. Dans notre étude, nous avons démontré que la phosphorylation de p38MAPK, Akt et ERK1/2 est significativement augmentée chez les OZR à l'âge de 25 semaines par rapport à leurs contrôles, alors que cette différence est moindre chez les OZR de 80 semaines. Ce profil de phosphorylation est parallèle aux concentrations d'AGL plasmatiques mesurées dans nos animaux. En effet, les OZR de 25 semaines présentent le plus haut taux d'AGL, contrairement à ceux des LZR de 25 semaines et des OZR de 80 semaines. Ces observations suggèrent que les effets des AGL sur la relaxation vasculaire peut dépendre de l'activation de p38MAPK, Akt et de ERK1/2.

En conclusion, nous montrons que les troubles de l'obésité et des désordres métaboliques associés agissent en synergie avec le grand vieillissement pour modifier la structure et la fonction vasculaire *in vivo* et *in vitro*, en ciblant les propriétés endothéliales. L'augmentation précoce des AGL plasmatiques, suivie par la production de ERO, l'activation de la voie NFκB et la modification de la réactivité d'anneaux carotidiens à Phe et Ach induite par les FFA, sont quelques-uns des principaux mécanismes de l'évolution de la rigidité artérielle dans ce modèle. Nos données font ressortir l'intérêt d'une réduction rapide des niveaux d'AGL plasmatiques, afin de prévenir les altérations vasculaires qui apparaissent plus tardivement, et sont potentialisées en présence de l'obésité.

Dans la seconde étude, nous montrons que dans des conditions basales, les souris Kl+/- ne présentent pas de phénotype en faveur d'un vieillissement accéléré de la paroi artérielle. En effet, à l'âge de 6 mois, les souris Kl+/- présentent une augmentation de leur

PAS consciente, une diminution de la contrainte circonférentielle mesurée à 1000 kPa (signifiant une augmentation de la rigidité carotidienne chez la souris de 6 mois), et une tendance à l'augmentation de la VOP (significative avec l'ajustement à la FC). En revanche, à l'âge de 12 mois, bien que les défenses anti-oxydantes des souris Kl+/- soient diminuées par rapport aux souris Kl+/+, aucune altération de la fonction vasculaire n'est observée.

Peu d'études décrivent le phénotype vasculaire des souris hétérozygotes *kl*/+ ou *kl*$^{-/+}$. Kuro-o et collaborateur sous-entendent dans l'étude *princeps* (Nature 1997) que ces souris hétérozygotes ne présentent aucune différence significative avec les témoins pour les caractères étudiés. Cependant, ces études se font principalement chez des animaux de 1 mois et demi à 2 mois, âge où les souris Kl-/- atteignent la fin de leur espérance de vie, et le phénotype des souris hétérozygotes Kl+/- est rarement étudié.

Dans notre étude, nous montrons que les souris Kl+/- ont une PAS consciente augmentée par rapport aux KL+/+ à l'âge de 6 mois. Une seule étude montre la PAS éveillée des souris Kl+/-, qui n'est pas modifiée (de même que la FC) entre les souris Kl+/+, Kl+/- ou Kl-/- (Shimada 2004) mais à l'âge de 2 mois. Dans un autre travail, la mesure de la PAS par tail-cuff montre une diminution significative de la PAS chez la souris Kl-/- par rapport aux souris sauvages, là encore à l'âge de 2 mois (Fischer et coll., 2010). Nos résultats sont ainsi difficilement comparables avec les autres données de la littérature. Cependant, il a été montré chez le rat normotendu que la PAS continuait à augmenter entre les âges de 2 et 5 mois (Soltis, 1987). De la même façon, chez le rat SHR, la pression artérielle ne se stabilise qu'à environ 4 mois et demi (Limas et coll., 1980). Il a également été démontré chez le rat SHR que la surexpression de Klotho par l'intermédiaire d'un adénovirus permettait une diminution significative de la PAS chez ces rats à l'âge de 6 mois. Cela serait en accord avec l'augmentation de la PAS chez la souris KL+/- à l'âge de 6 mois. Ces résultats valident l'hypothèse selon laquelle Klotho diminue la pression artérielle.

Concernant la fonction vasculaire, aucune étude *in vivo* n'a été publiée. Cependant, la fonction vasculaire a été étudiée par deux études similaires (Saito et coll., 1998) (Nagai et coll., 2000) à partir d'anneaux d'aorte *ex vivo* (en bains d'organes). Ces travaux rapportent que chez les souris homozygotes, la calcification de l'aorte est si importante qu'elle montre une absence complète de contraction ou de dilatation en réponse à la noradrénaline ou à l'acétylcholine. Les artères des souris hétérozygotes présentent un tonus musculaire moyen en comparaison des souris sauvages et homozygotes. Il serait ainsi plausible que les différents phénotypes décrits pour les souris homozygotes existent également chez les souris hétérozygotes, de façon moins prononcée. Les dosages urinaires pour les métabolites du

monoxyde d'azote (NO_2^- et NO_3^-) et les expériences de parabiose entre une souris sauvage et une souris hétérozygote (kl/+), leur permettent de conclure que la protéine Klotho, facteur humoral, protège le système cardiovasculaire à travers la production de NO par l'endothélium.

Concernant le stress oxydant, les SOD et le glutathion jouent un rôle majeur dans la protection de l'organisme contre les radicaux libres, leur déplétion est donc susceptible d'entraîner un stress oxydant important. Nous avons mesuré ces défenses anti-oxydantes dans le plasma des souris Kl+/+ et Kl+/-. La souris Kl+/- ne présente pas de diminution de défenses antioxydantes à 6 mois par rapport aux Kl+/+, sans modification de peroxidation lipidique, montrant que malgré la mutation de Klotho, il n'y a pas d'augmentation du stress oxydant. Il a été montré dans des cultures de cellules endothéliales (HUVECs) que la transfection de Klotho inhibait l'apoptose induite par H_2O_2 en augmentant l'activité de la MnSOD (Ikushima et coll., 2006). Il a également été montré que la surexpression de Klotho diminuait la peroxidation lipidique induite par le paraquat dans des cellules HeLa, et que cet effet passait par la voie Akt-FOXO1, menant à une augmentation de l'expression de MnSOD (Yamamoto et coll., 2005). Cependant, ces études ne s'intéressent pas au phénotype intermédiaire de la souris Kl+/-. En effet, Klotho est soit totalement absente, soit surexprimée, et comparé à un phénotype sauvage uniquement, correspondant au génotype Kl+/+.
Dans notre étude, les souris Kl+/- présentent une diminution de leurs défenses anti-oxydantes à l'âge de 12 mois, mais sans modifications là encore de la peroxidation lipidique. Cela n'est pas corrélé à une modification de la fonction artérielle à cet âge. L'hypothèse la plus probable est l'intervention de mécanismes compensatoires, bien que leur mise en place tardive, après l'apparition d'un phénotype à 6 mois, soit surprenante. Des études complémentaires sur la structure artérielle et les différentes voies de signalisation sont nécessaires pour la compréhension de ce phénomène.
Il existe d'autres études indirectes sur la fonction de Klotho *in vivo*. En 2000, Saito et coll étudient les effets de Klotho sur les rats OLETF qui présentent de multiples facteurs de risques athérogéniques (hypertension, obésité, hyperglycémie, hypertryglécéridémie) (Saito et coll., 2000). Ils démontrent que l'injection de klotho par l'intermédiaire d'un adénovirus peut : (i) améliorer la dysfonction endothéliale vasculaire, (ii) augmenter la production de NO, (iii) réduire l'hypertension artérielle, et (iv) prévenir l'hypertrophie médiale et la fibrose périvasculaire.
Plus récemment, Wang et Sun (2009) (Wang et Sun, 2009) démontrent sur le rat SHR que la surexpression de Klotho dans un adénovirus permet de réduire l'activité de la NADPH oxydase (qui génère des EROs) et d'augmenter l'expression de IL-10 (cytokine anti-inflammatoire jouant un rôle important dans l'hypertension et les dommages organiques). Les

rats SHR traités par Klotho présentent moins de dommages rénaux et une pression artérielle diminuée par rapport aux rats SHR non traités, démontrant l'implication de Klotho dans la protection rénale.

L'effet protecteur de Klotho est diminué chez les souris hétérozygotes dans une moindre mesure, en dépit de leurs taux sériques normaux de phosphate et de vitamine D. Ainsi, la diminution de la synthèse de NO chez les souris KL-déficientes (Kl+/-) n'est pas secondaire à l'hyperphosphatémie ou à l'hypervitaminose D. Le mécanisme par lequel Klotho entraîne une synthèse de NO est encore inconnu. Néanmoins, la réduction de Klotho pourrait déréguler la eNOS et diminuer la formation de NO.
Il est également possible que la diminution des taux de NO pourrait être attribué à la dégradation accélérée du NO par les EROs. En effet, Klotho participant à la formation des enzymes anti-oxydantes, l'absence de Klotho entraînerait une augmentation des EROs, qui captent rapidement le NO, entraînant ainsi la formation de peroxynitrite menant à la nytrosylation des résidus tyrosine des protéines, mais surtout entraînant une diminution de la biodisponibilité du NO dans la paroi vasculaire.

Ainsi, nous avons démontré dans cette étude que les souris Kl+/- ne présentent pas d'altérations majeures de leur phénotype artériel dans des conditions basales jusqu'à l'âge de 12 mois. Par contre, l'étude de leur phénotype à un âge avancé de 18-24 mois peut être intéressant à analyser. En effet, l'étude du phénotype artériel chez le rat Zucker a montré qu'il faut attendre un âge très avancé pour démasquer une altération significative de la fonction vasculaire chez le rat obèse, lorsque les mécanismes compensatoires sont débordés.

D'autres études sur des modèles transgéniques au laboratoire nous ont également montré que dans des conditions basales, le phénotype artériel n'était pas significativement modifié. En effet, les souris α1-/- ne présentent pas d'altération de la fonction des gros troncs artériels, alors que ces souris α1-/- ne présentent pas d'hypertrophie artérielle induite par l'angiotensine II, contrairement aux souris α1+/+ (Louis et coll., 2007). Dans le cas de Klotho, il serait intéressant de traiter les souris Kl+/- avec un agent pro-oxydant, comme la buthionine sulfoximine (BSO), qui inhibe la synthèse du glutathion et induit chez le rat une forte hypertension dès les premières semaines de traitement (Vaziri et coll., 2000).

Afin de permettre le phénotypage artériel des souris Kl-/-, une carence en vitamine D dès le début de la gestation peut également être envisagé. En effet, plusieurs études (Fischer et coll.) (Tsujikawa et coll., 2003) ont montré qu'un régime carencé en vitamine D permettait aux souris Kl-/- d'avoir des taux de vitamine D plasmatique comparables aux souris sauvage, et en conséquence l'absence de calcifications ectopiques, et un poids corporel normal entre 8

et 13 semaines (durée des travaux cités). Un poids corporel normal nous permettra de mesurer la fonction carotidienne *in vivo*, ce qui est techniquement irréalisable sur des souris de 8 g, et nous pourrions évaluer les effets d'une réintroduction de la vitamine D dans l'alimentation sur le phénotype artériel.

Nous pouvons également envisager des expérimentations supplémentaires sur les échantillons tissulaires des souris Kl+/+ et Kl+/- afin d'expliquer les différences de phénotype des souris Kl+/- entre 6 et 12 mois, notamment la mesure des métabolites du NO dans les urines, la mesure d'autres marqueurs du stress oxydant (protéines carbonylées et nitrotyrosine), ainsi que l'estimation de la sénescence cellulaire chez les Kl+/- avec la mesure de la longueur des télomères par q-PCR. Des travaux récents ont également démontré dans des cellules endothéliales *in vitro* les effets anti-apoptotiques et anti-sénescence de Klotho via les voies MAP Kinases (Maekawa et coll., 2011), et particulièrement l'activation de p38MAPK par les EROs (Hsieh et coll., 2010), ainsi que des effets anti-inflammatoires, en réduisant l'activation de la voie NFκB (Maekawa et coll., 2009). La mesure de ces différentes voies de signalisation dans les aortes des souris Kl+/- et Kl+/+, relié à l'étude de la fonction endothéliale sur des anneaux aortiques serait également intéressante.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Dans ce travail de thèse, nous avons montré que différents facteurs tels que l'obésité liée au syndrome métabolique (facteur 'environnemental') ou la mutation du gène Klotho (facteur génétique) pouvaient influencer l'apparition de la rigidité artérielle.
Dans le modèle du rat Zucker, nous avons démontré que les effets du vieillissement artériel étaient augmentés avec l'obésité. Nous avons montré qu'une partie de ces effets délétères pouvaient être provoqués par les acides gras libres (AGL). En effet, les AGL plasmatiques sont fortement augmentés chez le rat obèse, ce qui mène à une dysfonction endothéliale chez le rat âgé. Nous continuons actuellement les expériences sur ce sujet, notamment en utilisant des cultures primaires de cellules endothéliales traitées aux AGL, afin de mettre en évidence les voies de signalisation impliquées dans les mécanismes d'actions des AGL.

Le rat Zucker est un modèle intéressant pour l'étude du vieillissement artériel associé à l'obésité et au syndrome métabolique. Nous avons voulu également étudier d'autres facteurs influençant le vieillissement artériel. Le modèle de la souris déficiente pour Klotho est reconnu dans la littérature pour être un modèle de vieillissement systémique accéléré. Nous avons voulu étudier le phénotype artériel chez ces souris, encore peu connu. Dans le modèle génétiquement modifié de la souris Klotho, nous avons démontré que dans des conditions basales, la souris hétérozygote pour la mutation de Klotho ne présentait que peu de manifestations d'un vieillissement artériel accéléré (augmentation de la pression systolique et de la contrainte circonférentielle à l'âge de 6 mois, qui disparaît à l'âge de 12 mois). Cette étude demande encore des expériences supplémentaires sur le plan moléculaire, et dans des conditions de carence en vitamine D (détaillées en discussion).

La prévalence de l'obésité dans la population générale en France est de 15%, et de 17% chez les plus de 65 ans. Cette pathologie est donc une importante question de santé publique, à plus forte raison lorsqu'elle est associée au vieillissement. Une perspective intéressante concernant les effets des AGL peut s'appliquer aux études cliniques. En effet, notre étude montre des effets délétères des taux plasmatiques élevés d'AGL chez les rats très âgés. Aucune étude prospective à très long terme (sur plusieurs décennies) sur des sujets obèses, n'a été envisagée pour comprendre l'implication de l'élévation des AGL sur les maladies cardio-vasculaires apparaissant plus tardivement dans la vie d'un individu atteint d'obésité et de troubles métaboliques associés. Comme nous l'avons décrit, l'insulino-résistance est caractérisée par une absence des actions de l'insuline sur les adipocytes. Ainsi, la régulation de la production d'AGL par le tissu adipeux est altérée, et ces AGL sont libérés en grande

quantité dans la circulation. Ces AGL contribuent à entretenir l'insulino-résistance au niveau cellulaire car ils entrent en compétition avec le glucose afin de produire de l'énergie.
À partir de ce concept de compétition énergétique, différents médicaments ont été évalués. Au niveau des adipocytes, certaines molécules s'intéressent à réduire, voire à inhiber la production d'AGL. Les dérivés de l'acide nicotinique (en particulier l'acipimox), les agonistes du récepteur adénosine A1 ainsi que les fibrates ont été testés, mais pour l'instant sans effet cellulaire ou physiologique concluant. Au niveau hépatique, l'oxydation des AGL stimule la néoglucogenèse et augmenterait la production hépatique de glucose. Des médicaments inhibiteurs de l'oxydation des acides gras libres ont ainsi été étudiés. Différentes molécules, telles que l'etomixir (inhibiteur irréversible de la Carnitine palmitoyltransferase I, CPT-1), auraient un effet sur la sensibilité à l'insuline, mais elles n'ont été testées que chez l'animal. Il y aurait un effet toxique potentiel chez l'homme (hypertrophie cardiaque pour les inhibiteurs de la CPT-1, ce qui mène à l'hypertension artérielle) et ces effets empêchent pour l'instant la mise en place d'études cliniques.
Il serait ainsi intéressant de pouvoir évaluer les effets de ses différents composés dans le modèle du rat Zucker. Par exemple, un traitement à l'acipimox ou aux fibrates peut être envisagé chez des rats jeunes (âgés 20 et 30 semaines) afin d'évaluer les effets sur les voies de signalisation cellulaire et les taux d'AGL plasmatiques. Un traitement chez des rats plus âgés (autour de 50 semaines) permettrait une évaluation de mêmes paramètres au niveau artériel. En effet, des études antérieures au laboratoire montrent que la rigidité artérielle du rat Zucker obèse commence à apparaître par rapport à son témoin maigre vers l'âge de 60 semaines.

Concernant la souris Klotho, nous avons choisi d'étudier la souris Kl+/- qui se rapprocherait le plus du polymorphisme du gène Klotho chez l'homme. De nombreuses publications ont montré l'implication d'un variant de Klotho, KL-VS, dans la prévalence des maladies cardiovasculaire. Une étude récente de notre équipe (Nzietchueng et coll., 2011) montre cependant que dans la cohorte ERA, (Evolution de la Rigidité Artérielle, cohorte parisienne de 345 hommes et 162 femmes de 25 à 88 ans, faisant régulièrement des visites aux centres d'Investigations Préventives et Cliniques) que l'épaisseur de la paroi carotidienne, son diamètre, ainsi que la VOP ne changent pas en fonction du polymorphisme du gène Klotho. Cette étude montre un phénotype chez l'homme identique à celui que l'on retrouve chez nos souris Kl+/- à l'âge de 6 mois : une augmentation de la pression artérielle systolique chez les individus mutés, mais sans modifications majeure de la rigidité des gros troncs artériels. Ainsi, les effets de la protéine Klotho au niveau cardio-vasculaire sont sûrement plus complexes que ce que reflète actuellement les travaux de la littérature.

Un dosage de la protéine Klotho dans le plasma du rat Zucker pourrait être un lien physiologique intéressant entre nos deux modèles. En effet, il a été récemment été démontré un effet délétère de Klotho sur les souris ob/ob, déficientes pour la leptine (Ohnishi et coll., 2011). Contrairement à la souris Kl-/-, dépourvue de tissu adipeux détectable, la souris ob/ob, déficiente pour la leptine, est sévèrement obèse (50 g en moyenne à l'âge de 9 semaines). Une souris double KO ob/ob-klotho présente de façon surprenante une diminution de leur masse adipeuse, ainsi qu'une diminution de leur taux de glucose sanguin par rapport aux souris ob/ob. De plus, un régime enrichi en graisse ne fait pas grossir les souris Kl-/-, contrairement aux souris sauvages. Il a également été montré que la leptine, administrée à des souris ob/ob, pouvait diminuer les taux plasmatiques de calcium, phosphate et 1,25(OH)2D3, sans modifier l'expression de la protéine Klotho au niveau rénal (Tsuji et coll., 2010). Ces nouvelles études soulignent elles aussi la complexité des effets et de la régulation de la protéine Klotho au niveau d'un organisme entier.

Enfin, récemment, le gouvernement a annoncé la suppression de l'hypertension artérielle sévère de la liste des affections de longue durée, remboursées à 100 % par la Sécurité sociale. *De facto*, cette décision limite le remboursement des médicaments antihypertenseurs. Une décision qui est vivement critiquée par les médecins et les cardiologues, pointant un risque de moindre accès aux soins pour les patients non titulaires d'une mutuelle (Information La Croix, 5/07/11). Sachant que l'hypertension artérielle systolique est un des déterminants menant à la rigidité, la diminution de sa prise en charge peut devenir dans quelques années un facteur aggravant de pathologies telles que le syndrome métabolique. Cette décision peut également à moyen terme pénaliser la recherche dans ce domaine, en limitant le nombre d'études fondamentales et cliniques.

En conclusion, ce travail de thèse nous a permis de mettre en évidence les liens entre syndrome métabolique et ses complications cardiovasculaires. L'hypertension systolique touche plus de 60% de la population de plus de 60 ans. Ce travail a mis en évidence l'utilité de modèles animaux pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires menant à la rigidité artérielle. Ce travail nous montre également que la caractérisation complète d'un modèle animal est essentielle. L'exemple de la souris déficiente pour le gène Klotho est particulièrement frappant : la littérature annonce Klotho comme une protéine anti-vieillissement, alors que notre étude sur des souris à long terme n'arrivent pas aux mêmes conclusions.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(2006). "International Diabetes Federation, The IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome." International Diabetes Federation, Brussels, Belgium.
Agouni, A., A. H. Lagrue-Lak-Hal, H. A. Mostefai, A. Tesse, P. Mulder, P. Rouet, F. Desmoulin, C. Heymes, M. C. Martinez and R. Andriantsitohaina (2009). "Red wine polyphenols prevent metabolic and cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (Fa/Fa)." PLoS One 4(5): e5557.
Aguilar-Salinas, C. A., R. Rojas, F. J. Gomez-Perez, R. Mehta, A. Franco, G. Olaiz and J. A. Rull (2005). "The metabolic syndrome: a concept hard to define." Arch Med Res 36(3): 223-31.
Ahima, R. S., D. Prabakaran, C. Mantzoros, D. Qu, B. Lowell, E. Maratos-Flier and J. S. Flier (1996). "Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting." Nature 382(6588): 250-2.
Aitken, J. and H. Fisher (1994). "Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk." Bioessays 16(4): 259-67.
Alecu, C., E. Cuignet-Royer, P. M. Mertes, P. Salvi, H. Vespignani, M. Lambert, H. Bouaziz and A. Benetos (2010). "Pre-existing arterial stiffness can predict hypotension during induction of anaesthesia in the elderly." Br J Anaesth 105(5): 583-8.
Argiles, J. M. (1989). "The obese Zucker rat: a choice for fat metabolism 1968-1988: twenty years of research on the insights of the Zucker mutation." Prog Lipid Res 28(1): 53-66.
Arking, D. E., G. Atzmon, A. Arking, N. Barzilai and H. C. Dietz (2005). "Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity." Circ Res 96(4): 412-8.
Arking, D. E., D. M. Becker, L. R. Yanek, D. Fallin, D. P. Judge, T. F. Moy, L. C. Becker and H. C. Dietz (2003). "KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease." Am J Hum Genet 72(5): 1154-61.
Arking, D. E., A. Krebsova, M. Macek, Sr., M. Macek, Jr., A. Arking, I. S. Mian, L. Fried, A. Hamosh, S. Dey, I. McIntosh and H. C. Dietz (2002). "Association of human aging with a functional variant of klotho." Proc Natl Acad Sci U S A 99(2): 856-61.
Armentano, R., J. L. Megnien, A. Simon, F. Bellenfant, J. Barra and J. Levenson (1995). "Effects of hypertension on viscoelasticity of carotid and femoral arteries in humans." Hypertension 26(1): 48-54.
Artwohl, M., A. Lindenmair, M. Roden, W. K. Waldhausl, A. Freudenthaler, G. Klosner, A. Ilhan, A. Luger and S. M. Baumgartner-Parzer (2009). "Fatty acids induce apoptosis in human smooth muscle cells depending on chain length, saturation, and duration of exposure." Atherosclerosis 202(2): 351-62.
Atkinson, J. (1998). "[Aging of arterial extracellular matrix elastin: etiology and consequences]." Pathol Biol (Paris) 46(7): 555-9.
Bailey, M., S. Pillarisetti, P. Jones, H. Xiao, D. Simionescu and N. Vyavahare (2004). "Involvement of matrix metalloproteinases and tenascin-C in elastin calcification." Cardiovasc Pathol 13(3): 146-55.
Barton, M., F. Cosentino, R. P. Brandes, P. Moreau, S. Shaw and T. F. Luscher (1997). "Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin." Hypertension 30(4): 817-24.
Basalyga, D. M., D. T. Simionescu, W. Xiong, B. T. Baxter, B. C. Starcher and N. R. Vyavahare (2004). "Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases." Circulation 110(22): 3480-7.
Bates, S. H., R. N. Kulkarni, M. Seifert and M. G. Myers, Jr. (2005). "Roles for leptin receptor/STAT3-dependent and -independent signals in the regulation of glucose homeostasis." Cell Metab 1(3): 169-78.
Bates, S. H., W. H. Stearns, T. A. Dundon, M. Schubert, A. W. Tso, Y. Wang, A. S. Banks, H. J. Lavery, A. K. Haq, E. Maratos-Flier, B. G. Neel, M. W. Schwartz and M. G. Myers,

Jr. (2003). "STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction." Nature 421(6925): 856-9.
Beckman, K. B. and B. N. Ames (1998). "The free radical theory of aging matures." Physiol Rev 78(2): 547-81.
Bellino, F. L. (2006). "Advances in endocrinology of aging research, 2005-2006." Exp Gerontol 41(12): 1228-33.
Belmin, J., B. Corman, R. Merval and A. Tedgui (1993). "Age-related changes in endothelial permeability and distribution volume of albumin in rat aorta." Am J Physiol 264(3 Pt 2): H679-85.
Benetos, A., C. Adamopoulos, J. M. Bureau, M. Temmar, C. Labat, K. Bean, F. Thomas, B. Pannier, R. Asmar, M. Zureik, M. Safar and L. Guize (2002). "Determinants of accelerated progression of arterial stiffness in normotensive subjects and in treated hypertensive subjects over a 6-year period." Circulation 105(10): 1202-7.
Benetos, A., S. Gautier, S. Ricard, J. Topouchian, R. Asmar, O. Poirier, E. Larosa, L. Guize, M. Safar, F. Soubrier and F. Cambien (1996). "Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients." Circulation 94(4): 698-703.
Benetos, A., S. Laurent, R. G. Asmar and P. Lacolley (1997). "Large artery stiffness in hypertension." J Hypertens Suppl 15(2): S89-97.
Benetos, A., S. Laurent, A. P. Hoeks, P. H. Boutouyrie and M. E. Safar (1993). "Arterial alterations with aging and high blood pressure. A noninvasive study of carotid and femoral arteries." Arterioscler Thromb 13(1): 90-7.
Benetos, A. and M. E. Safar (1996). "Aortic collagen, aortic stiffness, and AT1 receptors in experimental and human hypertension." Can J Physiol Pharmacol 74(7): 862-6.
Benetos, A., F. Thomas, B. Pannier, K. Bean, B. Jego and L. Guize (2008). "All-cause and cardiovascular mortality using the different definitions of metabolic syndrome." Am J Cardiol 102(2): 188-91.
Berg, A. H., T. P. Combs, X. Du, M. Brownlee and P. E. Scherer (2001). "The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action." Nat Med 7(8): 947-53.
Bergel, D. H. (1961). "The dynamic elastic properties of the arterial wall." J Physiol 156(3): 458-69.
Berne, R. M. and M. N. Levy (2000). Principles of physiology, Mosby.
Beylot, M., C. Pinteur and O. Peroni (2006). "Expression of the adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 in lean rats and in obese Zucker rats." Metabolism 55(3): 396-401.
Bezie, Y., P. Lacolley, S. Laurent and G. Gabella (1998a). "Connection of smooth muscle cells to elastic lamellae in aorta of spontaneously hypertensive rats." Hypertension 32(1): 166-9.
Bezie, Y., J. M. Lamaziere, S. Laurent, P. Challande, R. S. Cunha, J. Bonnet and P. Lacolley (1998b). "Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats." Arterioscler Thromb Vasc Biol 18(7): 1027-34.
Boden, G. (2011). "Obesity, insulin resistance and free fatty acids." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.
Boden, G., P. She, M. Mozzoli, P. Cheung, K. Gumireddy, P. Reddy, X. Xiang, Z. Luo and N. Ruderman (2005). "Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver." Diabetes 54(12): 3458-65.
Booth, A. D., S. Wallace, C. M. McEniery, Yasmin, J. Brown, D. R. Jayne and I. B. Wilkinson (2004). "Inflammation and arterial stiffness in systemic vasculitis: a model of vascular inflammation." Arthritis Rheum 50(2): 581-8.
Boucher, J., B. Masri, D. Daviaud, S. Gesta, C. Guigne, A. Mazzucotelli, I. Castan-Laurell, I. Tack, B. Knibiehler, C. Carpene, Y. Audigier, J. S. Saulnier-Blache and P. Valet (2005). "Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity." Endocrinology 146(4): 1764-71.

Boutouyrie, P., C. Glaser, A. Moryusef, Y. Bezie, J. N. Fabiani, S. Laurent and P. Lacolley (1999). "[Associations between viscoelastic properties of large arteries and their extracellular matrix composition in abdominal aortic aneurysms in humans]." Therapie 54(1): 85-91.

Boutouyrie, P., A. I. Tropeano, R. Asmar, I. Gautier, A. Benetos, P. Lacolley and S. Laurent (2002). "Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study." Hypertension 39(1): 10-5.

Bouvet, C., E. Belin de Chantemele, A. L. Guihot, E. Vessieres, A. Bocquet, O. Dumont, A. Jardel, L. Loufrani, P. Moreau and D. Henrion (2007). "Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction." Hypertension 50(1): 248-54.

Bray, G. A. and D. A. York (1972). "Studies on food intake of genetically obese rats." Am J Physiol 223(1): 176-9.

Brownlee, M., A. Cerami and H. Vlassara (1988). "Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications." N Engl J Med 318(20): 1315-21.

Bulckaen, H., G. Prevost, E. Boulanger, G. Robitaille, V. Roquet, C. Gaxatte, G. Garcon, B. Corman, P. Gosset, P. Shirali, C. Creusy and F. Puisieux (2008). "Low-dose aspirin prevents age-related endothelial dysfunction in a mouse model of physiological aging." Am J Physiol Heart Circ Physiol 294(4): H1562-70.

Burton, A. C. (1954). "Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels." Physiol Rev 34(4): 619-42.

Cantini, C., P. Kieffer, B. Corman, P. Liminana, J. Atkinson and I. Lartaud-Idjouadiene (2001). "Aminoguanidine and aortic wall mechanics, structure, and composition in aged rats." Hypertension 38(4): 943-8.

Castillo, C., M. Cruzado, C. Ariznavarreta, P. Gil-Loyzaga, V. Lahera, V. Cachofeiro and J. A. Tresguerres (2005). "Effect of recombinant human growth hormone administration on body composition and vascular function and structure in old male Wistar rats." Biogerontology 6(5): 303-12.

Ceddia, R. B., W. N. William, Jr., A. R. Carpinelli and R. Curi (1999). "Modulation of insulin secretion by leptin." Gen Pharmacol 32(2): 233-7.

Chang, Q., S. Hoefs, A. W. van der Kemp, C. N. Topala, R. J. Bindels and J. G. Hoenderop (2005). "The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel." Science 310(5747): 490-3.

Chen, C. D., S. Podvin, E. Gillespie, S. E. Leeman and C. R. Abraham (2007). "Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17." Proc Natl Acad Sci U S A 104(50): 19796-801.

Chen, H., M. Montagnani, T. Funahashi, I. Shimomura and M. J. Quon (2003). "Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells." J Biol Chem 278(45): 45021-6.

Chinen, I., M. Shimabukuro, K. Yamakawa, N. Higa, T. Matsuzaki, K. Noguchi, S. Ueda, M. Sakanashi and N. Takasu (2007). "Vascular lipotoxicity: endothelial dysfunction via fatty-acid-induced reactive oxygen species overproduction in obese Zucker diabetic fatty rats." Endocrinology 148(1): 160-5.

Clark, J. M. and S. Glagov (1985). "Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited." Arteriosclerosis 5(1): 19-34.

Cockcroft, J. R., I. B. Wilkinson, M. Evans, P. McEwan, J. R. Peters, S. Davies, M. F. Scanlon and C. J. Currie (2005). "Pulse pressure predicts cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes mellitus." Am J Hypertens 18(11): 1463-7; discussion 1468-9.

Collins, S., C. M. Kuhn, A. E. Petro, A. G. Swick, B. A. Chrunyk and R. S. Surwit (1996). "Role of leptin in fat regulation." Nature 380(6576): 677.

Corman, B., M. Duriez, P. Poitevin, D. Heudes, P. Bruneval, A. Tedgui and B. I. Levy (1998). "Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A 95(3): 1301-6.
Cox, R. H. and D. C. Kikta (1992). "Age-related changes in thoracic aorta of obese Zucker rats." Am J Physiol 262(5 Pt 2): H1548-56.
Cruce, J. A., M. R. Greenwood, P. R. Johnson and D. Quartermain (1974). "Genetic versus hypothalamic obesity: studies of intake and dietary manipulations in rats." J Comp Physiol Psychol 87(2): 295-301.
Cruickshank, K., L. Riste, S. G. Anderson, J. S. Wright, G. Dunn and R. G. Gosling (2002). "Aortic pulse-wave velocity and its relationship to mortality in diabetes and glucose intolerance: an integrated index of vascular function?" Circulation 106(16): 2085-90.
Cusin, I., F. Rohner-Jeanrenaud, A. Stricker-Krongrad and B. Jeanrenaud (1996). "The weight-reducing effect of an intracerebroventricular bolus injection of leptin in genetically obese fa/fa rats. Reduced sensitivity compared with lean animals." Diabetes 45(10): 1446-50.
d'Alessio, P. (2004). "Aging and the endothelium." Exp Gerontol 39(2): 165-71.
de Groot, T., R. J. Bindels and J. G. Hoenderop (2008). "TRPV5: an ingeniously controlled calcium channel." Kidney Int 74(10): 1241-6.
de Jongh, R. T., E. H. Serne, R. G. Ijzerman, G. de Vries and C. D. Stehouwer (2004). "Free fatty acid levels modulate microvascular function: relevance for obesity-associated insulin resistance, hypertension, and microangiopathy." Diabetes 53(11): 2873-82.
Dobrin, P. B. (1978). "Mechanical properties of arterises." Physiol Rev 58(2): 397-460.
Edirisinghe, I., K. McCormick Hallam and C. T. Kappagoda (2006). "Effect of fatty acids on endothelium-dependent relaxation in the rabbit aorta." Clin Sci (Lond) 111(2): 145-51.
Egan, B. M., N. J. Schork and A. B. Weder (1989). "Regional hemodynamic abnormalities in overweight men. Focus on alpha-adrenergic vascular responses." Am J Hypertens 2(6 Pt 1): 428-34.
Elliott, R. J. and L. T. McGrath (1994). "Calcification of the human thoracic aorta during aging." Calcif Tissue Int 54(4): 268-73.
Emilsson, V., Y. L. Liu, M. A. Cawthorne, N. M. Morton and M. Davenport (1997). "Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion." Diabetes 46(2): 313-6.
Enns, M. P. and J. A. Grinker (1983). "Dietary self-selection and meal patterns of obese and lean Zucker rats." Appetite 4(4): 281-93.
Fei, H., H. J. Okano, C. Li, G. H. Lee, C. Zhao, R. Darnell and J. M. Friedman (1997). "Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues." Proc Natl Acad Sci U S A 94(13): 7001-5.
Fischer, S. S., D. S. Kempe, C. B. Leibrock, R. Rexhepaj, B. Siraskar, K. M. Boini, T. F. Ackermann, M. Foller, B. Hocher, K. P. Rosenblatt, O. M. Kuro and F. Lang (2010). "Hyperaldosteronism in Klotho-deficient mice." Am J Physiol Renal Physiol 299(5): F1171-7.
Fleckenstein, A., M. Frey and G. Fleckenstein-Grun (1983). "Consequences of uncontrolled calcium entry and its prevention with calcium antagonists." Eur Heart J 4 Suppl H: 43-50.
Fornieri, C., D. Quaglino, Jr. and G. Mori (1992). "Role of the extracellular matrix in age-related modifications of the rat aorta. Ultrastructural, morphometric, and enzymatic evaluations." Arterioscler Thromb 12(9): 1008-16.
Franklin, S. S. (2004). "Pulse pressure as a risk factor." Clin Exp Hypertens 26(7-8): 645-52.
Franklin, S. S., W. t. Gustin, N. D. Wong, M. G. Larson, M. A. Weber, W. B. Kannel and D. Levy (1997). "Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study." Circulation 96(1): 308-15.
Freathy, R. M., M. N. Weedon, D. Melzer, B. Shields, G. A. Hitman, M. Walker, M. I. McCarthy, A. T. Hattersley and T. M. Frayling (2006). "The functional "KL-VS" variant

of KLOTHO is not associated with type 2 diabetes in 5028 UK Caucasians." BMC Med Genet 7: 51.
Friedman, J. M. and J. L. Halaas (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals." Nature 395(6704): 763-70.
Fruebis, J., T. S. Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M. R. Erickson, F. T. Yen, B. E. Bihain and H. F. Lodish (2001). "Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice." Proc Natl Acad Sci U S A 98(4): 2005-10.
Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature 288(5789): 373-6.
Gaballa, M. A., C. T. Jacob, T. E. Raya, J. Liu, B. Simon and S. Goldman (1998). "Large artery remodeling during aging: biaxial passive and active stiffness." Hypertension 32(3): 437-43.
Gabella, G. (1984). "Structural apparatus for force transmission in smooth muscles." Physiol Rev 64(2): 455-77.
Galisteo, M., M. Sanchez, R. Vera, M. Gonzalez, A. Anguera, J. Duarte and A. Zarzuelo (2005). "A diet supplemented with husks of Plantago ovata reduces the development of endothelial dysfunction, hypertension, and obesity by affecting adiponectin and TNF-alpha in obese Zucker rats." J Nutr 135(10): 2399-404.
Gallagher, E. J., D. Leroith and E. Karnieli (2010). "Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome." Mt Sinai J Med 77(5): 511-23.
Gao, D., S. Nong, X. Huang, Y. Lu, H. Zhao, Y. Lin, Y. Man, S. Wang, J. Yang and J. Li (2010). "The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways." J Biol Chem 285(39): 29965-73.
Gao, Z., X. Zhang, A. Zuberi, D. Hwang, M. J. Quon, M. Lefevre and J. Ye (2004). "Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes." Mol Endocrinol 18(8): 2024-34.
Ghorpade, A. and B. T. Baxter (1996). "Biochemistry and molecular regulation of matrix macromolecules in abdominal aortic aneurysms." Ann N Y Acad Sci 800: 138-50.
Giummelly, P., I. Lartaud-Idjouadiene, V. Marque, N. Niederhoffer, J. M. Chillon, C. Capdeville-Atkinson and J. Atkinson (1999). "Effects of aging and antihypertensive treatment on aortic internal diameter in spontaneously hypertensive rats." Hypertension 34(2): 207-11.
Goldstein, B. J. and R. Scalia (2004). "Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function." J Clin Endocrinol Metab 89(6): 2563-8.
Gosselin, C. and M. Cabanac (1996). "Ever higher: constant rise of body weight set-point in growing zucker rats." Physiol Behav 60(3): 817-21.
Greenberg, D. and S. C. Weatherford (1990). "Obese and lean Zucker rats differ in preferences for sham-fed corn oil or sucrose." Am J Physiol 259(6 Pt 2): R1093-5.
Greene, E. L., G. Lu, D. Zhang and B. M. Egan (2001). "Signaling events mediating the additive effects of oleic acid and angiotensin II on vascular smooth muscle cell migration." Hypertension 37(2): 308-12.
Grekin, R. J., C. J. Dumont, A. P. Vollmer, S. W. Watts and R. C. Webb (1997). "Mechanisms in the pressor effects of hepatic portal venous fatty acid infusion." Am J Physiol 273(1 Pt 2): R324-30.
Guyton, A. C. (1992). Human physiology and mechanisms of disease, W.B. Saunders.
Hallam, K. M., Q. Li, R. Ananthakrishnan, A. Kalea, Y. S. Zou, S. Vedantham, A. M. Schmidt, S. F. Yan and R. Ramasamy (2010). "Aldose reductase and AGE-RAGE pathways: central roles in the pathogenesis of vascular dysfunction in aging rats." Aging Cell 9(5): 776-84.
Halloran, B. G. and B. T. Baxter (1995). "Pathogenesis of aneurysms." Semin Vasc Surg 8(2): 85-92.

Hayoz, D., B. Rutschmann, F. Perret, M. Niederberger, Y. Tardy, V. Mooser, J. Nussberger, B. Waeber and H. R. Brunner (1992). "Conduit artery compliance and distensibility are not necessarily reduced in hypertension." Hypertension 20(1): 1-6.

Henry, R. M., P. J. Kostense, A. M. Spijkerman, J. M. Dekker, G. Nijpels, R. J. Heine, O. Kamp, N. Westerhof, L. M. Bouter and C. D. Stehouwer (2003). "Arterial stiffness increases with deteriorating glucose tolerance status: the Hoorn Study." Circulation 107(16): 2089-95.

Hoenderop, J. G., B. Nilius and R. J. Bindels (2005). "Calcium absorption across epithelia." Physiol Rev 85(1): 373-422.

Houseknecht, K. L., C. A. Baile, R. L. Matteri and M. E. Spurlock (1998). "The biology of leptin: a review." J Anim Sci 76(5): 1405-20.

Hsieh, C. C., M. Kuro-o, K. P. Rosenblatt, R. Brobey and J. Papaconstantinou (2010). "The ASK1-Signalosome regulates p38 MAPK activity in response to levels of endogenous oxidative stress in the Klotho mouse models of aging." Aging (Albany NY) 2(9): 597-611.

Hug, C. and H. F. Lodish (2005). "The role of the adipocyte hormone adiponectin in cardiovascular disease." Curr Opin Pharmacol 5(2): 129-34.

Iida, M., T. Murakami, K. Ishida, A. Mizuno, M. Kuwajima and K. Shima (1996a). "Phenotype-linked amino acid alteration in leptin receptor cDNA from Zucker fatty (fa/fa) rat." Biochem Biophys Res Commun 222(1): 19-26.

Iida, M., T. Murakami, K. Ishida, A. Mizuno, M. Kuwajima and K. Shima (1996b). "Substitution at codon 269 (glutamine --> proline) of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat." Biochem Biophys Res Commun 224(2): 597-604.

Ikushima, M., H. Rakugi, K. Ishikawa, Y. Maekawa, K. Yamamoto, J. Ohta, Y. Chihara, I. Kida and T. Ogihara (2006). "Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun 339(3): 827-32.

Imura, A., A. Iwano, O. Tohyama, Y. Tsuji, K. Nozaki, N. Hashimoto, T. Fujimori and Y. Nabeshima (2004). "Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane." FEBS Lett 565(1-3): 143-7.

Imura, A., Y. Tsuji, M. Murata, R. Maeda, K. Kubota, A. Iwano, C. Obuse, K. Togashi, M. Tominaga, N. Kita, K. Tomiyama, J. Iijima, Y. Nabeshima, M. Fujioka, R. Asato, S. Tanaka, K. Kojima, J. Ito, K. Nozaki, N. Hashimoto, T. Ito, T. Nishio, T. Uchiyama and T. Fujimori (2007). "alpha-Klotho as a regulator of calcium homeostasis." Science 316(5831): 1615-8.

Inoguchi, T., P. Li, F. Umeda, H. Y. Yu, M. Kakimoto, M. Imamura, T. Aoki, T. Etoh, T. Hashimoto, M. Naruse, H. Sano, H. Utsumi and H. Nawata (2000). "High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells." Diabetes 49(11): 1939-45.

Inoue, M. (1994). Protective mechanism against reactive oxygen species. New York, Raven Press Ltd.

Itani, S. I., N. B. Ruderman, F. Schmieder and G. Boden (2002). "Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha." Diabetes 51(7): 2005-11.

Izzo, J. L., Jr. (2004). "Arterial stiffness and the systolic hypertension syndrome." Curr Opin Cardiol 19(4): 341-52.

Izzo, J. L., Jr. and G. F. Mitchell (2007). "Aging and arterial structure-function relations." Adv Cardiol 44: 19-34.

Jiang, H., C. Liang, X. Liu, Q. Jiang, Z. He, J. Wu, X. Pan, Y. Ren, M. Fan, M. Li and Z. Wu (2010). "Palmitic acid promotes endothelial progenitor cells apoptosis via p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways." Atherosclerosis 210(1): 71-7.

Jiang, Z. Y., Y. W. Lin, A. Clemont, E. P. Feener, K. D. Hein, M. Igarashi, T. Yamauchi, M. F. White and G. L. King (1999). "Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats." J Clin Invest 104(4): 447-57.

Johnson, P. R., J. S. Stern, B. A. Horwitz, R. E. Harris, Jr. and S. F. Greene (1997). "Longevity in obese and lean male and female rats of the Zucker strain: prevention of hyperphagia." Am J Clin Nutr 66(4): 890-903.

Kahn, R., J. Buse, E. Ferrannini and M. Stern (2005). "The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes." Diabetes Care 28(9): 2289-304.

Kamemori, M., Y. Ohyama, M. Kurabayashi, K. Takahashi, R. Nagai and N. Furuya (2002). "Expression of Klotho protein in the inner ear." Hear Res 171(1-2): 103-110.

Kannel, W. B., T. R. Dawber and D. L. McGee (1980). "Perspectives on systolic hypertension. The Framingham study." Circulation 61(6): 1179-82.

Karp, G., J. Bouharmont and J. C. Wissocq (2004). Biologie cellulaire et moléculaire, De Boeck.

Kasiske, B. L., M. P. O'Donnell and W. F. Keane (1992). "The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury." Hypertension 19(1 Suppl): I110-5.

Kastin, A. J., W. Pan, L. M. Maness, R. J. Koletsky and P. Ernsberger (1999). "Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor." Peptides 20(12): 1449-53.

Kawano, K., N. Ogata, M. Chiano, H. Molloy, P. Kleyn, T. D. Spector, M. Uchida, T. Hosoi, T. Suzuki, H. Orimo, S. Inoue, Y. Nabeshima, K. Nakamura, M. Kuro-o and H. Kawaguchi (2002). "Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women." J Bone Miner Res 17(10): 1744-51.

Kim, F., K. A. Tysseling, J. Rice, B. Gallis, L. Haji, C. M. Giachelli, E. W. Raines, M. A. Corson and M. W. Schwartz (2005). "Activation of IKKbeta by glucose is necessary and sufficient to impair insulin signaling and nitric oxide production in endothelial cells." J Mol Cell Cardiol 39(2): 327-34.

Kinlay, S., M. A. Creager, M. Fukumoto, H. Hikita, J. C. Fang, A. P. Selwyn and P. Ganz (2001). "Endothelium-derived nitric oxide regulates arterial elasticity in human arteries in vivo." Hypertension 38(5): 1049-53.

Kirstetter, P., K. Anderson, B. T. Porse, S. E. Jacobsen and C. Nerlov (2006). "Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block." Nat Immunol 7(10): 1048-56.

Koh, K. K., P. C. Oh and M. J. Quon (2009). "Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection?" Cardiovasc Res 81(4): 649-59.

Kohler, H. P. (2002). "Insulin resistance syndrome: interaction with coagulation and fibrinolysis." Swiss Med Wkly 132(19-20): 241-52.

Kops, G. J., T. B. Dansen, P. E. Polderman, I. Saarloos, K. W. Wirtz, P. J. Coffer, T. T. Huang, J. L. Bos, R. H. Medema and B. M. Burgering (2002). "Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress." Nature 419(6904): 316-21.

Krief, S. and R. Bazin (1991). "Genetic obesity: is the defect in the sympathetic nervous system? A review through developmental studies in the preobese Zucker rat." Proc Soc Exp Biol Med 198(1): 528-38.

Kuro-o, M. (2006). "Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism." Curr Opin Nephrol Hypertens 15(4): 437-41.

Kuro-o, M., Y. Matsumura, H. Aizawa, H. Kawaguchi, T. Suga, T. Utsugi, Y. Ohyama, M. Kurabayashi, T. Kaname, E. Kume, H. Iwasaki, A. Iida, T. Shiraki-Iida, S. Nishikawa, R. Nagai and Y. I. Nabeshima (1997). "Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing." Nature 390(6655): 45-51.

Kurosu, H., Y. Ogawa, M. Miyoshi, M. Yamamoto, A. Nandi, K. P. Rosenblatt, M. G. Baum, S. Schiavi, M. C. Hu, O. W. Moe and M. Kuro-o (2006). "Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho." J Biol Chem 281(10): 6120-3.

Kurosu, H., M. Yamamoto, J. D. Clark, J. V. Pastor, A. Nandi, P. Gurnani, O. P. McGuinness, H. Chikuda, M. Yamaguchi, H. Kawaguchi, I. Shimomura, Y. Takayama, J. Herz, C. R. Kahn, K. P. Rosenblatt and M. Kuro-o (2005). "Suppression of aging in mice by the hormone Klotho." Science 309(5742): 1829-33.

Labat-Robert, J. and L. Robert (1988). "Aging of the extracellular matrix and its pathology." Exp Gerontol 23(1): 5-18.

Labat, C., P. Lacolley, M. Lajemi, M. de Gasparo, M. E. Safar and A. Benetos (2001). "Effects of valsartan on mechanical properties of the carotid artery in spontaneously hypertensive rats under high-salt diet." Hypertension 38(3): 439-43.

Lacolley, P. (2007). Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux, John Libbey Eurotext.

Lacolley, P., C. Labat, A. Pujol, C. Delcayre, A. Benetos and M. Safar (2002). "Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone." Circulation 106(22): 2848-53.

Lacolley, P., M. E. Safar, V. Regnault and E. D. Frohlich (2009). "Angiotensin II, mechanotransduction, and pulsatile arterial hemodynamics in hypertension." Am J Physiol Heart Circ Physiol 297(5): H1567-75.

Lajemi, M., S. Gautier, O. Poirier, J. P. Baguet, A. Mimran, P. Gosse, O. Hanon, C. Labat, F. Cambien and A. Benetos (2001). "Endothelin gene variants and aortic and cardiac structure in never-treated hypertensives." Am J Hypertens 14(8 Pt 1): 755-60.

Lakatta, E. G. (1998). "Aging and cardiovascular structure and function in healthy sedentary humans." Aging (Milano) 10(2): 162-4.

Lakatta, E. G. and D. 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.

Lakka, H. M., D. E. Laaksonen, T. A. Lakka, L. K. Niskanen, E. Kumpusalo, J. Tuomilehto and J. T. Salonen (2002). "The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men." JAMA 288(21): 2709-16.

Latham, R. D., N. Westerhof, P. Sipkema, B. J. Rubal, P. Reuderink and J. P. Murgo (1985). "Regional wave travel and reflections along the human aorta: a study with six simultaneous micromanometric pressures." Circulation 72(6): 1257-69.

Laurent, S. (2005). "[Predictors of cardiovascular mortality and morbidity in hypertension]." Curr Med Res Opin 21 Suppl 5: S7-11.

Laurent, S., P. Boutouyrie, R. Asmar, I. Gautier, B. Laloux, L. Guize, P. Ducimetiere and A. Benetos (2001a). "Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients." Hypertension 37(5): 1236-41.

Laurent, S., A. I. Tropeano, A. Lillo-Lelouet, G. Jondeau, B. Laloux and P. Boutouyrie (2001b). "Local pulse pressure is a major determinant of large artery remodelling." Clin Exp Pharmacol Physiol 28(12): 1011-4.

Lavaud, S., O. Michel, C. Sassy-Prigent, D. Heudes, R. Bazin, J. Bariety and J. Chevalier (1996). "Early influx of glomerular macrophages precedes glomerulosclerosis in the obese Zucker rat model." J Am Soc Nephrol 7(12): 2604-15.

Lee, G. H., R. Proenca, J. M. Montez, K. M. Carroll, J. G. Darvishzadeh, J. I. Lee and J. M. Friedman (1996). "Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice." Nature 379(6566): 632-5.

Lee, K., G. M. Saidel and M. S. Penn (2008). "Permeability change of arterial endothelium is an age-dependent function of lesion size in apolipoprotein E-null mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol 295(6): H2273-9.

Lee, S., Y. Park, K. C. Dellsperger and C. Zhang (2011). "Exercise training improves endothelial function via adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol.

Levy, B. I., J. Benessiano, P. Poitevin and M. E. Safar (1990). "Endothelium-dependent mechanical properties of the carotid artery in WKY and SHR. Role of angiotensin converting enzyme inhibition." Circ Res 66(2): 321-8.

Limas, C., B. Westrum and C. J. Limas (1980). "The evolution of vascular changes in the spontaneously hypertensive rat." Am J Pathol 98(2): 357-84.
Liu, W., R. Lin, A. Liu, L. Du and Q. Chen (2010). "Prevalence and association between obesity and metabolic syndrome among Chinese elementary school children: a school-based survey." BMC Public Health 10(1): 780.
Louis, H., A. Kakou, V. Regnault, C. Labat, A. Bressenot, J. Gao-Li, H. Gardner, S. N. Thornton, P. Challande, Z. Li and P. Lacolley (2007). "Role of alpha1beta1-integrin in arterial stiffness and angiotensin-induced arterial wall hypertrophy in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol 293(4): H2597-604.
Lundman, P., P. Tornvall, L. Nilsson and J. Pernow (2001). "A triglyceride-rich fat emulsion and free fatty acids but not very low density lipoproteins impair endothelium-dependent vasorelaxation." Atherosclerosis 159(1): 35-41.
Maekawa, Y., K. Ishikawa, O. Yasuda, R. Oguro, H. Hanasaki, I. Kida, Y. Takemura, M. Ohishi, T. Katsuya and H. Rakugi (2009). "Klotho suppresses TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF-kappaB activation." Endocrine 35(3): 341-6.
Maekawa, Y., M. Ohishi, M. Ikushima, K. Yamamoto, O. Yasuda, R. Oguro, H. Yamamoto-Hanasaki, Y. Tatara, Y. Takeya and H. Rakugi (2011). "Klotho protein diminishes endothelial apoptosis and senescence via a mitogen-activated kinase pathway." Geriatr Gerontol Int.
Marin, J. (1995). "Age-related changes in vascular responses: a review." Mech Ageing Dev 79(2-3): 71-114.
Markewicz, B., G. Kuhmichel and I. Schmidt (1993). "Onset of excess fat deposition in Zucker rats with and without decreased thermogenesis." Am J Physiol 265(3 Pt 1): E478-86.
Marque, V., P. Kieffer, J. Atkinson and I. Lartaud-Idjouadiene (1999). "Elastic properties and composition of the aortic wall in old spontaneously hypertensive rats." Hypertension 34(3): 415-22.
Matsumura, Y., H. Aizawa, T. Shiraki-Iida, R. Nagai, M. Kuro-o and Y. Nabeshima (1998). "Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein." Biochem Biophys Res Commun 242(3): 626-30.
Matsuo, T., K. Shimakawa, H. Ikeda and H. Iwatsuka (1984). "Feeding in response to insulin and 2-deoxy-D-glucose in Zucker rats on dietary self-selection." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 30(3): 265-72.
McGrath, J. C., S. M. Arribas, C. J. Daly and J. F. Gordon (1995). "Confocal microscopy for structure and real-time pharmacology in blood vessels." J Hum Hypertens 9(8): 645-7.
Meierfrankenfeld, B., M. Abelenda, H. Jauker, M. Klingenspor, E. E. Kershaw, S. C. Chua, Jr., R. L. Leibel and I. Schmidt (1996). "Perinatal energy stores and excessive fat deposition in genetically obese (fa/fa) rats." Am J Physiol 270(4 Pt 1): E700-8.
Metais, C., F. Forcheron, P. Abdallah, A. Basset, P. Del Carmine, G. Bricca and M. Beylot (2008). "Adiponectin receptors: expression in Zucker diabetic rats and effects of fenofibrate and metformin." Metabolism 57(7): 946-53.
Michel, J. B., D. Heudes, O. Michel, P. Poitevin, M. Philippe, E. Scalbert, B. Corman and B. I. Levy (1994). "Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes. II. Large arteries." Am J Physiol 267(1 Pt 2): R124-35.
Milnor, W. R. (1989). Hemodynamics, Williams & Wilkins.
Milnor, W. R. (1990). Cardiovascular physiology, Oxford University Press.
Mitani, H., N. Ishizaka, T. Aizawa, M. Ohno, S. Usui, T. Suzuki, T. Amaki, I. Mori, Y. Nakamura, M. Sato, M. Nangaku, Y. Hirata and R. Nagai (2002). "In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage." Hypertension 39(4): 838-43.
Mizuno, T. M., S. P. Kleopoulos, H. T. Bergen, J. L. Roberts, C. A. Priest and C. V. Mobbs (1998). "Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin." Diabetes 47(2): 294-7.

Mohammadi, M., S. K. Olsen and O. A. Ibrahimi (2005). "Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation." Cytokine Growth Factor Rev 16(2): 107-37.
Mourad, J. J., G. du Cailar, E. M. Nazal, M. E. Safar and A. Mimran (2005). "Age-related increase of pulse pressure and plasminogen activator inhibitor-1 I/D gene polymorphism in essential hypertension." J Intern Med 257(1): 93-9.
Moussard, C. (2006). Biochimie structurale et métabolique, De Boeck.
Mulvany, M. J. (1993). "Vascular remodelling in hypertension." Eur Heart J 14 Suppl C: 2-4.
Mulvany, M. J. and W. Halpern (1977). "Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats." Circ Res 41(1): 19-26.
Murgo, J. P., N. Westerhof, J. P. Giolma and S. A. Altobelli (1980). "Aortic input impedance in normal man: relationship to pressure wave forms." Circulation 62(1): 105-16.
Nabeshima, Y. (2002). "Klotho: a fundamental regulator of aging." Ageing Res Rev 1(4): 627-38.
Nabeshima, Y. (2006). "Toward a better understanding of Klotho." Sci Aging Knowledge Environ 2006(8): pe11.
Nagai, R., Y. Saito, Y. Ohyama, H. Aizawa, T. Suga, T. Nakamura, M. Kurabayashi and M. Kuroo (2000). "Endothelial dysfunction in the klotho mouse and downregulation of klotho gene expression in various animal models of vascular and metabolic diseases." Cell Mol Life Sci 57(5): 738-46.
Nakamura, T., Y. Saito, Y. Ohyama, H. Masuda, H. Sumino, M. Kuro-o, Y. Nabeshima, R. Nagai and M. Kurabayashi (2002). "Production of nitric oxide, but not prostacyclin, is reduced in klotho mice." Jpn J Pharmacol 89(2): 149-56.
Neuman, R. E. and M. A. Logan (1950). "The determination of hydroxyproline." J Biol Chem 184(1): 299-306.
Nichols, W. W. and M. O'Rourke (1998). McDonald's blood flow in arteries. Theorical, experimental and clinical principles. London, Sydney, Auckland, Arrnold E.
Nicholson, W. T., B. Vaa, C. Hesse, J. H. Eisenach and M. J. Joyner (2009). "Aging is associated with reduced prostacyclin-mediated dilation in the human forearm." Hypertension 53(6): 973-8.
Nijenhuis, T., J. G. Hoenderop and R. J. Bindels (2005). "TRPV5 and TRPV6 in Ca(2+) (re)absorption: regulating Ca(2+) entry at the gate." Pflugers Arch 451(1): 181-92.
O'Brien, S. F., J. C. Russell, P. J. Dolphin and S. T. Davidge (2000). "Vascular wall function in insulin-resistant JCR:LA-cp rats: role of male and female sex." J Cardiovasc Pharmacol 36(2): 176-81.
O'Rourke, M. (1990). "Arterial stiffness, systolic blood pressure, and logical treatment of arterial hypertension." Hypertension 15(4): 339-47.
O'Rourke, M. F., J. V. Blazek, C. L. Morreels, Jr. and L. J. Krovetz (1968). "Pressure wave transmission along the human aorta. Changes with age and in arterial degenerative disease." Circ Res 23(4): 567-79.
O'Rourke, M. F. and J. Hashimoto (2007). "Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective." J Am Coll Cardiol 50(1): 1-13.
O'Rourke, M. F. and M. E. Safar (2005). "Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy." Hypertension 46(1): 200-4.
O'Rourke, M. F., J. A. Staessen, C. Vlachopoulos, D. Duprez and G. E. Plante (2002). "Clinical applications of arterial stiffness; definitions and reference values." Am J Hypertens 15(5): 426-44.
Oana, F., H. Takeda, K. Hayakawa, A. Matsuzawa, S. Akahane, M. Isaji and M. Akahane (2005). "Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin." Metabolism 54(8): 995-1001.
Oberbach, A., N. Schlichting, M. Bluher, P. Kovacs, H. Till, J. U. Stolzenburg and J. Neuhaus (2010). "Palmitate induced IL-6 and MCP-1 expression in human bladder smooth

muscle cells provides a link between diabetes and urinary tract infections." PLoS One 5(5): e10882.
Ohnishi, M., S. Kato, J. Akiyoshi, A. Atfi and M. S. Razzaque "Dietary and genetic evidence for enhancing glucose metabolism and reducing obesity by inhibiting klotho functions." FASEB J 25(6): 2031-9.
Oimomi, M., Y. Maeda, F. Hata, Y. Kitamura, S. Matsumoto, H. Hatanaka and S. Baba (1988). "A study of the age-related acceleration of glycation of tissue proteins in rats." J Gerontol 43(4): B98-101.
Osborne-Pellegrin, M., C. Labat, N. Mercier, P. Challande and P. Lacolley (2010). "Changes in aortic stiffness related to elastic fiber network anomalies in the Brown Norway rat during maturation and aging." Am J Physiol Heart Circ Physiol 299(1): H144-52.
Ouchi, N., S. Kihara, Y. Arita, Y. Okamoto, K. Maeda, H. Kuriyama, K. Hotta, M. Nishida, M. Takahashi, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Funahashi and Y. Matsuzawa (2000). "Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway." Circulation 102(11): 1296-301.
Pacher, P., J. S. Beckman and L. Liaudet (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiol Rev 87(1): 315-424.
Panchal, S. K. and L. Brown (2011). "Rodent models for metabolic syndrome research." J Biomed Biotechnol 2011: 351982.
Penicaud, L., P. Ferre, J. Terretaz, M. F. Kinebanyan, A. Leturque, E. Dore, J. Girard, B. Jeanrenaud and L. Picon (1987). "Development of obesity in Zucker rats. Early insulin resistance in muscles but normal sensitivity in white adipose tissue." Diabetes 36(5): 626-31.
Proudfoot, D. and C. M. Shanahan (2001). "Biology of calcification in vascular cells: intima versus media." Herz 26(4): 245-51.
Qin, X., M. A. Corriere, L. M. Matrisian and R. J. Guzman (2006). "Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification." Arterioscler Thromb Vasc Biol 26(7): 1510-6.
Rahmouni, K. and W. G. Haynes (2001). "Leptin signaling pathways in the central nervous system: interactions between neuropeptide Y and melanocortins." Bioessays 23(12): 1095-9.
Rajala, M. W. and P. E. Scherer (2003). "Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis." Endocrinology 144(9): 3765-73.
Rattan, S. I. (1996). "Synthesis, modifications, and turnover of proteins during aging." Exp Gerontol 31(1-2): 33-47.
Razzaque, M. S. and B. Lanske (2006). "Hypervitaminosis D and premature aging: lessons learned from Fgf23 and Klotho mutant mice." Trends Mol Med 12(7): 298-305.
Reaven, G., F. Abbasi and T. McLaughlin (2004). "Obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease." Recent Prog Horm Res 59: 207-23.
Reaven, G. M. (1988). "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." Diabetes 37(12): 1595-607.
Rhee, E. J., K. W. Oh, W. Y. Lee, S. Y. Kim, C. H. Jung, B. J. Kim, K. C. Sung, B. S. Kim, J. H. Kang, M. H. Lee, S. W. Kim and J. R. Park (2006). "The differential effects of age on the association of KLOTHO gene polymorphisms with coronary artery disease." Metabolism 55(10): 1344-51.
Rho, M. C., K. Ah Lee, S. Mi Kim, C. Sik Lee, M. Jeong Jang, Y. Kook Kim, H. Sun Lee, Y. Hyun Choi, B. Yong Rhim and K. Kim (2007). "Sensitization of vascular smooth muscle cell to TNF-alpha-mediated death in the presence of palmitate." Toxicol Appl Pharmacol 220(3): 311-9.
Riancho, J. A., C. Valero, J. L. Hernandez, F. Ortiz, A. Zarrabeitia, M. A. Alonso, N. Pena, M. A. Pascual, J. Gonzalez-Macias and M. T. Zarrabeitia (2007). "Association of the

F352V variant of the Klotho gene with bone mineral density." Biogerontology 8(2): 121-7.
Robert, L. (1999). "Aging of the vascular-wall and atherosclerosis." Exp Gerontol 34(4): 491-501.
Robert L, B. P. (1987). La matrice extra-cellulaire de la paroi artérielle. Les maladies de la paroi artérielle. F. Médecine-sciences, Camillieri JP, Berry CL, Fiessinger JN, et al.,. 23: 31-43.
Roveri, N., A. Ripamonti, S. Garbisa and D. Volpin (1978). "Structural organization of collagen fibrils in media aortic wall." Connect Tissue Res 5(4): 249-53.
Russell, J. C., R. M. Amy, V. Manickavel and P. J. Dolphin (1989a). "Effects of chronic ethanol consumption in atherosclerosis-prone JCR:LA-corpulent rat." Arteriosclerosis 9(1): 122-8.
Russell, J. C., D. G. Koeslag, R. M. Amy and P. J. Dolphin (1989b). "Plasma lipid secretion and clearance in hyperlipidemic JCR:LA-corpulent rats." Arteriosclerosis 9(6): 869-76.
Safar, M. E. and A. Benetos (2003). "Factors influencing arterial stiffness in systolic hypertension in the elderly: role of sodium and the renin-angiotensin system." Am J Hypertens 16(3): 249-58.
Safar, M. E., B. I. Levy and H. Struijker-Boudier (2003). "Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases." Circulation 107(22): 2864-9.
Safar, M. E., F. Thomas, J. Blacher, R. Nzietchueng, J. M. Bureau, B. Pannier and A. Benetos (2006). "Metabolic syndrome and age-related progression of aortic stiffness." J Am Coll Cardiol 47(1): 72-5.
Saito, Y., T. Nakamura, Y. Ohyama, T. Suzuki, A. Iida, T. Shiraki-Iida, M. Kuro-o, Y. Nabeshima, M. Kurabayashi and R. Nagai (2000). "In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome." Biochem Biophys Res Commun 276(2): 767-72.
Saito, Y., T. Yamagishi, T. Nakamura, Y. Ohyama, H. Aizawa, T. Suga, Y. Matsumura, H. Masuda, M. Kurabayashi, M. Kuro-o, Y. Nabeshima and R. Nagai (1998). "Klotho protein protects against endothelial dysfunction." Biochem Biophys Res Commun 248(2): 324-9.
Saladin, R., P. De Vos, M. Guerre-Millo, A. Leturque, J. Girard, B. Staels and J. Auwerx (1995). "Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration." Nature 377(6549): 527-9.
Schauer, I. E. and J. E. Reusch (2009). "Nonesterified fatty acid exposure activates protective and mitogenic pathways in vascular smooth muscle cells by alternate signaling pathways." Metabolism 58(3): 319-27.
Scheller, M., J. Huelsken, F. Rosenbauer, M. M. Taketo, W. Birchmeier, D. G. Tenen and A. Leutz (2006). "Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation." Nat Immunol 7(10): 1037-47.
Schwartz, M. W., R. J. Seeley, L. A. Campfield, P. Burn and D. G. Baskin (1996). "Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus." J Clin Invest 98(5): 1101-6.
Selzer, F., K. Sutton-Tyrrell, S. Fitzgerald, R. Tracy, L. Kuller and S. Manzi (2001). "Vascular stiffness in women with systemic lupus erythematosus." Hypertension 37(4): 1075-82.
Shi, H., M. V. Kokoeva, K. Inouye, I. Tzameli, H. Yin and J. S. Flier (2006). "TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance." J Clin Invest 116(11): 3015-25.
Sista, A. K., M. K. O'Connell, T. Hinohara, S. S. Oommen, B. E. Fenster, A. J. Glassford, E. A. Schwartz, C. A. Taylor, G. M. Reaven and P. S. Tsao (2005). "Increased aortic stiffness in the insulin-resistant Zucker fa/fa rat." Am J Physiol Heart Circ Physiol 289(2): H845-51.
Soltis, E. E. (1987). "Effect of age on blood pressure and membrane-dependent vascular responses in the rat." Circ Res 61(6): 889-97.

Steinberg, H. O., H. Chaker, R. Leaming, A. Johnson, G. Brechtel and A. D. Baron (1996). "Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance." J Clin Invest 97(11): 2601-10.

Stephens, T. W., M. Basinski, P. K. Bristow, J. M. Bue-Valleskey, S. G. Burgett, L. Craft, J. Hale, J. Hoffmann, H. M. Hsiung, A. Kriauciunas and et al. (1995). "The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product." Nature 377(6549): 530-2.

Stepniakowski, K. T., T. L. Goodfriend and B. M. Egan (1995). "Fatty acids enhance vascular alpha-adrenergic sensitivity." Hypertension 25(4 Pt 2): 774-8.

Subramanian, R. and K. M. MacLeod (2003). "Age-dependent changes in blood pressure and arterial reactivity in obese Zucker rats." Eur J Pharmacol 477(2): 143-52.

Szocs, Z., B. Brunmair, K. Stadlbauer, P. Nowotny, L. Bauer, A. Luger and C. Furnsinn (2008). "Age-dependent development of metabolic derangement and effects of intervention with pioglitazone in Zucker diabetic fatty rats." J Pharmacol Exp Ther 326(1): 323-9.

Taddei, S., A. Virdis, L. Ghiadoni, I. Sudano and A. Salvetti (2001). "Endothelial dysfunction in hypertension." J Cardiovasc Pharmacol 38 Suppl 2: S11-4.

Taddei, S., A. Virdis, P. Mattei, L. Ghiadoni, A. Gennari, C. B. Fasolo, I. Sudano and A. Salvetti (1995). "Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension." Circulation 91(7): 1981-7.

Takaya, K., Y. Ogawa, N. Isse, T. Okazaki, N. Satoh, H. Masuzaki, K. Mori, N. Tamura, K. Hosoda and K. Nakao (1996). "Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs--identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats." Biochem Biophys Res Commun 225(1): 75-83.

Tartaglia, L. A. (1997). "The leptin receptor." J Biol Chem 272(10): 6093-6.

Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K. J. Moore, J. S. Smutko, G. G. Mays, E. A. Wool, C. A. Monroe and R. I. Tepper (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." Cell 83(7): 1263-71.

Tohyama, O., A. Imura, A. Iwano, J. N. Freund, B. Henrissat, T. Fujimori and Y. Nabeshima (2004). "Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides." J Biol Chem 279(11): 9777-84.

Truett, G. E., J. A. Walker and R. B. Harris (2000). "A developmental switch affecting growth of fatty rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 279(6): R1956-63.

Tsuji, K., T. Maeda, T. Kawane, A. Matsunuma and N. Horiuchi "Leptin stimulates fibroblast growth factor 23 expression in bone and suppresses renal 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 synthesis in leptin-deficient mice." J Bone Miner Res 25(8): 1711-23.

Tsujikawa, H., Y. Kurotaki, T. Fujimori, K. Fukuda and Y. Nabeshima (2003). "Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system." Mol Endocrinol 17(12): 2393-403.

Turner, R. C., H. Millns, H. A. Neil, I. M. Stratton, S. E. Manley, D. R. Matthews and R. R. Holman (1998). "Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23)." BMJ 316(7134): 823-8.

Urakawa, I., Y. Yamazaki, T. Shimada, K. Iijima, H. Hasegawa, K. Okawa, T. Fujita, S. Fukumoto and T. Yamashita (2006). "Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23." Nature 444(7120): 770-4.

Utsugi, T., T. Ohno, Y. Ohyama, T. Uchiyama, Y. Saito, Y. Matsumura, H. Aizawa, H. Itoh, M. Kurabayashi, S. Kawazu, S. Tomono, Y. Oka, T. Suga, M. Kuro-o, Y. Nabeshima and R. Nagai (2000). "Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the klotho mutant mouse, a novel animal model for human aging." Metabolism 49(9): 1118-23.

van der Loo, B., S. Schildknecht, R. Zee and M. M. Bachschmid (2009). "Signalling processes in endothelial ageing in relation to chronic oxidative stress and their potential therapeutic implications in humans." Exp Physiol 94(3): 305-10.

Van Zwieten, P. A., K. L. Kam, A. J. Pijl, M. G. Hendriks, O. H. Beenen and M. Pfaffendorf (1996). "Hypertensive diabetic rats in pharmacological studies." Pharmacol Res 33(2): 95-105.

Vaziri, N. D., X. Q. Wang, F. Oveisi and B. Rad (2000). "Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats." Hypertension 36(1): 142-6.

Vecchione, C., A. Maffei, S. Colella, A. Aretini, R. Poulet, G. Frati, M. T. Gentile, L. Fratta, V. Trimarco, B. Trimarco and G. Lembo (2002). "Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway." Diabetes 51(1): 168-73.

Virmani, R., A. P. Avolio, W. J. Mergner, M. Robinowitz, E. E. Herderick, J. F. Cornhill, S. Y. Guo, T. H. Liu, D. Y. Ou and M. O'Rourke (1991). "Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis. Comparison between occidental and Chinese communities." Am J Pathol 139(5): 1119-29.

Walker, A. B., P. D. Chattington, R. E. Buckingham and G. Williams (1999). "The thiazolidinedione rosiglitazone (BRL-49653) lowers blood pressure and protects against impairment of endothelial function in Zucker fatty rats." Diabetes 48(7): 1448-53.

Wang, M. Y., Y. T. Zhou, C. B. Newgard and R. H. Unger (1996). "A novel leptin receptor isoform in rat." FEBS Lett 392(2): 87-90.

Wang, Y. and Z. Sun (2009). "Klotho gene delivery prevents the progression of spontaneous hypertension and renal damage." Hypertension 54(4): 810-7.

Westby, C. M., B. R. Weil, J. J. Greiner, B. L. Stauffer and C. A. DeSouza (2011). "Endothelin-1 vasoconstriction and the age-related decline in endothelium-dependent vasodilatation in men." Clin Sci (Lond) 120(11): 485-91.

Westerhof, N., G. Elzinga and P. Sipkema (1971). "An artificial arterial system for pumping hearts." J Appl Physiol 31(5): 776-81.

White, D. W., D. W. Wang, S. C. Chua, Jr., J. P. Morgenstern, R. L. Leibel, H. Baumann and L. A. Tartaglia (1997). "Constitutive and impaired signaling of leptin receptors containing the Gln --> Pro extracellular domain fatty mutation." Proc Natl Acad Sci U S A 94(20): 10657-62.

Whittaker, E. T. and G. N. Watson (1927). A course of modern analysis: an introduction to the general theory of infinite processes and of analytic functions, with an account of the principal transcendental functions, Cambridge University Press.

Wolinsky, H. and S. Glagov (1967). "A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals." Circ Res 20(1): 99-111.

Wong, M., L. Toh, A. Wilson, K. Rowley, C. Karschimkus, D. Prior, E. Romas, L. Clemens, G. Dragicevic, H. Harianto, I. Wicks, G. McColl, J. Best and A. Jenkins (2003). "Reduced arterial elasticity in rheumatoid arthritis and the relationship to vascular disease risk factors and inflammation." Arthritis Rheum 48(1): 81-9.

Wong, S. L., W. T. Wong, X. Y. Tian, C. W. Lau and Y. Huang (2010). "Prostaglandins in action indispensable roles of cyclooxygenase-1 and -2 in endothelium-dependent contractions." Adv Pharmacol 60: 61-83.

Yamada, E., F. Hazama, H. Kataoka, S. Amano, M. Sasahara, K. Kayembe and K. Katayama (1983). "Elastase-like enzyme in the aorta of spontaneously hypertensive rats." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 44(2): 241-5.

Yamamoto, M., J. D. Clark, J. V. Pastor, P. Gurnani, A. Nandi, H. Kurosu, M. Miyoshi, Y. Ogawa, D. H. Castrillon, K. P. Rosenblatt and M. Kuro-o (2005). "Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho." J Biol Chem 280(45): 38029-34.

Yamashita, T., T. Murakami, M. Iida, M. Kuwajima and K. Shima (1997). "Leptin receptor of Zucker fatty rat performs reduced signal transduction." Diabetes 46(6): 1077-80.
Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B. B. Kahn and T. Kadowaki (2002). "Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nat Med 8(11): 1288-95.
Yamauchi, T., J. Kamon, H. Waki, Y. Terauchi, N. Kubota, K. Hara, Y. Mori, T. Ide, K. Murakami, N. Tsuboyama-Kasaoka, O. Ezaki, Y. Akanuma, O. Gavrilova, C. Vinson, M. L. Reitman, H. Kagechika, K. Shudo, M. Yoda, Y. Nakano, K. Tobe, R. Nagai, S. Kimura, M. Tomita, P. Froguel and T. Kadowaki (2001). "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity." Nat Med 7(8): 941-6.
Yamazaki, K., T. Hamazaki, S. Yano, T. Funada and F. Ibuki (1991). "Changes in fatty acid composition in rat blood and organs after infusion of docosahexaenoic acid ethyl ester." Am J Clin Nutr 53(3): 620-7.
Yang, A. L., J. I. Chao and S. D. Lee (2007). "Altered insulin-mediated and insulin-like growth factor-1-mediated vasorelaxation in aortas of obese Zucker rats." Int J Obes (Lond) 31(1): 72-7.
Yasmin, C. M. McEniery, K. M. O'Shaughnessy, P. Harnett, A. Arshad, S. Wallace, K. Maki-Petaja, B. McDonnell, M. J. Ashby, J. Brown, J. R. Cockcroft and I. B. Wilkinson (2006). "Variation in the human matrix metalloproteinase-9 gene is associated with arterial stiffness in healthy individuals." Arterioscler Thromb Vasc Biol 26(8): 1799-805.
Yen, T. T., W. N. Shaw and P. L. Yu (1977). "Genetics of obesity of Zucker rats and Koletsky rats." Heredity 38(3): 373-7.
Yun, M. R., J. Y. Lee, H. S. Park, H. J. Heo, J. Y. Park, S. S. Bae, K. W. Hong, S. M. Sung and C. D. Kim (2006). "Oleic acid enhances vascular smooth muscle cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway." Pharmacol Res 54(2): 97-102.
Zeng, G., F. H. Nystrom, L. V. Ravichandran, L. N. Cong, M. Kirby, H. Mostowski and M. J. Quon (2000). "Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells." Circulation 101(13): 1539-45.
Zeng, G. and M. J. Quon (1996). "Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells." J Clin Invest 98(4): 894-8.
Zhang, F., G. Zhai, B. S. Kato, D. J. Hart, D. Hunter, T. D. Spector and K. R. Ahmadi (2007). "Association between KLOTHO gene and hand osteoarthritis in a female Caucasian population." Osteoarthritis Cartilage 15(6): 624-9.
Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature 372(6505): 425-32.
Zucker, T. F. and L. M. Zucker (1963). "Fat accretion and growth in the rat." J Nutr 80: 6-19.

ANNEXE 1
Article en révisions mineures
Journal of Gerontology Series A : Biological Sciences

FATTY ACIDS IMPAIR ENDOTHELIUM-DEPENDENT VASORELAXATION: A LINK BETWEEN OBESITY AND ARTERIAL STIFFNESS IN VERY OLD ZUCKER RATS

Authors : Natacha Sloboda[1], Bruno Fève[2], Simon Nigel Thornton[1], Rosine Nzietchueng[1], Véronique Regnault[1], Ginny Simon[1], Carlos Labat[1], Huguette Louis[1], Jean-Pierre Max[1], Adeline Muscat[3], Mary Osborne-Pellegrin[4], Patrick Lacolley[1], and Athanase Benetos[5]

Affiliations :

[1] Inserm, U961, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54500 France ; Univ Henri Poincaré, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54500 France.

[2] Inserm, UMR S938, Paris, F-75012 France ; Faculté de Médecine de St Antoine, Univ Paris 6, F-75012 France ; Assistance-Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Endocrinologie, Paris, F-75012 France.

[3] Inserm, UMR S938, Paris, F-75012 France ; Faculté de Médecine de St Antoine, Univ Paris 6, F-75012 France.

[4] Inserm, U698, Paris, F-75018 France ; Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, F-75018 France.

[5] Inserm, U961, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54500 France ; Univ Henri Poincaré, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54500 France ; CHU Nancy, Hop Brabois, Département de Gériatrie, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54500 France.

Corresponding author:
Athanase Benetos
Department of Geriatrics CHU Nancy
54 510 Vandoeuvre-lès-Nancy, FRANCE
Phone number : +33 3.83.15.33.22
Fax number : +33 3.83.15.76.68
E-mail : a.benetos@chu-nancy.fr

Short title : Arterial Stiffness in very old Zucker rat

Abstract

To analyze interactions between obesity, its associated metabolic disorders, and the macrocirculation during aging, we studied large artery stiffness and fatty acid responsiveness in lean and obese Zucker rats, at 25 (adult) and 80 weeks (very old). Systolic arterial pressure was higher in old obese than in old lean rats. Carotid elastic modulus-wall stress curves showed increased arterial stiffness during aging, which was greater in obese animals. Old obese exhibited endothelial dysfunction with increased systemic oxidative stress, which contributes to NFκB activation. Adult obese had elevated plasma levels of free fatty acids. In old obese, linoleate and palmitate increased contractility to phenylephrine and reduced relaxation to acetylcholine. Thus, obesity at 25 weeks may trigger the accelerated arterial aging observed at 80 weeks. The early increase in free fatty acids and related oxidative stress and inflammation appear as key effectors in the severe arterial stiffness of the aged obese Zucker model.

Key words : aging ; arterial stiffness ; free fatty acids ; obesity ; vascular reactivity

Introduction

The metabolic syndrome (MetS) refers to the co-occurrence of several known cardiovascular risk factors, including insulin resistance, abdominal adiposity, dyslipidemia and hypertension (1). Likewise, obesity has been described to be responsible for the development of MetS, as its incidence is about 30% in the U.S (2). Among obesity-related features, cardiovascular disease is among the leading causes of death in elderly patients (3, 4). The interplay between obesity and vascular dysfunction is multifactorial, and implicates hyperinsulinemia and resistance to insulin-mediated glucose disposal (5). Interestingly, the occurrence of obesity has been shown to be higher in people over 65 years old, compared to the mean occurrence in the French population (17.9 % *vs* 14.5% respectively) (6). Taken together, these observations suggest a synergistic effect of aging and obesity in cardiovascular disease.

It has been reported that insulin resistance could play a central role in the vascular dysfunction observed during obesity or aging. Two major metabolic disturbances subsequent to insulin resistance are an increase in plasma free fatty acids (FFAs) through the loss of the antilipolytic effect of insulin (7), and an altered pattern of pro- or anti-inflammatory cytokines that can directly affect arterial wall structure and function (8). In this context, a major challenge is to understand the mechanisms that underlie the emergence of arterial dysfunction and stiffness during the natural course of aging, obesity, or the association of the two. Available rodent models that mimic human MetS represent major tools for understanding the pathophysiology of cardiovascular complications, providing the opportunity to test the interactions between visceral adiposity and aging.

The obese Zucker rat, which displays many aspects of metabolic dysfunction, such as insulin resistance, hypertension and increased lipid levels (9), has a missense point mutation (fa/fa) in the gene encoding the leptin receptor ; this mutation causes hyperphagia and results in marked

obesity (10). It represents an ideal model for investigating the mechanisms that contribute to large artery dysfunction which occur with advanced age in obese individuals.

Thus our aim was to evaluate in the obese Zucker rat the relationship between obesity, FFA disturbances, arterial stiffness, and specific biomarkers of endothelial function, oxidative stress, and inflammation. We studied "very old" (80 week-old) obese rats (OZR) and their lean (LZR) littermates (which have the same genetic background as OZR) that we compared to younger "adult" 25 week-old OZR and LZR. We demonstrate that aging, obesity, and interactions of the two all influence vascular function and structure, a phenotype that could depend on age- or obesity-related arterial responsiveness to FFAs.

Methods

Animals.

OZR and age-matched LZR control male rats were obtained from a local breeding colony (animal facility, Faculty of Medicine, Henri Poincaré University, Vandoeuvre-les-Nancy, France). The study was performed at the 25^{th} and the 80^{th} week of age. This latter age corresponds to 5 weeks before the mean lifespan of obese rats from our local breeding colony. The animals were given free access to water and chow (A04 standard, Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France). All procedures were conducted in accordance with and approved by the Animal Ethics Committee of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and conformed to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the National Institutes of Health.

Measurement of conscious systolic blood pressure and heart rate

Systolic blood pressure (SBP) and heart rate (HR) were measured using a tail-cuff blood pressure analyzer (Blood Pressure Analysis System, model SC-1000, Hatteras Instruments, Cary, North Carolina, USA) on conscious animals. See supplemental data for further details.

Mechanical parameters

We recorded simultaneously arterial diameter (right carotid artery) and blood pressure (left carotid artery) in isoflurane-anesthetized rats (3 % of isoflurane in 1.5 L/min dioxygen). Internal arterial diameter was measured using an ultrasonic echo-tracking device (NIUS-01, Asulab SA, Marin, Switzerland). We determined incremental elastic modulus (Einc), and circumferential wall stress (σ) as described previously (11). To compare Einc-wall stress curves, we calculated the mean wall stress within the 800 –1600 kPa range of Einc (MWS800 – 1500).

Determination of composition of the aortic media

The composition of the vascular wall, with respect to its main structural components, was determined in the thoracic aorta, assuming that any structural modifications at this level reflect similar changes in the contiguous carotid artery. Elastin, collagen and cell protein contents were measured in the media of thoracic aortas by biochemical techniques, using the method described previously (12). See supplemental data for further details.

Blood sampling and biochemical assays

Overnight fasted animals were anesthetized with isoflurane (3 % in 1.5 L/min dioxygen), and 2 mL of blood were drawn from the jugular vein into heparin filled tubes. The different measurements of blood glucose and lipids were made by automatic analyses. Insulin-resistance was evaluated with HOMA-IR (Homeostasis Model of Assessment of Insulin Resistance (13)).

Plasma non-esterified fatty acids were measured by an enzymatic method (NEFA-HR kit, Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany). Plasma adipokines, Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), von Willebrand factor (vWF) and insulin were measured by ELISA kits (Rat Adiponectin Elisa Kit, Circulex, CycLex Co. Ltd., Nagano, Japan ; RayBio Elisa kit Rat Leptin, RayBiotech, Norcross, USA ; MCP-1 Elisa Kit, Thermo Fisher Scientific, Illkirsch, France ; Asserachrom vWF kit, Diagnostica Stago, Asmières, France ; Ultra sensitive Rat Insulin Elisa Kit, Crystal Chem, Downers Grove, USA). The determination of soluble CD146 (sCD146) was developed in the laboratory in 96-well plate using the mouse monoclonal antibody anti-CD146, clone P1H12 (Millipore, Molsheim, France) as capture antibody and the biotin-conjugated mouse monoclonal anti-CD146, clone 2Q401 (US Biological, Swampscott, USA) for revelation.

Measurement of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) was used for assaying lipid peroxidation in plasma (TBARS assay kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA). Samples contained malondialdehyde (MDA), a naturally occurring product of lipid peroxidation. In the presence of thiobarbituric acid (TBA), a MDA-TBA adduct is formed under high temperature (90-100°C) and acidic conditions. This adduct was measured colorimetrically at 539 nm.

Measurement of superoxide dismutase (SOD) was used for assaying antioxidant activity in plasma (SOD assay kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA). This assay utilizes a tetrazolium salt for detection of superoxide radicals generated by xanthine oxidase. One unit of SOD is defined as the amount of enzyme needed to exhibit 50% dismutation of the superoxide radical. This assay measures all three types of SOD (Cu/Zn, Mn and FeSOD) activity in plasma.

Histomorphometry

Sections of paraffin-embedded carotid artery fixed in formalin at the animal's MAP were stained with Weigert's resorcin-fuchsin method for elastic fibers, and hematoxylin after

periodic acid oxidation for nuclear staining. Evaluation of carotid wall thickness, perimeter, medial cross-sectional area (MCSA) and nuclear density were then determined by computer-directed analysis (Quancoul software, Talence, France).

Immunoblot analyses

Tissue lysates were prepared by homogenizing frozen aortas in a lysis buffer (Roche, Meylan, France). Proteins were then subjected to SDS-PAGE and transferred to Hybond C Extra Membrane (Amersham Bioscience, Glattbrugg, Switzerland). After 1 h in blocking buffer, membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies, then incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies (GE Healthcare, Aulnay-sous-Bois, France). Protein bands were detected by a chemiluminescence system (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). The signal intensity was quantified by densitometry with a computerized image processing system (LAS-4000, Fuji-Sciences, Courbevoie, France). See supplemental data for further details.

Vascular reactivity

Carotid artery rings (3 mm long) were obtained from OZR and LZR at 25 and 80 weeks of age after isoflurane anesthesia and exsanguination. Carotid artery rings were mounted on a wire myograph (Danish MyoTechnology, Aarhus, Denmark) filled with a physiological saline solution (PSS) as described previously (14). Endothelium-dependent and –independent vasodilation were studied in carotid rings with or without functional endothelium. Tissues were pre-incubated with 0.5 mM palmitic acid, 0.5 mM linoleic acid diluted in bovine serum albumin (BSA) 1%, or BSA 1% alone (vehicle) for 30 min before phenylephrine (Phe) precontraction, then the concentration - response curves to vasorelaxant agents were obtained. See supplemental data for further details.

Statistical analyses

Results are presented as means ± SEM. Data were analyzed by use of a two-way ANOVA, followed by the Fisher's test for multiple comparisons to evaluate the influence of age and strain and their interaction on the different variables. Differences between dose-response curves were investigated by the sensitivity (pD2) and maximum effect (Emax). The effects of FFA treatment were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney test. Statistical analysis was performed with NCSS 6.0 package software (Hintze JL, Kaysville, UT). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Weight, hemodynamic and metabolic parameters

Body, kidney and heart weights of 80 week-old rats were greater than in 25 week-old rats (Supplemental Table 1). Compared to 80 week-old LZR, 80 week-old OZR exhibited greater body, kidney and heart weights.

Table 1 shows all hemodynamic and metabolic parameters as a function of aging or obesity. In 80- *vs* 25- week-old LZR, aging is associated with a decrease in conscious SAP and HR, but an increase in plasma levels of glucose, cholesterol and leptin. In OZR, great aging induced an increase in plasma levels of glucose, triglycerides, leptin and creatinine, while it reduced the levels of insulin, HOMA-IR, HDL-cholesterol and the hematocrit.

Obesity was also associated with both early and late disturbances. Compared to 25 week-old LZR, 25 week-old OZR had increased values of conscious SAP, insulin, HOMA-IR, total and HDL-cholesterol, FFAs and leptin. Compared to 80 week-old LZR, 80 week-old OZR had

higher values for conscious SAP, total and HDL-cholesterol, triglycerides, FFAs, leptin and creatinine. In contrast, they had a lower hematocrit value.

These findings show that both aging and MetS each had their own impact on hemodynamic and metabolic parameters, but that the aging/obesity interaction also interfered with the magnitude of the phenotype. Moreover, at 80 weeks, compared to 25 week-old OZR, the decrease in HOMA-IR and FFA values was the consequence of insulin deficiency.

In vivo functional vascular characteristics

Echotracking was used to measure the mechanical parameters of the carotid artery. As seen in Table 2, 80 week-old animals had lower wall stress and MAP compared to 25 week-old rats. An age effect ($p < 0.001$) was observed in Einc at MAP (lower values in the 80 week-old animals) (Table 2), and this difference was significant only in OZR. This result was due to lower MAP in the old rats, and did not reflect higher elastic properties in 80 week-old animals. The stiffening of the carotid arteries from 80 week-old animals is shown in Figure 1A (wall stress to Einc curve shifted to the left, an effect that was more pronounced in the OZR ($p < 0.05$), and in Figure 1B where for a given Einc, mean wall stress (MWS) was significantly lower in old animals, and significantly lower in 80 week-old OZR than in LZR. The Einc/WS curve represents the intrinsic mechanical properties of the carotid wall. These results demonstrate that *in vivo*, obesity and MetS increased arterial stiffness in 80 week-old rats.

Arterial structure

Eighty week-old LZR had increased MCSA (Table 2) and thickness (Supplemental Figure 1 and Table 2) of the carotid artery wall compared to 25 week-old LZR. Eighty week-old OZR had also increased MCSA (Table 2) and thickness, and an increased perimeter compared to 25 week-old OZR (Supplemental Figure 1 and Table 2). Eighty week-old OZR had a decreased

perimeter compared to 80 week-old LZR. Cell density (evaluated through nuclear density) was the same in all groups (Supplemental Table 2).

Eighty week-old rats had significant differences in aortic composition compared to 25 week-old rats (increased dry weight, cell proteins and collagen, decreased elastin and elastin/collagen ratio) (Figure 2A-E). Eighty week-old OZR exhibited a significant increase in total fibronectin compared to 25 week-old OZR (Figure 2F). In addition, compared to 80 week-old LZR, 80 week-old OZR displayed an increase in aortic dry weight and cell protein content, while having a decreased elastin content and elastin/collagen ratio (Figure 2A-C, E). In addition, 80 week-old OZR displayed higher total fibronectin content than 80 week-old LZR (Figure 2F).

These data demonstrate that carotid geometry and matrix components of the large arteries (carotid arteries and aorta) were modified by aging, as expected, but also that these age-related changes were accentuated in 80 week-old OZR.

I*n vitro* vascular reactivity

Vascular function of the carotid arteries was explored *in vitro* with wire myography. The response to Phe was both strain- and age-dependent (Figure 3A, and Supplemental Table 3), since the sensitivity (pD2) and the maximal effect (Emax) were differentially disturbed: pD2 was reduced in 80 week-old LZR compared to 25 week-old LZR, while Emax was decreased in 80 week-old OZR compared to age-matched LZR.

In 80 week-old animals, endothelium-dependent relaxation was impaired in OZR compared to LZR (Figure 3B). Acetylcholine (Ach) Emax was significantly decreased in 80 week-old OZR compared to 80 week-old LZR (Figure 3B). When we assessed the endothelium-independent relaxation on rings without endothelium stimulated with sodium nitroprusside (SNP), a NO donor, no significant differences were found between OZR and LZR (Figure 3C).

Taken together, these data indicate that *in vitro*, old OZR exhibit anomalies in vasoconstriction and endothelium-dependent vasodilation.

To reinforce the demonstration of endothelial dysfunction, we analysed several reliable markers of endothelial function. In the LZR, aging did not alter the plasma level of vWF (Figure 4A). In OZR, vWF was higher at 25 weeks than in LZR and its level increased with age. Values of sCD146 were significantly higher at 80 weeks of age in LZR (Figure 4B) but there was only a trend towards an increase in sCD146 in 80 week-old OZR.

Alterations of key signalling pathways in the arterial wall

Since profound alterations of arterial structure and function were found in the specific context of great aging and obesity, we examined in aortas the expression and activation of the ERK1/2, p38 MAPK and Akt signalling pathways, which exert key roles in the phenotypic changes of vascular cells during senescence (15). As seen in Figure 5A, 80 week-old LZR displayed an increased phosphorylated-Akt compared to 25 week-old LZR. 80 week-old OZR had decreased phosphorylated-p38 MAPK and phosphorylated-Akt compared to 25 week-old OZR (Figure 5A and B). Differences in protein phosphorylation were not significant in 80 week-old OZR compared with 80 week-old LZR. However, we show that phosphoryled-p38 MAPK, phosphorylated-Akt and phosphoryled-ERK1/2 were increased significantly in 25 week-old OZR compared to age-matched LZR. Together, these results indicate that p38 MAPK, Akt and ERK1/2 are activated mainly in 25 week-old OZR, before the emergence of increased arterial stiffening.

Reactive oxygen species (ROS) production and inflammation correlated with vascular stiffening in 80 week-old OZR

Insulin resistance, oxidative stress and inflammation provide the basis for the macrocirculatory abnormalities detected in both obesity and aging (16). Thus, we evaluated markers of oxidative stress to assess whether they could contribute to the alterations in arterial structure and function in OZR at 80 weeks. TBARS, a marker of lipid peroxidation, were increased significantly with aging in the LZR (Figure 6A). As compared to 25 week-old LZR, age-matched OZR had increased TBARS with no further increase at the age of 80 weeks. Interestingly, the activity of superoxide dismutase (SOD) was not significantly modified by age or obesity in our model (data not shown).

We then evaluated specific markers of arterial inflammation. Plasma levels of MCP-1 were increased with aging in both strains (Figure 6B). In addition, MCP-1 was significantly increased in the OZR compared to LZR at both ages., There was no modification in NFκB phosphorylation in the aorta from LZR, whereas it was significantly increased in 80 week-old OZR compared to 25 week-old OZR (Figure 6C). This was consistent with the activation pattern of NFκB inhibitor, IκBα (Figure 6D). Meanwhile, plasma adiponectin, an anti-inflammatory factor, was increased in 25 week-old OZR compared to 25 week-old LZR, whereas it was significantly reduced in 80 week-old OZR compared to 25 week-old OZR. (Figure 6E). Together, these data support a role for ROS-induced peroxidation and inflammation in vascular dysfunction of 80 week-old OZR.

Effects of FFAs in vascular impairment in 80 week-old OZR

Three lines of evidence prompted us to examine the potential involvement of FFAs in the alterations of vascular reactivity in 25- and 80- week-old OZR : *i*/ plasma levels of FFAs were strongly increased in OZR as a consequence of insulin resistance ; *ii*/ FFAs are known to directly influence vascular tone (17, 18) ; *iii*/ FFAs produce ROS (19) and can activate

ERK1/2, Akt and p38 MAPK pathways (20, 21) that are implicated in the contractile properties of large arteries. Thus we tested the hypothesis that FFAs could affect vascular reactivity as a function of both age and obesity. For this purpose, carotid rings were incubated with linoleic acid, then tested for the vasorelaxant effect of acetylcholine.

Preincubation with linoleic acid did not affect the basal tone of carotid artery rings (not shown). While linoleic acid was ineffective in 25 and 80 week-old LZR, it increased the contractility to Phe in 25 and 80 week-old OZR (Figure 7A). Exposure to linoleic acid did not alter the relaxation to Ach in 25 and 80 week-old LZR nor in 25 week-old OZR (Figure 7B). By contrast, linoleic acid strongly inhibited relaxation to Ach compared to vehicle in 80 week-old OZR. In the absence of endothelium, linoleic acid had no effect on contraction (Figure 7C) or relaxation (Figure 7D). Similar results were obtained in response to Phe or Ach for the two strains when palmitic acid was used instead of linoleic acid (not shown). Thus, FFAs decreased the endothelium-dependent relaxation in 80 week-old OZR, without affecting the muscular response to SNP.

Discussion

To our knowledge, this is the first study to assess both *in vivo* and *in vitro* the arterial phenotype of very old Zucker rats. We have shown that the metabolic disorders present in the obese Zucker rat accentuate arterial aging as demonstrated by the increase in arterial stiffness and the alterations of aortic structure. *In vitro*, this model presents alterations in vessel relaxation and contraction. Finally, we showed that FFAs inhibited endothelium-dependent relaxation and potentiated contraction in 80 week-old OZR, indicating a major dysfunction of endothelial cells whereas the smooth muscle cell response to an NO donor remained intact. Our

data clearly showed a deleterious action of obesity and associated metabolic disorders on the age-related alterations of large artery function and structure.

The metabolic status of the Zucker model has been previously studied. At 25 weeks of age, OZR displayed insulin resistance and dyslipidemia, which is consistent with other reports (22-24). Our study shows that very old OZR display several manifestations of accelerated aging such as renal failure with anemia, high systolic blood pressure and excessive blood pressure variability as observed during anesthesia. Renal failure is found only in old OZR, which is concordant with another study, showing that this disease was the main cause of death in OZR (25). Renal failure represents an important determinant of vascular stiffness linked to the process of accelerated arterial aging. The vascular alterations observed in this study are an additional expression of excessive arterial aging in very old OZR. Interestingly, most of these cardiovascular and renal manifestations are similar to those observed in elderly patients with metabolic disorders.

The effects of aging on arterial function and structure have been shown in a non-obese rat model (26). A strain-related stiffness in obese Zucker rats has been reported already, but in much younger animals (27). Our findings show that arterial structure is also affected by the combination of obesity and aging. We found that, at 80 weeks of age, obesity and the associated metabolic disorders are associated with more pronounced changes in elastin/collagen ratio.

Changes in extracellular matrix (ECM) production by smooth muscle cells, including that of collagen and elastin, are influenced by adhesion molecules, which attach cells to the matrix (28). Accordingly, we observed in our study that fibronectin was significantly increased in 80 week-old OZR compared to age-matched LZR. Another study demonstrated that

fibronectin was increased in an aldosterone-salt-induced hypertensive rat model (29). Thus, our data argue for the promoting role of fibronectin in arterial stiffness, as this protein was described to increase cell-ECM attachments (30).

The vascular tone in isolated carotid artery rings from 25- or 80-week-old LZR and OZR is altered in response to Phe as a function of age or adiposity (either on Emax or pD2 ; Figure 3). At 80 weeks, Emax values in response to Ach were reduced in OZR as compared to LZR. Interaction of age and obesity are thus required to reveal an altered vasodilating effect of Ach. Several studies have reported disturbed vascular tone in response to vasoconstrictive or vasodilating effectors in OZR (23, 24, 31-34). There is no clear consensus on the existence of a decreased relaxation in OZR. Most of the studies have been performed in younger animals and in different vascular beds. Vessieres et al have shown a greater reduction of Ach relaxation in mesenteric arteries in OZR at 52 weeks than at 20 weeks of age (35, 36). A major result of the present study is the demonstration of the age-dependent variations in vascular reactivity within the same site of arterial stiffness measurement. Overall, while the contracting or relaxing properties of intact large arteries (carotid rings) are disturbed in very old and/or obese rats in response to Phe or Ach, the vasodilating effect of SNP is retained in the absence of endothelium. The predominance of endothelial dysfunction is also supported by the strain and/or age-related increase in the endothelium-derived factors vWF and sCD146. This suggests strongly that while the endothelial function is damaged, the response to NO in vascular smooth muscle cells remains unmodified, even in very old animals.

A well known cause of reduced bioavailability of NO is the increase in ROS production, followed by an inflammatory response (37). Indeed, in our study, greater oxidative damage was observed from 25 weeks of age in obese rats followed by a marked activation of the NFκB pathway at 80 weeks of age. A major result of our study was the increase of plasma

adiponectin observed in 25 week-old OZR despite the presence of insulin resistance. It has been recently demonstrated that adiponectin reduces inflammation and oxidative stress in aorta of adiponectin-knock-out mice (38). Moreover, this study showed that adiponectin-knock-out mice had impaired endothelial-dependent vasodilation, suggesting that adiponectin plays a central role in the prevention of endothelial dysfunction. Previous studies have reported either higher (23, 39, 40) or lower (23, 39, 40) adiponectin levels in Zucker rats. The high plasma levels of adiponectin in 25 week-old OZR observed in our study could reflect a protective mechanism to delay the onset of endothelial dysfunction, a major contributor to arterial stiffness. The subsequent fall in adiponectin in 80 week-old OZR may correspond to a defect in the protective mechanism, resulting in a pro-inflammatory state, which leads to endothelial dysfunction and the related arterial stiffness.

It was recently demonstrated that acute elevation of plasma FFA activated the proinflammatory NFκB pathway (41), mediated by PKC and IKK activation (42). Some evidence also suggests that FFA-mediated activation of IKK and NFκB may be, at least in part, mediated by the Toll-like receptor-4 (43). In addition, since activation of the NFκB pathway can result in an increase in circulating MCP-1 (44), it supports the notion that FFAs represent a primary link between obesity and the development of inflammatory changes. In our study, FFAs were increased in 25 week-old OZR, and can lead to oxidative damage and systemic inflammation. However, arterial structure and function were only slightly altered at this age. The early increase in FFAs, causing a modification of signaling pathways in the aorta, may be a cause of the vascular alterations observed at 80 weeks. Moreover, plasma FFAs remained higher in 80 week-old OZR compared to 80 week-old LZR.

The most important fractions of FFA in rat plasma are palmitic and linoleic acids (45). These FFAs were tested based on their average plasma concentration in Zucker rats. In our study, pretreatment by both linoleic and palmitic acid exerts specific effects on vascular tone as previously shown on the adrenergic response (46-48). Therefore, the FFA-induced endothelial dysfunction observed in our model may explain the increase in SBP in 80 week-old OZR. However, considering that FFAs increased the response to Phe in obese rats (Figure 7A), they are unlikely to be involved in the reduced sensitivity to Phe observed *in vitro* in OZR (Figure 3A). However, FFAs are probably involved in the decreased Ach-induced relaxation in 80 week-old OZR, since they reduce this response in isolated rings. In addition to previous studies (17, 18), our experiments provide further insight into the impact of FFAs on the endothelium, showing that linoleic or palmitic acids specifically target endothelium-dependent vasorelaxation in the very old. This is the first demonstration of endothelium-dependent effects of FFAs in an animal model of advanced age with increased arterial stiffness.

FFAs have also been demonstrated to mediate the phosphorylation of Akt, p38 MAPK and ERK1/2 in vascular smooth muscle cells (20), thus inducing proliferation, apoptosis and decreased NO production respectively. More specifically, palmitic acid enhances p38 MAPK activation in several cell types (21, 49), resulting in apoptosis or insulin-resistance. In our study, we have demonstrated that phosphorylated-p38 MAPK, -Akt and -ERK1/2 were significantly increased in 25 week-old OZR compared to their control LZR, whereas this difference was blunted in 80 week-old OZR. This pattern paralleled the concentrations of FFAs measured in our animals. Indeed, 25 week-old OZR displayed the highest level of FFAs, while they were lower in 25 week-old LZR and 80 week-old OZR. Together, these observations suggest that the effects of FFAs on vascular relaxation may depend on the activation of p38 MAPK, Akt and ERK1/2.

In conclusion, we have shown that obesity and its associated metabolic disorders synergize with great aging to alter vascular structure and function *in vivo* and *in vitro*, both targetting endothelial properties. The finding of an early increase in plasma FFAs before any activation of the NFκB pathway and FFA-induced impairment of carotid relaxation consolidates the hypothesis that FFAs are initiators in the pathogenesis of arterial stiffness development in this model. Our data underscore the interest of an early reduction in FFA levels, in order to prevent vascular alterations which appear later in life and are potentiated in the presence of obesity.

Funding

This work was supported by grants from: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Henri Poincaré Université of Vandoeuvre-lès-Nancy, France and « la Région Lorraine ».

Acknowledgements

We thank specially Anne-Laure Leblanc for technical assistance.

Conflict of interest: No disclosure

References

1. International Diabetes Federation, The IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. International Diabetes Federation, Brussels, Belgium 2006.

2. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among u.s. Adults. Diabetes Care 2004;27(10):2444-9.

3. Reaven G, Abbasi F, McLaughlin T. Obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. Recent Prog Horm Res 2004;59:207-23.

4. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. Diabetes Care 2001;24(4):683-9.

5. Perreault L, Bergman BC, Playdon MC, Dalla Man C, Cobelli C, Eckel RH. Impaired fasting glucose with or without impaired glucose tolerance: progressive or parallel states of prediabetes? Am J Physiol Endocrinol Metab 2008;295(2):E428-35.

6. Charles MA, Eschwege E, Basdevant A. Monitoring the obesity epidemic in France: the Obepi surveys 1997-2006. Obesity (Silver Spring) 2008;16(9):2182-6.

7. Gallagher EJ, Leroith D, Karnieli E. Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome. Mt Sinai J Med;77(5):511-23.

8. Boos CJ, Lip GY. Is hypertension an inflammatory process? Curr Pharm Des 2006;12(13):1623-35.

9. Van Zwieten PA, Kam KL, Pijl AJ, Hendriks MG, Beenen OH, Pfaffendorf M. Hypertensive diabetic rats in pharmacological studies. Pharmacol Res 1996;33(2):95-105.

10. Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, et al. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. Nat Genet 1996;13(1):18-9.

11. Louis H, Kakou A, Regnault V, Labat C, Bressenot A, Gao-Li J, et al. Role of alpha1beta1-integrin in arterial stiffness and angiotensin-induced arterial wall hypertrophy in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007;293(4):H2597-604.

12. Huang W, Alhenc Gelas F, Osborne-Pellegrin MJ. Protection of the arterial internal elastic lamina by inhibition of the renin-angiotensin system in the rat. Circ Res 1998;82(8):879-90.

13. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 1985;28(7):412-9.

14. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Mostefai HA, Tesse A, Mulder P, Rouet P, et al. Red wine polyphenols prevent metabolic and cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (Fa/Fa). PLoS One 2009;4(5):e5557.

15. Bu DX, Johansson ME, Ren J, Xu DW, Johnson FB, Edfeldt K, et al. Nuclear factor {kappa}B-mediated transactivation of telomerase prevents intimal smooth muscle cell from replicative senescence during vascular repair. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010;30(12):2604-10.

16. Mendoza-Nunez VM, Rosado-Perez J, Santiago-Osorio E, Ortiz R, Sanchez-Rodriguez MA, Galvan-Duarte RE. Aging linked to type 2 diabetes increases oxidative stress and chronic inflammation. Rejuvenation Res 2011;14(1):25-31.

17. Lundman P, Tornvall P, Nilsson L, Pernow J. A triglyceride-rich fat emulsion and free fatty acids but not very low density lipoproteins impair endothelium-dependent vasorelaxation. Atherosclerosis 2001;159(1):35-41.

18. Edirisinghe I, McCormick Hallam K, Kappagoda CT. Effect of fatty acids on endothelium-dependent relaxation in the rabbit aorta. Clin Sci (Lond) 2006;111(2):145-51.

19. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. Diabetes 2000;49(11):1939-45.

20. Schauer IE, Reusch JE. Nonesterified fatty acid exposure activates protective and mitogenic pathways in vascular smooth muscle cells by alternate signaling pathways. Metabolism 2009;58(3):319-27.

21. Jiang H, Liang C, Liu X, Jiang Q, He Z, Wu J, et al. Palmitic acid promotes endothelial progenitor cells apoptosis via p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways. Atherosclerosis 2010;210(1):71-7.

22. Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF. The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. Hypertension 1992;19(1 Suppl):I110-5.

23. Galisteo M, Sanchez M, Vera R, Gonzalez M, Anguera A, Duarte J, et al. A diet supplemented with husks of Plantago ovata reduces the development of endothelial dysfunction, hypertension, and obesity by affecting adiponectin and TNF-alpha in obese Zucker rats. J Nutr 2005;135(10):2399-404.

24. Subramanian R, MacLeod KM. Age-dependent changes in blood pressure and arterial reactivity in obese Zucker rats. Eur J Pharmacol 2003;477(2):143-52.

25. Johnson PR, Stern JS, Horwitz BA, Harris RE, Jr., Greene SF. Longevity in obese and lean male and female rats of the Zucker strain: prevention of hyperphagia. Am J Clin Nutr 1997;66(4):890-903.

26. Michel JB, Heudes D, Michel O, Poitevin P, Philippe M, Scalbert E, et al. Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes. II. Large arteries. Am J Physiol 1994;267(1 Pt 2):R124-35.

27. Sista AK, O'Connell MK, Hinohara T, Oommen SS, Fenster BE, Glassford AJ, et al. Increased aortic stiffness in the insulin-resistant Zucker fa/fa rat. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;289(2):H845-51.

28. Bezie Y, Lamaziere JM, Laurent S, Challande P, Cunha RS, Bonnet J, et al. Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998;18(7):1027-34.

29. Lacolley P, Labat C, Pujol A, Delcayre C, Benetos A, Safar M. Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone. Circulation 2002;106(22):2848-53.

30. Lacolley P, Safar ME, Regnault V, Frohlich ED. Angiotensin II, mechanotransduction, and pulsatile arterial hemodynamics in hypertension. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009;297(5):H1567-75.

31. Harker CT, O'Donnell MP, Kasiske BL, Keane WF, Katz SA. The renin-angiotensin system in the type II diabetic obese Zucker rat. J Am Soc Nephrol 1993;4(6):1354-61.

32. Cox RH, Kikta DC. Age-related changes in thoracic aorta of obese Zucker rats. Am J Physiol 1992;262(5 Pt 2):H1548-56.

33. Walker AB, Chattington PD, Buckingham RE, Williams G. The thiazolidinedione rosiglitazone (BRL-49653) lowers blood pressure and protects against impairment of endothelial function in Zucker fatty rats. Diabetes 1999;48(7):1448-53.

34. Yang AL, Chao JI, Lee SD. Altered insulin-mediated and insulin-like growth factor-1-mediated vasorelaxation in aortas of obese Zucker rats. Int J Obes (Lond) 2007;31(1):72-7.

35. Bouvet C, Belin de Chantemele E, Guihot AL, Vessieres E, Bocquet A, Dumont O, et al. Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction. Hypertension 2007;50(1):248-54.

36. Vessieres E, Belin de Chantemele EJ, Toutain B, Guihot AL, Jardel A, Loufrani L, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition restored endothelium-mediated relaxation in old obese zucker rat mesenteric arteries. Front Physiol;1:145.

37. Koh KK, Oh PC, Quon MJ. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? Cardiovasc Res 2009;81(4):649-59.

38. Lee S, Park Y, Dellsperger KC, Zhang C. Exercise training improves endothelial function via adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011.

39. Szocs Z, Brunmair B, Stadlbauer K, Nowotny P, Bauer L, Luger A, et al. Age-dependent development of metabolic derangement and effects of intervention with pioglitazone in Zucker diabetic fatty rats. J Pharmacol Exp Ther 2008;326(1):323-9.

40. Oana F, Takeda H, Hayakawa K, Matsuzawa A, Akahane S, Isaji M, et al. Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. Metabolism 2005;54(8):995-1001.

41. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha. Diabetes 2002;51(7):2005-11.

42. Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang D, Quon MJ, Lefevre M, et al. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. Mol Endocrinol 2004;18(8):2024-34.

43. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. J Clin Invest 2006;116(11):3015-25.

44. Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P, et al. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. Diabetes 2005;54(12):3458-65.

45. Yamazaki K, Hamazaki T, Yano S, Funada T, Ibuki F. Changes in fatty acid composition in rat blood and organs after infusion of docosahexaenoic acid ethyl ester. Am J Clin Nutr 1991;53(3):620-7.

46. Grekin RJ, Dumont CJ, Vollmer AP, Watts SW, Webb RC. Mechanisms in the pressor effects of hepatic portal venous fatty acid infusion. Am J Physiol 1997;273(1 Pt 2):R324-30.

47. Egan BM, Schork NJ, Weder AB. Regional hemodynamic abnormalities in overweight men. Focus on alpha-adrenergic vascular responses. Am J Hypertens 1989;2(6 Pt 1):428-34.

48. Stepniakowski KT, Goodfriend TL, Egan BM. Fatty acids enhance vascular alpha-adrenergic sensitivity. Hypertension 1995;25(4 Pt 2):774-8.

49. Gao D, Nong S, Huang X, Lu Y, Zhao H, Lin Y, et al. The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. J Biol Chem 2010;285(39):29965-73.

Figure Legends

Figure 1. Mechanical properties in carotid arteries in 25 and 80 week-old LZR and OZR. Incremental elastic modulus (*E*inc)-wall stress (WS) curve (A) from 25 and 80 week-old lean and obese rats. B, Carotid artery mean wall stress within the 800- to 1600-kPa range of Einc (MWS800-1600) in the same rats (ANOVA, age: $P < 10^{-6}$, strain: $P < 0.05$, interaction: $P = 0.3$). Values are means ± SEM. * P < 0.05, 80 week-old *vs* 25 week-old in the same strain ; † P < 0.05, obese *vs* lean at the same age (n=14-21 in each group).

Figure 2. Composition of aortic media in 25 and 80 week-old LZR and OZR. A, Dry weight of thoracic aorta media. B, Cell protein content, expressed as % of dry weight. C, Elastin content,(% of dry weight). D, Collagen content (% of dry weight). E, Elastin/collagen ratio. F, Protein level of total fibronectin was normalized to that of tubulin, used as loading control. Values are means ± SEM (n=10-14 in each group). * P < 0.05, 80 week-old *vs* 25 week-old in the same strain ; † P < 0.05, obese *vs* lean at the same age.

Figure 3. Vascular reactivity in carotid arteries in 25 and 80 week-old lean and obese rats. Concentration–response curves of carotid arteries from 25 and 80 week-old lean and obese rats to phenylephrine (Phe) (A), acetylcholine (Ach) (B) and sodium nitroprusside (SNP) (C). Values are means ± SEM (at least 4 rings/animal, were used in 3-5 animals in each group). * P < 0.05, 80 week-old *vs* 25 week-old in the same strain ; † P < 0.05, obese *vs* lean at the same age.

Figure 4. Endothelial dysfunction markers in 25 and 80 week-old lean and obese rats. Plasma levels of von Willebrand Factor (vWF) expressed as µg/ml (A) and soluble CD146 (sCD146), expressed as the optical density at 450 nm (B). Values are means ± SEM (n=10-14 in each group). * P < 0.05, 80 week-old *vs* 25 week-old in the same strain ; † P < 0.05, obese *vs* lean at the same age.

Figure 5. Activation of several kinases in aorta from 25 and 80 week-old LZR and OZR. Western blot analyses of aorta from 25 and 80 week-old lean and obese rats. Phosphorylation levels of p38 MAPK (A), Akt (B) and ERK1/2 (C) were normalized to those of the corresponding total proteins. Data are expressed as the mean phosphorylated/total ratio ± SEM (n=9 for all groups). * $P < 0.05$, 80 week-old *vs* 25 week-old in the same strain ; † $P < 0.05$, obese *vs* lean at the same age.

Figure 6. Oxidative stress and inflammation state in 25 and 80 week-old LZR and OZR. ELISA and western blot analyses of plasma and aorta from 25 and 80 week-old lean and obese rats. Plasma levels of TBARS (µM MDA) (A) and Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) (B) ; Phosphorylation levels of NFκB (C) and IκBα (D) were normalized to those of the corresponding total proteins. Data are expressed as a mean phosphorylated/total ratio ± SEM (n=9 for all groups). E. Plasma level of Adiponectin. Values are means ± SEM. (n=7-10 in each group). * $P < 0.05$, 80 week-old *vs* 25 week-old in the same strain ; † $P < 0.05$, obese *vs* lean at the same age.

Figure 7. Effects of free fatty acids (FFAs) on reactivity in carotid arteries from 25 and 80 week-old LZR and OZR. Contraction to 10^{-5}M Phe (A) and relaxation to 10^{-4}M Ach (B) of intact carotid artery rings (E+) from 25 and 80 week-old lean and obese rats. Contraction to 10^{-5}M Phe (C) and relaxation to 10^{-4}M SNP (D) of carotid artery rings without endothelium (E-) from 25 and 80 week-old lean and obese rats. Contraction is expressed as a % of the response obtained before treatment (corresponding to 100%) with BSA (Vehicle), or linoleic acid. Values are means ± SEM (at least 3 rings/animal, using in 3-5 animals in each group). * $P < 0.05$, linoleic acid *vs* vehicle.

Table 1 : Hemodynamic and metabolic parameters of 25 and 80 week-old LZR and OZR

	LZR		OZR		ANOVA		
	25 wk	**80 wk**	**25 wk**	**80 wk**	**Age**	**Strain**	**Interaction**
Conscious SAP (mmHg)	158 ± 2	134 ± 8 *	165 ± 2 †	178 ± 10 †	NS	< 0.05	< 0.01
Conscious Heart Rate (bpm)	431 ± 21	365 ± 14 *	405 ± 16	391 ± 14	< 0.05	NS	NS
Glucose (mmol/L)	8.0 ± 0.3	11.5 ± 0.8 *	9.4 ± 0.7	13.6 ± 2.3 *	< 0.01	NS	NS
Insulin (ng/mL)	0.66 ± 0.06	2.02 ± 0.48 *	10.5 ± 1.43 †	2.1 ± 0.71 *	< 0.001	< 0.001	< 0.001
HOMA-IR	32 ± 4	154 ± 88	592 ± 114 †	181 ± 113 *	< 0.05	< 0.001	< 0.001
Cholesterol (mmol/L)	1.2 ± 0.1	2.5 ± 0.1 *	5.6 ± 0.3 †	6.1 ± 0.4 †	< 0.001	< 0.001	NS
HDL Cholesterol (mmol/L)	0.73 ± 0.03	0.65 ± 0.03	2.47 ± 0.1 †	1.43 ± 0.1 * †	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Triglycerides (mmol/L)	0.15 ± 0.01	0.57 ± 0.08 *	1.55 ± 0.35 †	2.81 ± 0.75 * †	< 0.05	< 0.001	NS
FFA (µg/µL)	310 ± 34	151 ± 31	1 866 ± 177 †	383 ± 66 * †	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Leptin (ng/ml)	0.4 ± 0.1	2.9 ± 0.7 *	33.1 ± 3.0 †	176.4 ± 66.2 * †	< 0.05	< 0.001	NS
Hematocrit (%)	44 ± 8	40 ± 2	42 ± 2	27 ± 5 * †	NS	< 0.001	< 0.05
Creatinine (mmol/L)	42 ± 2	53 ± 2	41 ± 1	128 ± 42 * †	< 0.01	< 0.05	< 0.05

All values are means ± SEM. * P < 0.05, 80 *vs* 25 week-old in the same strain ; † P < 0.05, obese *vs* lean at the same age. (n=6-11 in each group). LZR : Lean Zucker Rat ; OZR : Obese Zucker Rat ; SAP : systolic arterial pressure ; bpm : beats per minute ; HOMA-IR : Homeostasis model of assessment – insulin resistance ; FFA : free fatty acid.

Table 2 : Hemodynamic and arterial mechanical parameters of 25 and 80 week-old LZR and OZR

	LZR		OZR		ANOVA		
	25 wk	**80 wk**	**25 wk**	**80 wk**	**Age**	**Strain**	**Interaction**
MAP (mmHg)	111 ± 7	87 ± 6 *	130 ± 6	82 ± 8 *	< 0.001	NS	NS
Diameter at MAP (mm)	1.21 ± 0.04	1.24 ± 0.04	1.16 ± 0.04	1.08 ± 0.04 †	NS	< 0.01	NS
MCSA (mm^2)	0.112 ± 0.011	0.170 ± 0.010 *	0.099 ± 0.010	0.170 ± 0.011 *	< 0.001	NS	NS
Wall Stress at MAP (kPa)	339 ± 37	175 ± 32 *	379 ± 31	124 ± 38 *	< 0.001	NS	NS
Einc at MAP (kPa)	973 ± 144	702 ± 125	1 279 ± 122	674 ± 149 *	< 0.001	NS	NS

All values are means ± SEM. * P < 0.05, 80 *vs* 25 week-old in the same strain ; † P < 0.05, obese *vs* lean at the same age (n= 14-21 in each group). LZR : Lean Zucker Rat ; OZR : Obese Zucker Rat ; Einc : elastic modulus ; MAP : mean arterial pressure ; MCSA : media cross sectional area.

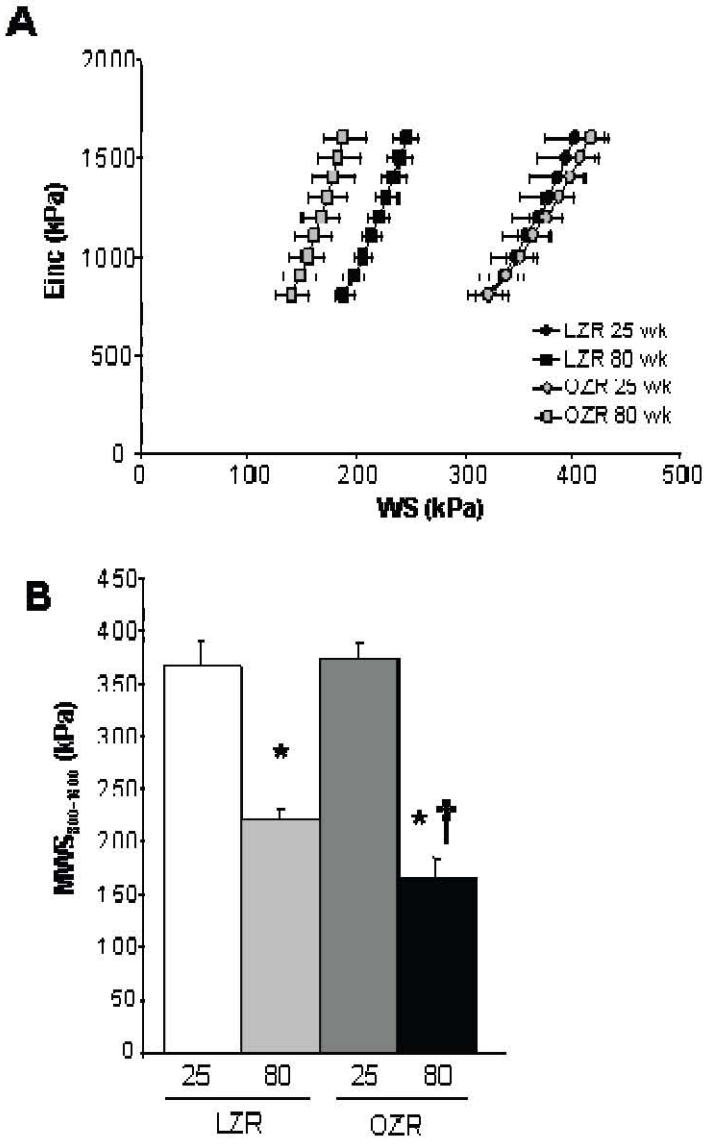

A
Einc (kPa)
2000
1500
1000
500
0
0
100
200
300
400
500
WS (kPa)
LZR 25 wk
LZR 80 wk
OZR 25 wk
OZR 80 wk
B
MWS500-800 (kPa)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
*
*
†
25
80
25
80
LZR
OZR

Figure 1

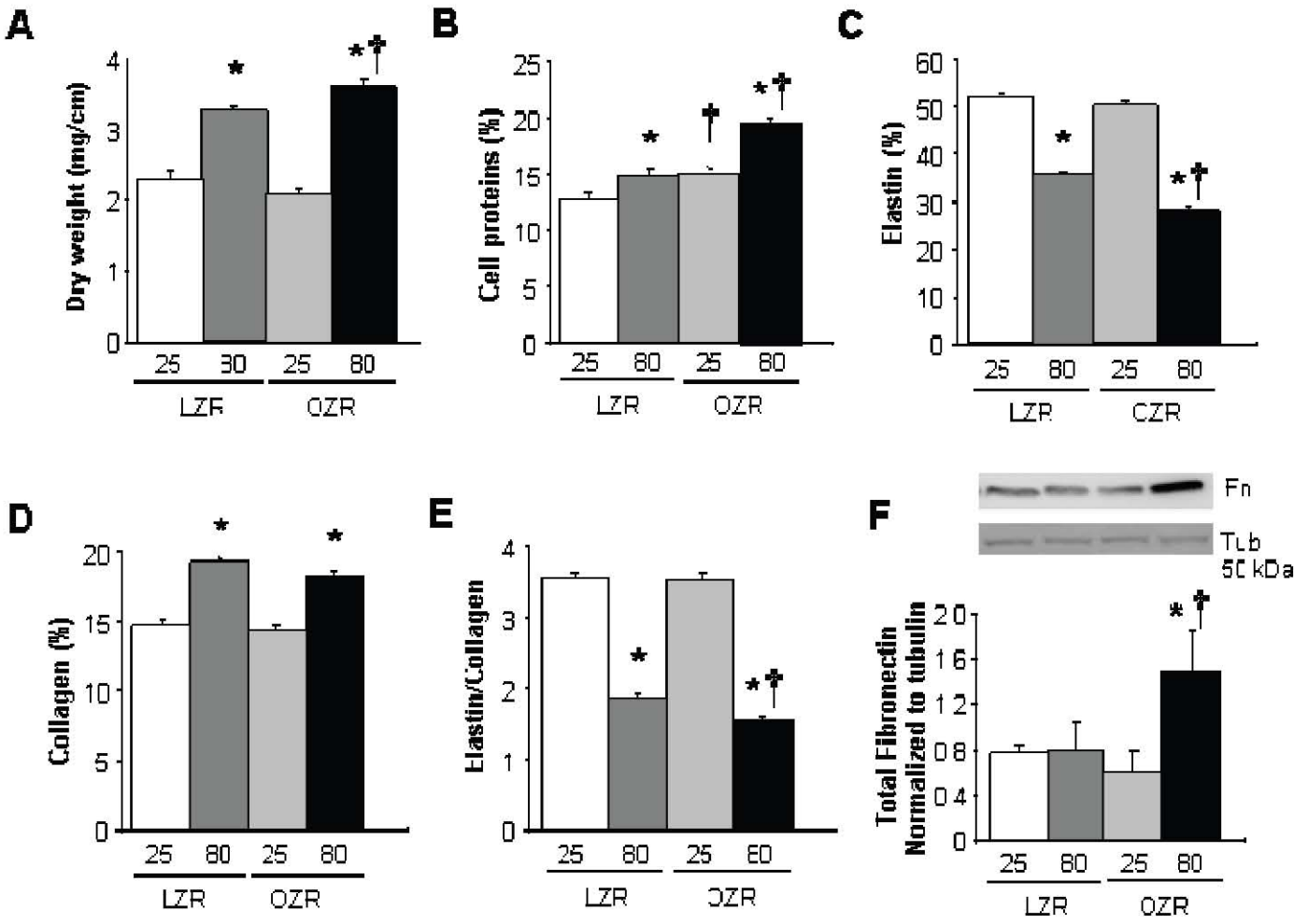

A
Dry weight (mg/cm)
4
3
2
1
0
*
*†
25
30
25
80
LZR
OZR
B
Cell proteins (%)
25
20
15
10
5
0
*
†
*†
25
80
25
80
LZR
OZR
C
Elastin (%)
60
50
40
30
20
10
0
*
*†
25
80
25
80
LZR
CZR
D
Collagen (%)
20
15
10
5
0
*
*
25
80
25
80
LZR
OZR
E
Elastin/Collagen
4
3
2
1
0
*
*†
25
80
25
80
LZR
OZR
F
Fn
Tub
50 kDa
Total Fibronectin
Normalized to tubulin
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0
*†
25
80
25
80
LZR
OZR

Figure 2

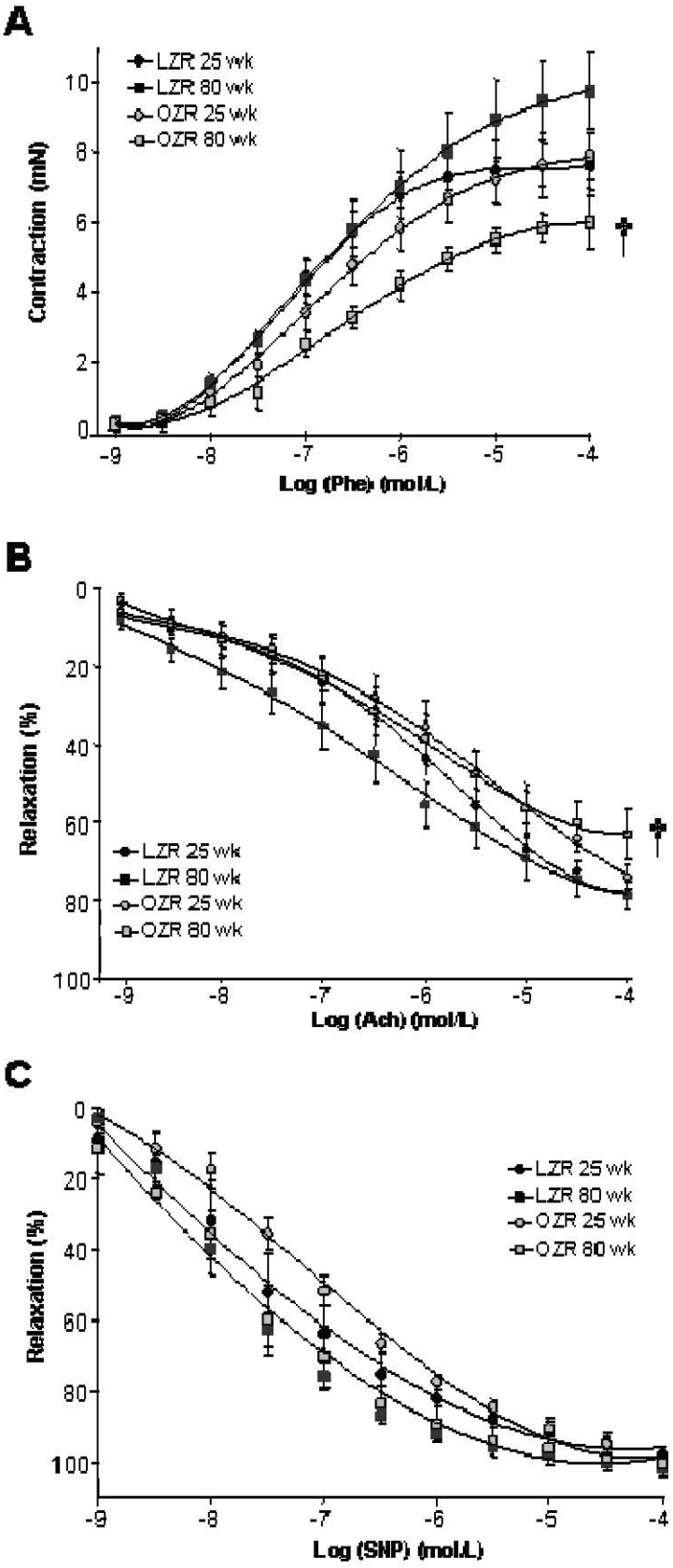

A
LZR 25 wk
LZR 80 wk
OZR 25 wk
OZR 80 wk
Contraction (mN)
Log (Phe) (mol/L)
B
Relaxation (%)
Log (Ach) (mol/L)
C
Relaxation (%)
Log (SNP) (mol/L)

Figure 3

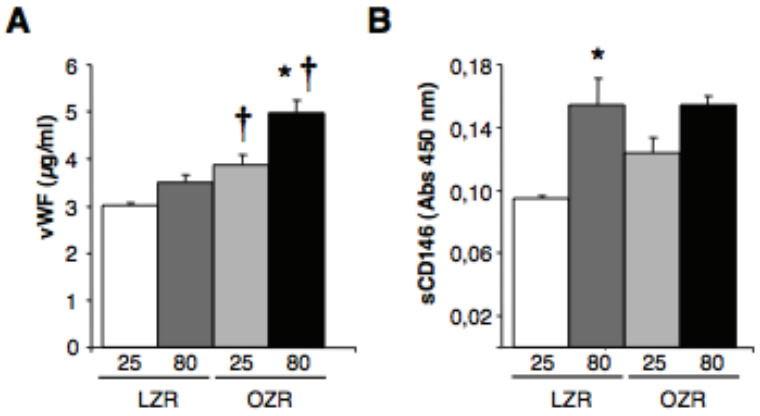

A
vWF (µg/ml)
6
5
4
3
2
1
0
*
†
†
25
80
25
80
LZR
OZR
B
sCD146 (Abs 450 nm)
0,18
0,14
0,10
0,06
0,02
*
25
80
25
80
LZR
OZR

Figure 4

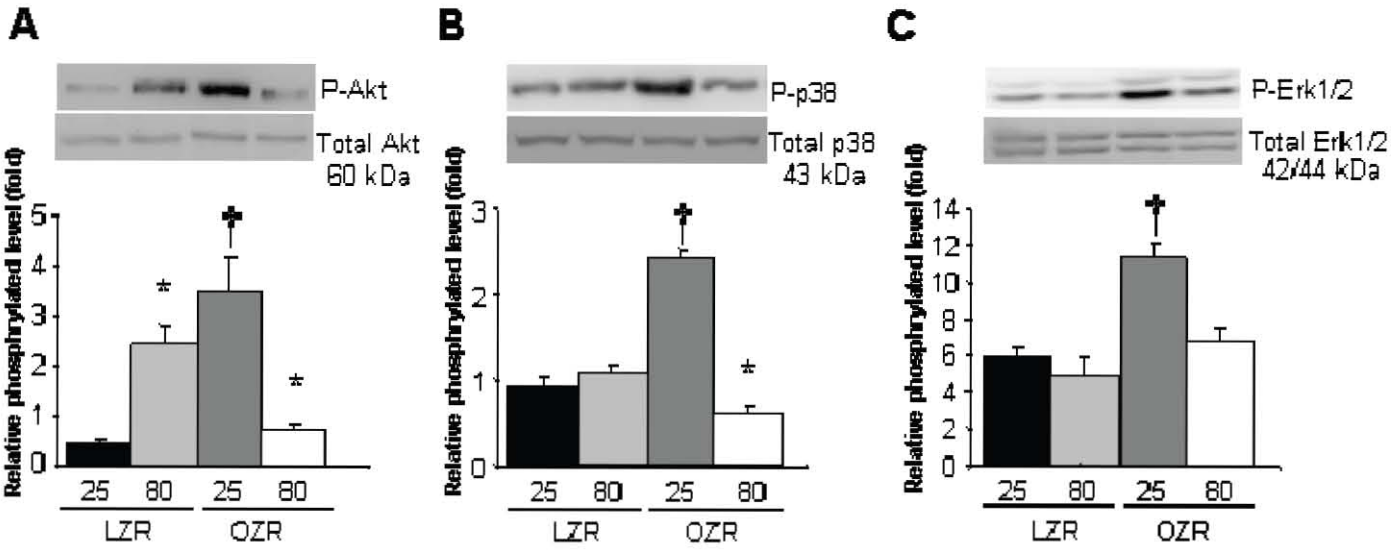

A
P-Akt
Total Akt
60 kDa
Relative phosphorylated level (fold)
0
1
2
3
4
5
25
80
25
80
LZR
OZR
B
P-p38
Total p38
43 kDa
Relative phosphorylated level (fold)
0
1
2
3
25
80
25
80
LZR
OZR
C
P-Erk1/2
Total Erk1/2
42/44 kDa
Relative phosphorylated level (fold)
0
2
4
6
8
10
12
14
25
80
25
80
LZR
OZR

Figure 4

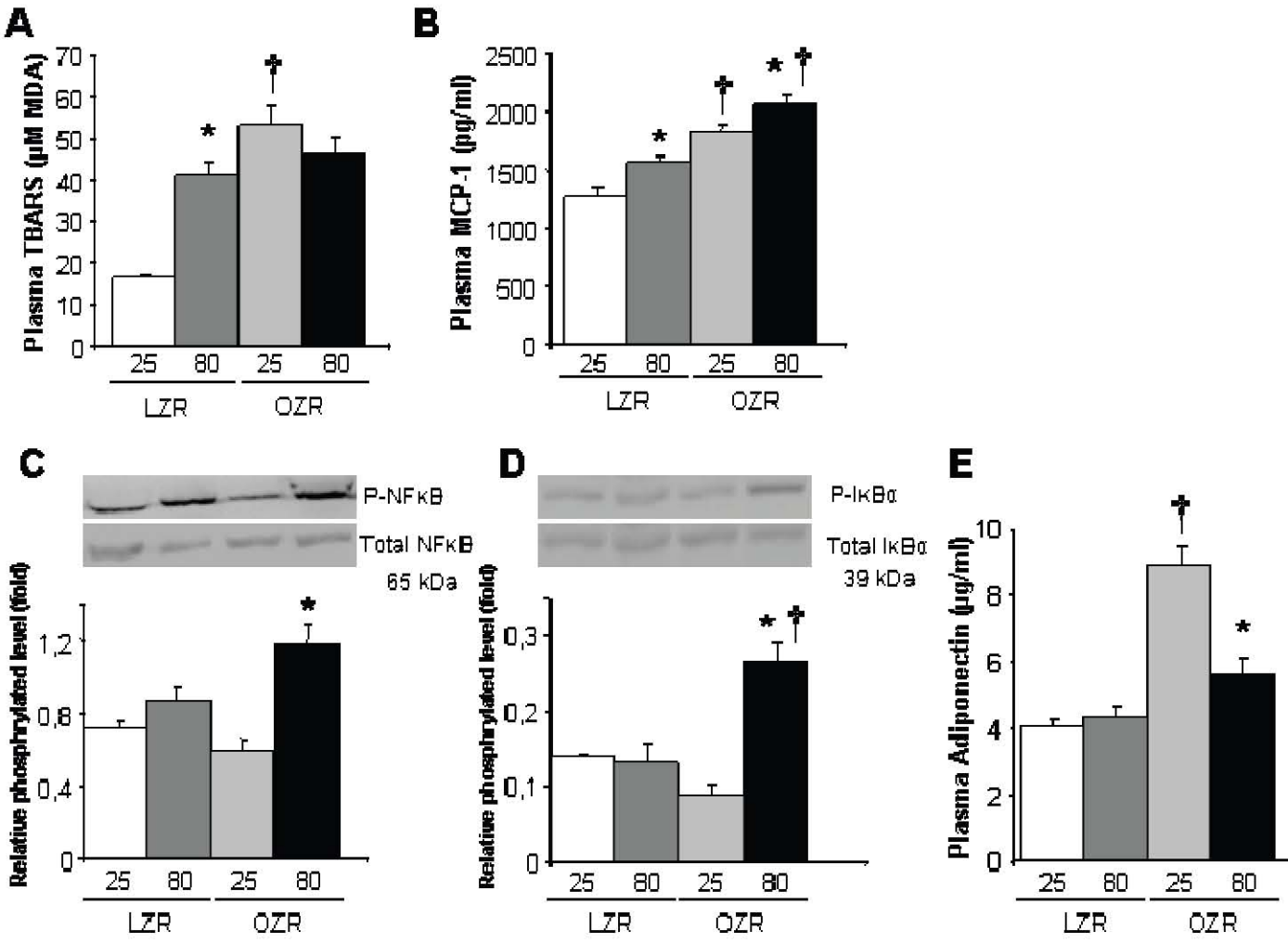

A
Plasma TBARS (µM MDA)
70
60
50
40
30
20
10
0
25
80
25
80
LZR
OZR
B
Plasma MCP-1 (pg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
25
80
25
80
LZR
OZR
C
P-NFκB
Total NFκB
65 kDa
Relative phosphorylated level (fold)
1,2
0,8
0,4
0
25
80
25
80
LZR
OZR
D
P-IκBα
Total IκBα
39 kDa
Relative phosphorylated level (fold)
0,3
0,2
0,1
0
25
80
25
80
LZR
OZR
E
Plasma Adiponectin (µg/ml)
10
8
6
4
2
0
25
80
25
80
LZR
OZR

Figure 5

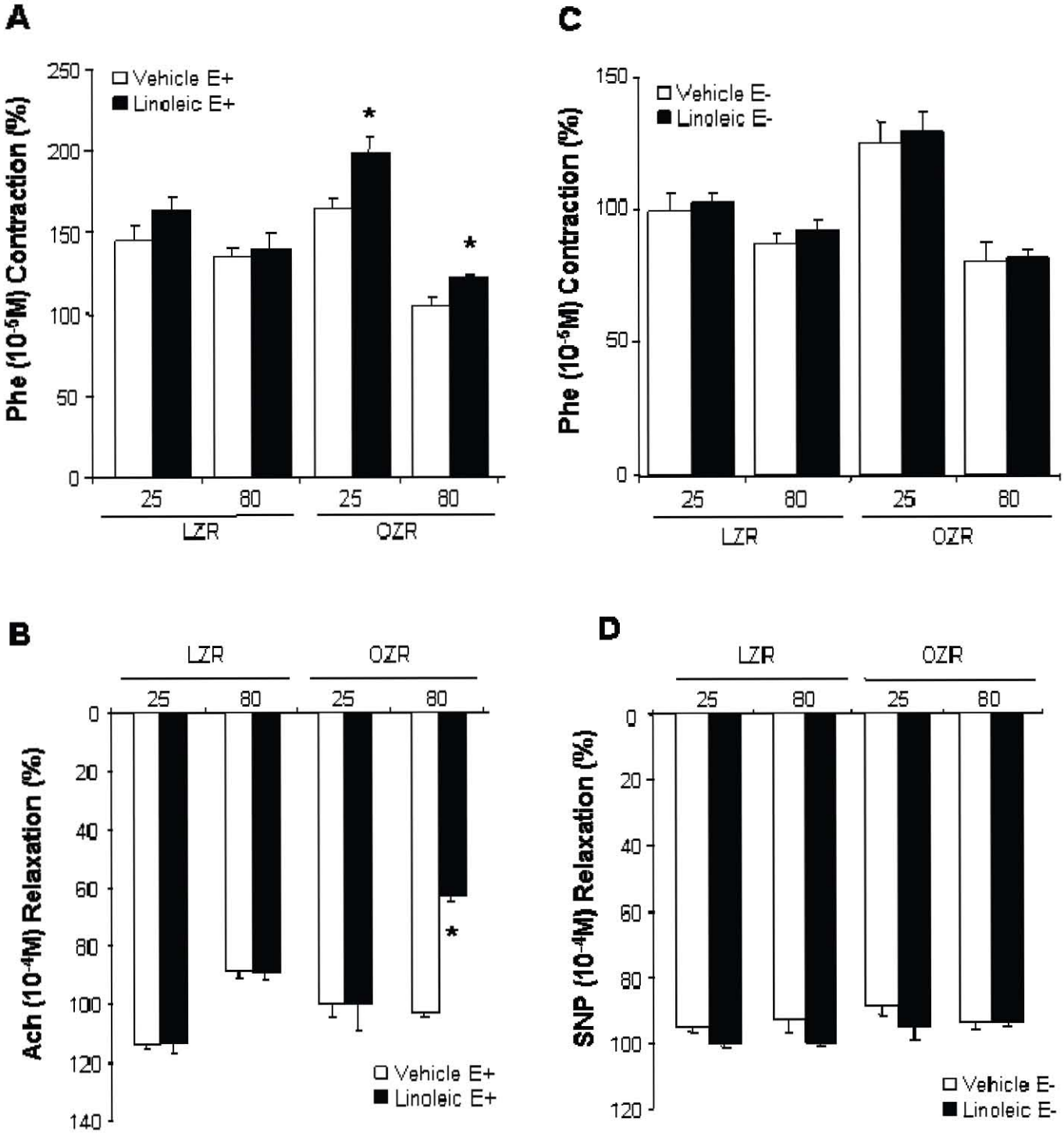

A
Vehicle E+
Linoleic E+
Phe (10-5M) Contraction (%)
250
200
150
100
50
0
*
*
25
80
25
80
LZR
OZR
C
Vehicle E-
Linoleic E-
Phe (10-5M) Contraction (%)
150
100
50
0
25
80
25
80
LZR
OZR
B
LZR
OZR
25
80
25
80
Ach (10-4M) Relaxation (%)
0
20
40
60
80
100
120
140
*
Vehicle E+
Linoleic E+
D
LZR
OZR
25
80
25
80
SNP (10-4M) Relaxation (%)
0
20
40
60
80
100
120
Vehicle E-
Linoleic E-

Figure 6

ONLINE SUPPLEMENT

Fatty Acids Impair Endothelium-Dependent Vasorelaxation: A Link between Obesity and Arterial Stiffness in Very Old Zucker Rats

Authors : Natacha Sloboda[1], Bruno Fève[2], Simon Nigel Thornton[1], Rosine Nzietchueng[1], Véronique Regnault[1], Ginny Simon[1], Carlos Labat[1], Huguette Louis[1], Jean-Pierre Max[1], Adeline Muscat[3], Mary Osborne-Pellegrin[4], Patrick Lacolley[1], and Athanase Benetos[5]

Affiliations : [1] Inserm, U961, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54500 France ; Univ Henri Poincaré, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54500 France.
[2] Inserm, UMR S938, Paris, F-75012 France ; Faculté de Médecine de St Antoine, Univ Paris 6, F-75012 France ; Assistance-Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Endocrinologie, Paris, F-75012 France.
[3] Inserm, UMR S938, Paris, F-75012 France ; Faculté de Médecine de St Antoine, Univ Paris 6, F-75012 France.
[4] Inserm, U698, Paris, F-75018 France ; Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris F-75018, France.
[5] Inserm, U961, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54500 France ; Univ Henri Poincaré, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54500 France ; CHU Nancy, Hop Brabois, Département de Gériatrie, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54500 France.

Corresponding author:

Athanase Benetos
Department of Geriatrics CHU Nancy
54 510 Vandoeuvre-lès-Nancy, FRANCE
Phone number : +33 3.83.15.33.22
Fax number : +33 3.83.15.76.68
E-mail : a.benetos@chu-nancy.fr

Supplementary Methods

Animals.
Male obese Zucker rats (OZR, fa/fa, n=44) and their age-matched male lean Zucker rat controls (LZR, ?/FA ; n=46) were obtained from our local breeding colony (animal facility, Faculty of Medicine of Nancy, France). The animals were maintained at a temperature of 22-24°C, with a 12h light-dark cycle (light beginning at 8 A.M.) and given free access to water and chow (A04 standard, Scientific Animal Food and Engineering). The study was performed at the 25th and 80th week of age. Measurements of arterial stiffness were performed on 37 LZR and 36 OZR. Blood biochemical measurements have been carried out on some of these animals (19 LZR and 18 OZR). The thoracic aortas of some of these animals were used for determination of the extracellular matrix (27 LZR and 23 OZR), while the other thoracic aortas were used for Western blots (18 LZR and 18 OZR). Vascular reactivity experiments were performed on carotid arteries of 9 LZR and 8 OZR. All procedures were conducted in accordance with and approved by the Animal Ethics Committee of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and conformed to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the National Institutes of Health.

Measurement of conscious systolic blood pressure and heart rate
Systolic blood pressure (SBP) and heart rate (HR) were measured every day during 2 weeks at the same time of day using a tail-cuff blood pressure analyzer (Blood Pressure Analysis System, model SC-1000, Hatteras Instruments, Cary, North Carolina, USA). Before measurements, rats were warmed for 5 min at 37°C in a cage placed on a heating platform to enhance tail artery pulsations. After obtaining successful measurements without disturbance of the signal, the mean SBP and HR values were recorded. For each rat, measurements of the five last days were selected.

Mechanical parameters
The relation between the blood pressure and the lumen cross-sectional area (LCSA) was fitted using an arctangent function (model of Langewouters) and 3 optimal-fit parameters (α, β, and γ), as follows:

$$\text{LCSA}=\frac{\pi D^2}{4}=\alpha\left[\frac{\pi}{2}+\tan^{-1}\left(\frac{P-\beta}{\gamma}\right)\right] \quad (1)$$

Arterial cross-sectional Dist, σ, and Einc are given by the following equations:

$$\text{Dist}(P)=\frac{1}{\text{LCSA}}\times\frac{\delta\text{LCSA}}{\delta P} \quad (2)$$

$$\sigma=\frac{2\text{LCSA}\times P}{\text{MCSA}} \quad (3)$$

$$\text{Einc}=\frac{3}{\text{Dist}}\left(1+\frac{\text{LCSA}}{\text{MCSA}}\right), \quad (4)$$

where MCSA is the media cross-sectional area.

Determination of Elastin, Collagen and Cell Protein Contents of Aortic media

Medial composition was measured in descending thoracic aortas. Under a dissecting microscope equipped with a grid in the eyepiece, the aortic arch was discarded, the aorta opened longitudinally, the media separated from the adventitia and the length of the medial segment was recorded, Medial segments, without homogenization, were defatted and dried to constant weight, and their weight was recorded. Cell proteins were extracted by 0.3% SDS and subsequently assayed and insoluble elastin was purified by the hot alkali method (3 x 15 min in 0.1 N NaOH, in a boiling water bath) and quantified by weighing. Proteins in the NaOH extract were then hydrolyzed, and total collagen was determined by assaying the hydroxyproline content. Components were expressed either as percentage of medial dry weight or as milligrams per centimeter of aortic media.

Immunoblot Analyses

Tissue lysates were prepared by homogenizing frozen aortas in a lysis buffer containing inhibitors for phosphatases and proteinases (Roche, Meylan, France). Proteins were then subjected to SDS-PAGE and transferred to Hybond C Extra Membranes (Amersham Bioscience, Glattbrugg, Swiss).

After 1h in blocking buffer (TBS-0.1% Tween (TBST)-5% non-fat dry milk), membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies. Antibodies were all diluted in TBST-5% bovine serum albumin (BSA). Antibodies against phosphorylated and native forms of ERK1/2, p38 MAPK, Akt, IκBα and NFκB (Cell Signaling, Saint Quentin Yvelines, France) were used at 1:500 (phosphorylated) and 1:1000 (native) respectively. Antibody against fibronectin (Chemicon Int., Molsheim, France) was used at 1:400, and against tubulin (Sigma, Lyon, France) at 1:7000. After primary antibody incubation, membranes were rinsed 3 times with TBST. Then, they were incubated for 1 h at room temperature with secondary anti-mouse or anti-rabbit antibodies at 1:2000 (GE Healthcare, Aulnay-sous-Bois, France). After four washings with TBST, protein bands were detected by chemiluminescence with the Immun-Star™ system according to the manufacturer's recommendations (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). The signal intensities were quantified by densitometry with a computerized image processing system (LAS-4000, Fuji-Sciences, Courbevoie, France).

Vascular reactivity

Animals were sacrificed at 25 or 80 weeks of age by exsanguination. The whole carotid artery was removed and immediately placed in a physiological salt solution (PSS) of the following composition (mM): NaCl 130.0, KCl 3.7, $CaCl_2$ 1.6, $NaHCO_3$ 14.9, $MgSO_4$ 1.2, KH_2PO_4 1.2 and glucose 11.0. After carefully cleaning the loosely adherent fat and connective tissue, the arteries were cut into 3-mm rings and placed on a wire myograph (Danish MyoTechnology, Aarhus, Denmark) continuously oxygenated with a mixture of 75%N_2/20%O_2/5% CO_2 at 37°C. The endothelium was removed in some carotid rings by gently rubbing the inside of the rings with a stainless steel wire.

The arterial rings were equilibrated for at least 40 min under a resting tension of 4.9 mN. During the equilibration period, the PSS solution in the bath was changed every 15 min. At the end of equilibration, the functional integrity of endothelium was tested by determining the ability of rings precontracted with an ED70 concentration of phenylephrine (Phe) to relax in response to 10^{-5}M acetylcholine (Ach).

Contractile responses to Phe and relaxation in response to Ach and sodium nitroprusside (SNP) were determined by cumulative addition of the agonists to the

tissue bath to give the final concentration indicated in the figures. Tissues were pre-incubated with 0.5 mM palmitic acid diluted in BSA 1%, 0.5 mM linoleic acid diluted in BSA 1%, or BSA 1% alone (vehicle) for 30 min before concentration–response curves to Ach were obtained. Tissues were pre-incubated with 0.5 mM linoleic acid diluted in BSA 1% or BSA 1% alone (vehicle) for 30 min before concentration–response curves to SNP were obtained. Where the vasorelaxant responses to Ach were studied, the tissues were precontracted with 10^{-5}M Phe. When the contractile response to Phe reached a plateau, Ach was added in a cumulative manner.

Table S1: Body and organ weights in 25 and 80 week-old LZR and OZR.

	LZR		OZR		ANOVA		
	25 wk	**80 wk**	**25 wk**	**80 wk**	**Age**	**Strain**	**Interaction**
Body Weight (g)	350 ± 26	432 ± 23 *	486 ± 23 †	531 ± 27 *†	< 0.001	< 0.01	NS
Heart Weight (g)	1.09 ± 0.09	1.49 ± 0.08 *	1.18 ± 0.08	1.79 ± 0.09 *†	< 0.01	< 0.001	NS
Kidney Weight (g)	1.17 ± 0.10	1.53 ± 0.08 *	1.29 ± 0.09	1.90 ± 0.10 *†	< 0.01	< 0.001	NS

All values are means ± SEM. * P < 0.05 80 *vs* 25 wk in the same strain ; † P < 0.05 obese *vs* lean at the same age. (n=14-21 in each group). LZR : Lean Zucker rat ; OZR : Obese Zucker rat

Table S2: Carotid artery histomorphometry of 25 wk and 80 week-old LZR and OZR.

	LZR		OZR		ANOVA		
	25 wk	**80 wk**	**25 wk**	**80 wk**	**Age**	**Strain**	**Interaction**
Media Thickness (µm)	44 ± 3	63 ± 3 *	47 ± 3	67 ± 3 *	< 0.001	NS	NS
Lumen Perimeter (um)	2777 ± 81	2 822 ± 54	2536 ± 81 *	2 725 ± 63	NS	< 0.05	NS
Nuclear number /section	103 ± 4	156 ± 3 *	92 ± 4	162 ± 4 *	< 0.001	NS	NS
Nuclear density ($mm^2.10^{-3}$)	0.93 ± 0.03	1.01 ± 0.02	0.85 ± 0.03	0.99 ± 0.03	NS	NS	NS

All values are means ± SEM. * P < 0.05 80 *vs* 25 wk in the same strain ; † P < 0.05 obese *vs* lean at the same age. (n=14-21 in each group). LZR : Lean Zucker rat ; OZR : Obese Zucker rat

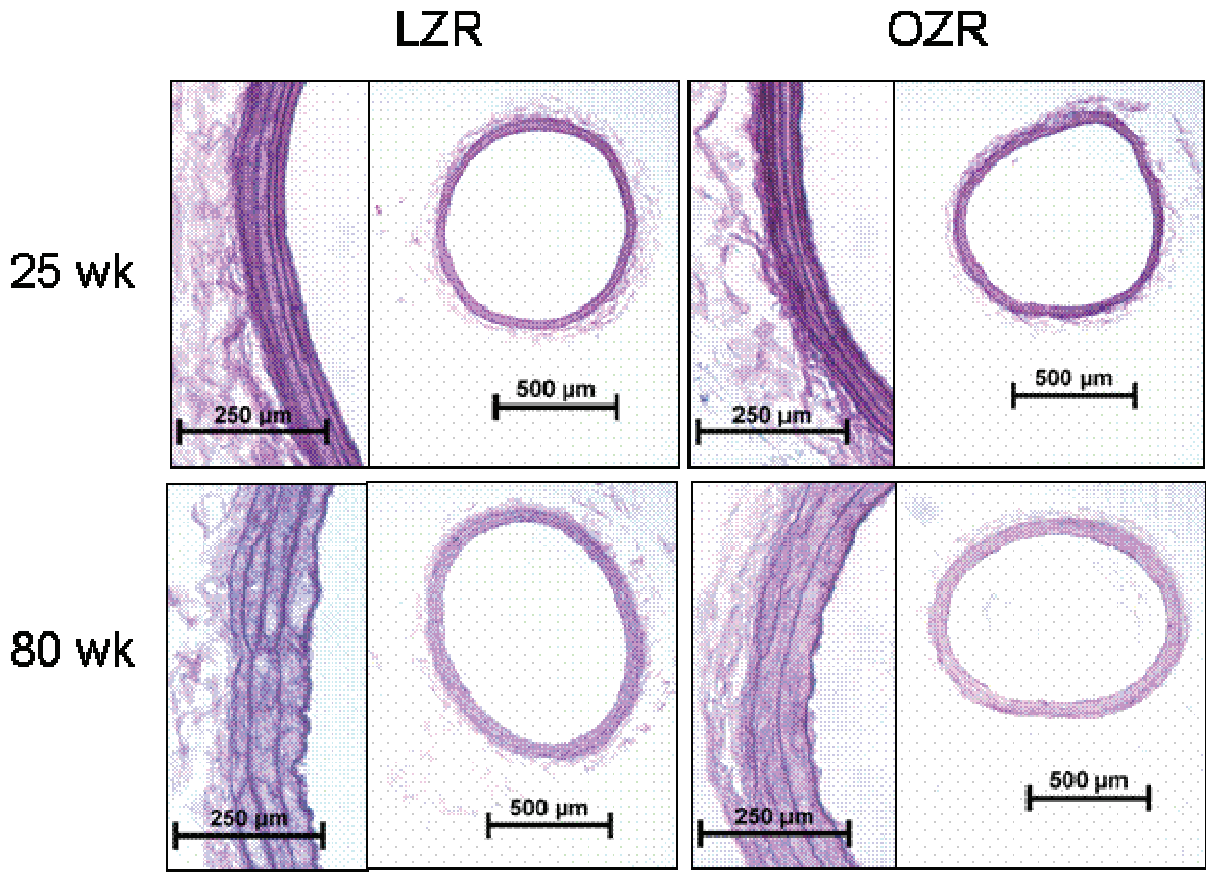


Figure S1. Carotid artery geometry in 25 and 80 week-old LZR and OZR. Weigert method was used for elastic fiber staining (n=15-20 in each group).

Table S3: Vascular reactivity of 25 and 80 week-old LZR and OZR.

	LZR		OZR		ANOVA		
	25 wk	**80 wk**	**25 wk**	**80 wk**	**Age**	**Strain**	**Interaction**
Phenylephrine							
Emax (mN)	7.70 ± 0.66	9.68 ± 0.73	7.85 ± 0.58	5.92 ± 0.43 †	NS	NS	< 0.05
pD2	7.10 ± 0.10	6.73 ± 0.09 *	6.82 ± 0.09 †	6.90 ± 0.09	NS	NS	< 0.05
Acetylcholine							
Emax (%)	79 ± 1	79 ± 4	74 ± 3	64 ± 6 †	NS	< 0.05	NS
pD2	6.11 ± 0.14	6.61 ± 0.30	6.00 ± 0.23	6.28 ± 0.19	NS	NS	NS
S Nitroprusside							
Emax (%)	98 ± 2	101 ± 1	101 ± 3	100 ± 3	NS	NS	NS
pD2	7.53 ± 0.24	7.79 ± 0.10	7.12 ± 0.10	7.63 ± 0.23	NS	NS	NS

All values are means ± SEM. * P < 0.05 80 *vs* 25 wk in the same strain; † P < 0.05 obese *vs* lean at the same age. Emax : vascular reactivity ; pD2 : vascular sensitivity ; LZR : Lean Zucker rat ; OZR : Obese Zucker rat. (at least 3 rings/animal, using in 3-5 animals in each group).

RESUME

Les conséquences cardiovasculaires du vieillissement sont l'une des principales causes de mortalité dans les pays occidentaux. Si l'âge chronologique contribue à l'aggravation des symptômes du vieillissement, plusieurs autres facteurs peuvent influencer l'apparition, plus ou moins précoce, des modifications liées au vieillissement. Ainsi, l'étude des déterminants génétiques et environnementaux accélérateurs du vieillissement cardiovasculaire pourrait améliorer la prévention et les traitements de ces pathologies.
Nous avons démontré chez le rat Zucker (modèle de syndrome métabolique) en fin de vie (80 semaines) que l'obésité et les troubles métaboliques associés et le vieillissement agissent de façon synergique pour modifier la structure et la fonction vasculaire *in vivo* et *in vitro*, en ciblant les propriétés endothéliales. L'augmentation précoce des acides gras libres (AGL) plasmatiques, suivie par la production d'espèces radicalaires de l'oxygène et l'activation de la voie de NFκB (pro-inflammatoire), ainsi que les altérations de réactivité carotidienne induites par les AGL, sont quelques-uns des mécanismes clés du développement de la rigidité artérielle dans ce modèle.
Il a été décrit en 1997 une souris déficiente pour le gène Klotho, avec une faible espérance de vie, un vieillissement accéléré et des pathologies semblables à celles de l'homme âgé : athérosclérose, ostéopénie, calcifications ectopiques et emphysème pulmonaire. Nous avons caractérisé le phénotype artériel (peu connu) des souris Kl+/- à 6 et 12 mois, en comparaison de leurs contrôles Kl+/+ aux mêmes âges. Nous avons démontré dans ce modèle que dans des conditions basales, les souris Kl+/- ne présentent pas de phénotype en faveur d'un vieillissement accéléré de la paroi artérielle à l'âge de 12 mois. Néanmoins, à l'âge de 6 mois, les souris Kl+/- présentent une augmentation de leur pression artérielle consciente et de leur rigidité carotidienne, qui sont en faveur d'une altération de la fonction vasculaire. L'étude de ces deux modèles nous a ainsi permis d'évaluer l'implication de l'obésité et de la protéine Klotho dans le vieillissement artériel.

Mots clés : rigidité artérielle, vieillissement, obésité, réactivité vasculaire, stress oxydant

ABSTRACT

The cardiovascular consequences of aging are a major cause of death in Western countries. If chronological age contributes to the worsening of symptoms of aging, several factors can influence the appearance, more or less early changes associated with aging. Thus, the study of genetic and environmental determinants of cardiovascular aging accelerators could improve prevention and treatment of these pathologies.
We have demonstrated Zucker rats (a model of the metabolic syndrome) at end of life (80 weeks) that obesity and associated metabolic disorders act synergistically with aging to alter the structure and vascular function *in vivo* and *in vitro* by targeting endothelial properties. The early increase in plasma free fatty acids (FFA), followed by production of radical oxygen species and the activation of the NFκB pathway (proinflammatory) and alterations in carotid responsiveness induced by AGL, are some of the key mechanisms of development of arterial stiffness in this model.
In 1997 a mouse was described deficient for the gene Klotho, with low life expectancy, accelerated aging and disease similar to an old man: atherosclerosis, osteopenia, pulmonary emphysema and ectopic calcifications. We characterized the arterial phenotype (unknown) in mice Kl+/- at 6 and 12 months, compared to their controls K +/+ at the same age. We have demonstrated in this model that in basal conditions, Kl +/- mice shows no phenotype for an accelerated aging of the arterial wall at the age of 12 months. However, at the age of 6 months, Kl +/- mice show an increase in blood pressure and conscious of their carotid stiffness, in favor of an alteration of vascular function. The study of these two models has allowed us to assess the implication of obesity and Klotho protein in aging arteries.

Key words : arterial stiffness, aging, obesity, vascular reactivity, oxidative stress