

Université de Montréal

**Régulation de la fonction vasculaire pendant le vieillissement: rôles
de l'environnement post-natal et du gène suppresseur de tumeurs
p53**

par

François Leblond

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
En Pharmacologie

Décembre 2013

© François Leblond, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Régulation de la fonction vasculaire pendant le vieillissement: rôles
de l'environnement post-natal et du gène suppresseur de tumeurs
p53**

Présentée par :
François Leblond

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Denis DeBlois, président-rapporteur
Dr Éric Thorin, directeur de recherche
Dr Jonathan Ledoux, membre du jury
Dr André Marette, examinateur externe
Dr Pierrette Gaudreau, représentante du doyen de la FES

RÉSUMÉ

La dysfonction endothéliale vasculaire constitue un marqueur précoce des maladies cardiovasculaires car l'endothélium est l'une des premières cibles des facteurs de risque cardiovasculaire. La présence d'un stress chronique engendré par les facteurs de risque cardiovasculaire sollicite les mécanismes de défense endogènes, tels que les enzymes antioxydantes, qui servent au maintien de la fonction endothéliale. L'environnement vasculaire auquel l'endothélium est exposé a un effet direct sur son fonctionnement à long terme. Certaines habitudes de vie sont ainsi associées à une bonne santé cardiovasculaire. Par exemple, la diète méditerranéenne et/ou la pratique régulière de l'exercice physique aident à maintenir une fonction endothéliale adéquate et à réduire l'incidence des maladies cardiovasculaires. D'autre part, certains gènes clés, comme le gène suppresseur de tumeurs p53, régulent plusieurs voies métaboliques importantes pour préserver l'intégrité des cellules endothéliales. Nous posons l'hypothèse que l'environnement vasculaire post-natal influence la mise en place de mécanismes de défenses endogènes tels que les enzymes antioxydantes afin de faire face à des stress plus tard dans la vie.

Notre objectif global était d'évaluer les impacts d'interventions post-natales bénéfiques et d'une diminution endogène du gène suppresseur de tumeurs p53, sur la fonction endothéliale vasculaire et sur sa capacité à faire face à un stress métabolique. Dans une première étude, nous avons soumis des souris saines C57Bl/6 dès leur sevrage et jusqu'à l'âge de 9 mois, à un programme d'exercice physique volontaire (course dans une roue) ou à un antioxydant (catéchine), comparé à un groupe de souris sédentaires et sans antioxydant. Puis les interventions ont été stoppées et une diète riche en gras a été introduite, ou non, pour une période de 3 mois; les souris ont été sacrifiées à l'âge de 9 ou 12 mois. Nous avons observé que l'exercice a protégé les cellules endothéliales des effets délétères induits par la diète riche en gras en préservant la fonction endothéliale par le maintien d'un profil *rédox* sain et en évitant la hausse de l'inflammation. La catéchine a maintenu la fonction endothéliale aortique, mais n'a pas prévenu le profil inflammatoire en présence de la diète riche en gras. Finalement, chez les souris sédentaires, la fonction endothéliale a été détériorée en présence de la diète riche en gras, sans indice d'inflammation vasculaire.

Dans une seconde étude, des souris partiellement déficientes en p53 (p53^{+/-}) et contrôles C57Bl/6 ont été exposées à la même diète riche en gras à partir de 3 mois et ce jusqu'à l'âge de 6 mois. Notre raisonnement était basé sur la démonstration que p53 est un régulateur de l'expression des enzymes antioxydantes *in vitro*. Chez les souris p53^{+/-}, les cellules endothéliales ont été protégées du stress induit par l'hypercholestérolémie engendrée par la diète riche en gras. Cependant, chez les souris p53^{+/-} cette protection pourrait être secondaire à un métabolisme accru des acides biliaires, qui en prévenant la hausse de cholestérol, protégerait indirectement l'endothélium.

Nous avons donc pu démontrer l'importance de l'environnement vasculaire sur la fonction endothéliale. La diète riche en gras a stimulé certains mécanismes de défense vasculaires tels que la voie des EDHF et la superoxyde dismutase afin de maintenir la fonction endothéliale malgré les conditions pro-athérosclérotiques. Nous avons observé que l'exercice et la catéchine influencent différemment l'endothélium malgré leurs capacités antioxydantes. Ces études soulignent la sensibilité de l'endothélium aux changements dans l'environnement vasculaire. En accord avec le vieillissement de la population et la progression des maladies cardiovasculaires, la proportion de personnes ayant une dysfonction endothéliale augmente. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes ou d'interventions qui permettent le maintien de la fonction endothéliale à long terme s'avère utile.

MOTS-CLÉS: fonction endothéliale, p53, exercice physique, catéchine, inactivité physique, diète riche en gras, facteurs de risque cardiovasculaire, stress oxydant, acides biliaires, hormesis.

ABSTRACT

Endothelial dysfunction is an early marker of atherosclerosis and cardiovascular diseases. Cardiovascular risk factors generate a chronic stress, challenging endogenous defense mechanisms that are critical to maintain endothelial function, such as antioxidant enzymes. The vascular environment impacts the integrity and long-term function of endothelial cells. Thus, a healthy lifestyle is beneficial for cardiovascular health: regular physical training and/or a Mediterranean diet are associated with the maintenance of endothelial function and a lower incidence of cardiovascular diseases. On the other hand, some key genes such as tumor suppressor gene p53, are known to regulate numerous cellular functions that are necessary to maintain endothelial cells integrity. We hypothesized that the post-natal vascular environment impacts the development of endogenous cellular defense mechanisms such as antioxidant enzymes, in order to protect against vascular stress that will occur later in life.

Our major goal was to evaluate the impact of post-natal interventions and endogenous reduction of p53 expression on vascular endothelial function and its capacity to resist against a metabolic stress. In our first study, healthy C57Bl/6 mice were exposed from weaning to the age of 9 months to physical voluntary training (running wheel) or to the antioxidant catechin, and were compared to physically inactive mice that did not receive catechin. Then, exercise and catechin were stopped and mice were subjected to a regular or a high fat diet for 3 months; mice were sacrificed either at the age of 9 or 12 months. In trained mice, we observed that exercise prevented endothelial dysfunction and inflammation induced by the high fat diet. In catechin-treated mice, aortic endothelial function was maintained despite exposure to the high fat diet, but an inflammatory profile was observed. In physically inactive mice, the high fat diet induced endothelial dysfunction without inflammation.

In our second study, mice partially deficient in p53 (p53^{+/-}) were exposed to the same high fat diet from 3 to 6 months of age. Our rationale was based on the discovery that *in*

vitro, p53 regulates antioxidant enzymes gene expression. In p53^{+/-} mice, endothelial cells were protected from the stress of hypercholesterolemia induced by the high fat diet. However, this endothelial protection could be linked with an unexpected enhanced bile acid metabolism in p53^{+/-} mice: low endogenous expression of p53 prevents the rise in plasma total cholesterol when fed a high fat diet, indirectly protecting the endothelium.

In summary, we were able to demonstrate the importance of the vascular environment on endothelial function. The pro-atherosclerotic environment induced by the high fat diet stimulated vascular defense mechanisms, as observed by the activation of the compensatory EDHF pathway and superoxide dismutase activity, to maintain an adequate endothelial function. We observed that exercise and catechin had a different impact on the endothelium despite their antioxidant properties. These studies demonstrate the sensitivity of the endothelium to changes within the vascular environment. As the population is aging and the incidence of cardiovascular diseases is increasing, endothelial dysfunction will be more frequent. Therefore, a better comprehension of mechanisms or interventions that can protect endothelial function can only be beneficial.

KEYWORDS: endothelial function, p53, exercise, catechin, physical inactivity, high fat diet, cardiovascular risk factors, oxidative stress, bile acids, hormesis.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIV
REMERCIEMENTS	XVIII
1. INTRODUCTION	26
1.1 La fonction endothéliale	28
1.1.1 Les EDRF	28
1.1.1.1 Le monoxyde d'azote	28
1.1.1.1.1 La eNOS	31
1.1.1.1.1.1 Le rôle anti-athérogénique de la eNOS	32
1.1.1.1.1.2 La régulation de la eNOS	32
1.1.1.1.2 La nNOS	34
1.1.1.1.3 La iNOS	35
1.1.1.2 La prostacycline	36
1.1.1.3 Les EDHF	38
1.1.2 Les EDCF	39
1.1.2.1 Les EDCF dérivés de l'acide arachidonique	39
1.1.2.2 L'endothéline-1	41
1.1.2.3 L'angiotensine II	42
1.2 La dysfonction endothéliale, un marqueur précoce des MCV	44
1.2.1 Le stress oxydant	44
1.2.1.1 Origine du stress oxydant vasculaire : les sources des RS	44

1.2.1.1.1 La NADPH oxydase.....	47
1.2.1.1.2 La eNOS découplée	50
1.2.1.2 Les défenses antioxydantes endogènes	50
1.2.1.2.1 La superoxyde dismutase.....	51
1.2.1.2.2 Les enzymes métabolisant les peroxydes.....	51
1.2.1.2.5 Le Nrf2.....	53
1.2.2. Le vieillissement	55
1.2.2.1 Les gènes de longévité.....	56
1.2.2.2 La théorie des radicaux libres.....	57
1.2.2.3 L'« <i>inflammaging</i> »	60
1.2.3 Le vieillissement vasculaire mène vers la dysfonction endothéliale.....	63
1.2.3.1 Diminution de la biodisponibilité du NO.....	64
1.2.3.2 Débalancement des EDRF et EDCF	67
1.2.3.3 Dysfonction des VSMC.....	70
1.2.3.4 L'inflammation	70
1.2.4 La dysfonction endothéliale est accélérée par les facteurs de risque cardiovasculaire	72
1.2.4.1 L'hypertension	73
1.2.4.2 Le diabète.....	76
1.2.4.3 La dyslipidémie.....	79
1.3 Peut-on ralentir le vieillissement vasculaire?	82
1.3.1 L'exercice	82
1.3.1.1 L'exercice diminue le risque de mortalité	83
1.3.1.2 L'exercice réduit la dysfonction endothéliale	84
1.3.1.2.1 L'exercice augmente les forces de cisaillement	85
1.3.1.2.2 L'exercice diminue le stress oxydant.....	85
1.3.1.3 Différents types d'exercice : différents effets vasculaires.....	86
1.3.2 La nutrition et les antioxydants.....	87
1.3.2.1 Les antioxydants et la mortalité	88
1.3.2.2 Les antioxydants et la fonction endothéliale.....	89
1.3.3 La restriction calorique	92
1.3.3.1 Les bienfaits de la restriction calorique sur la longévité et le métabolisme	93
1.3.3.2 La restriction calorique et la fonction endothéliale.....	95
1.3.3.3 Toutes les formes de restriction calorique s'équivalent-elles?	96
1.3.4 La théorie de l'hormesis, ou « <i>ce qui ne nous tue pas nous rend plus forts</i> »	97
1.4 Le p53, beaucoup plus qu'un gène suppresseur de tumeurs	100

1.4.1 Un bref aperçu de la régulation de p53	101
1.4.2 Les rôles qui ont donné la notoriété au p53.....	104
1.4.1.1 L'apoptose	105
1.4.1.2 La régulation du cycle cellulaire.....	109
1.4.1.3 La sénescence.....	111
1.4.1.4 Comment choisir entre l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire?.....	113
1.4.3 Les fonctions méconnues de p53	113
1.4.3.1 Le p53 contrôle l'équilibre <i>rédox</i> cellulaire.....	114
1.4.3.2 Le rôle de p53 dans le vieillissement.....	116
1.4.3.3 P53 et la dysfonction endothéliale	121
1.4.4 p53 joue-il un rôle dans les interventions visant à ralentir le vieillissement vasculaire? ..	123
1.4.4.1 P53 augmente la capacité à l'exercice en stimulant la phosphorylation oxydative ..	123
1.4.4.2 L'effet des antioxydants sur p53 demeure nébuleux	126
1.4.4.3 Le p53 et la restriction calorique utilisent des mécanismes similaires.....	127
2. OBJECTIFS DES ÉTUDES	131
2.1 Mise en contexte.....	131
2.2 Étude 1.....	132
2.2.1 Hypothèse.....	133
2.2.2 Objectifs spécifiques.....	134
2.3 Étude 2.....	134
2.3.1 Hypothèse.....	136
2.3.2 Objectifs spécifiques.....	136
3. ARTICLES.....	137
3.1 Article 1.....	137
3.1.1 Apport original et contributions des coauteurs.....	137
3.1.2 Manuscrit	138
3.2 Article 2.....	180
3.2.1 Apport original et contributions des coauteurs.....	180
3.2.2 Manuscrit	181
4. DISCUSSION	224

4.1 La maturation de l'endothélium est-elle influencée par son environnement?	225
4.1.1 La maturation de l'endothélium est-elle affectée par l'exercice ou la catéchine?	226
4.1.2 L'arrêt de l'exercice ou de la catéchine affecte-t-il la fonction vasculaire à long-terme?	227
4.1.3 La maturation de l'endothélium est-elle affectée par l'expression endogène plus faible de p53?	229
4.2 Une diète riche en gras de 3 mois induit un stress métabolique	230
4.2.1 Les effets vasculaires d'une diète riche en gras chez les souris inactives	231
4.2.2 L'exercice physique ou la catéchine préviennent-ils les effets délétères vasculaires de la diète riche en gras?	232
4.2.3 Pourquoi les antioxydants n'offrent-ils pas les mêmes bénéfices que l'exercice?	233
4.2.4 Les effets vasculaires d'une diète riche en gras chez les souris p53 ^{+/-}	235
4.2.5 Le rôle inattendu de p53 dans le métabolisme du cholestérol et des acides biliaires	238
4.3 Limitations des études	242
4.4 Perspectives	243
4.4.1 La caractérisation de la phase de maturation	244
4.4.2 Les effets de l'exercice physique et de la catéchine sont-ils durables et spécifiques?	245
4.4.3 Une meilleure compréhension du rôle du gène suppresseur de tumeurs p53 au niveau vasculaire	246
4.4.4 Le rôle de l'épigénétique	247
5. CONCLUSIONS	249
6. RÉFÉRENCES	252

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I LISTE DES PRINCIPALES ESPÈCES RÉACTIVES (RS) DANS LA FONCTION VASCULAIRE	45
TABLEAU II EFFETS BÉNÉFIQUES SUR LA RELAXATION DÉPENDANT DE L'ENDOTHÉLIUM DES MICRONUTRIMENTS AUTRES QUE LA VITAMINE C, LE RESVÉRATROL ET LA CATÉCHINE.	91

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 LA PRODUCTION DE NO PAR LES NOS EST UN PROCESSUS IMPLIQUANT PLUSIEURS ACTEURS.	31
FIGURE 2 LES PRINCIPALES ENZYMES ANTIOXYDANTES ET PRO-OXYDANTES ET LEURS ESPÈCES RÉACTIVES ASSOCIÉES.	45
FIGURE 3 LA STRUCTURE DE NOX2.	48
FIGURE 4 L'«INFLAMMAGING».	61
FIGURE 5 LE MÉTABOLISME DU NO EST ALTÉRÉ PAR LE STRESS OXYDANT ASSOCIÉ AU VIEILLISSEMENT.	64
FIGURE 6 LA CONTRIBUTION DES EDRF ET DES EDCF VARIE AVEC L'ÂGE DES SOURIS.	68
FIGURE 7 L'HYPERTENSION ACCÉLÈRE LE VIEILLISSEMENT ARTÉRIEL.	73
FIGURE 8 L'EXERCICE PROVOQUE DES EFFETS SYSTÉMIQUES PRÉVENANT LE DÉVELOPPEMENT DES MCV.	87
FIGURE 9 LA THÉORIE DE L'HORMESIS.	98
FIGURE 10 LE P53 EST RÉGULÉ PAR DIVERS PROCESSUS POST-TRADUCTIONNELS.	102
FIGURE 11 LE P53 CONTRÔLE LA DESTINÉE CELLULAIRE SELON L'ÉTENDUE DES DOMMAGES ET GRÂCE À LA COLLABORATION DE PLUSIEURS PARTENAIRES.	105
FIGURE 12 LE P53 CONTRÔLE L'EXPRESSION GÉNIQUE DE PLUSIEURS MÉDIATEURS DES VOIES INTRINSÈQUES ET EXTRINSÈQUES DE L'APOPTOSE.	106
FIGURE 13 LE P53 AGIT VIA DIFFÉRENTS GÈNES POUR INDUIRE L'APOPTOSE.	108
FIGURE 14 LE P53 PEUT BLOQUER LE CYCLE CELLULAIRE À 2 ENDROITS POUR ÉVITER LA TRANSMISSION D'ERREURS DANS L'ADN.	110
FIGURE 15 LE P53 ACTIVE DES VOIES SIMILAIRES POUR PROMOUVOIR LA SÉNESCENCE ET L'ARRÊT DU CYCLE CELLULAIRE.	112
FIGURE 16 LE P53 RÉGULE UNE MULTITUDE DE GÈNES ANTIOXYDANTS POUR CONTRÔLER LE SORT DE LA CELLULE.	116
FIGURE 17 LES SOURIS DÉFICIENTES EN P53 DÉVELOPPENT RAPIDEMENT DES NÉOPLASMES ET MEURENT PRÉMATURÉMENT.	117
FIGURE 18 L'ACTIVATION DE P53 PEUT FAVORISER LE MAINTIEN DE L'INTÉGRITÉ CELLULAIRE, MAIS PEUT AUSSI MENER VERS LE VIEILLISSEMENT OU LE CANCER.	121

FIGURE 19 LE P53 ACTIVE ET RÉPRIME L'EXPRESSION DE PLUSIEURS GÈNES POUR FAVORISER LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE PLUTÔT QUE LA GLYCOLYSE, CE QUI PERMET UNE PLUS GRANDE PRODUCTION D'ÉNERGIE ET FAVORISE LES PERFORMANCES À L'EXERCICE.	125
FIGURE 20 LA RESTRICTION CALORIQUE (A) ET P53 (B) FAVORISENT DE LA MÊME FAÇON L'EXPRESSION DE PLUSIEURS GÈNES CLÉS DANS LE PROCESSUS DE L'AUTOPHAGIE.	128
FIGURE 21 LE CHANGEMENT DANS LES ACTIVITÉS DES ENZYMES MÉTABOLISANT LE H ₂ O ₂ INDIQUE UNE HAUSSE DE LA QUANTITÉ DE RS VASCULAIRES.	228
FIGURE 22 IMPACT SUR LA FONCTION ENDOTHELIALE DE LA DIETE RICHE EN GRAS SUITE A A) LA PRATIQUE REGULIERE DE L'EXERCICE VOLONTAIRE (EX), DE LA CONSOMMATION DE LA CATECHINE (CAT), DE L'INACTIVITE PHYSIQUE (PI) ET B) DE LA REDUCTION DE L'EXPRESSION ENDOGENE DE P53 PENDANT LE DEVELOPPEMENT ET LA MATURATION DES CELLULES ENDOTHELIALES CHEZ LA SOURIS.	250

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA: acide arachidonique

ACE: enzyme de conversion de l'angiotensinogène, *angiotensinogen converting enzyme*

ADMA: diméthylarginine asymétrique, *asymmetric dimethylarginine*

AGE: glycation avancée des séquences terminales des protéines, *advanced glycation end products*

AMPC: adénosine monophosphate cyclique

AMPK: protéine kinase activée par l'AMP

AngII: angiotensine II

Angptl-2: angiopoiétine-like 2

apo: apolipoprotéine

ARE: élément de réponse antioxydant, *antioxidant response element*

ARF: facteur de ribosylation, *ADP-ribosylation factor*

AT: récepteur de l'AngII

ATM: *ataxia telangiectasia mutated*

BH₄: (6R-)5,6,7,8-tétrahydro-L-bioptérine

CDK: kinases dépendantes de la cycline, *cyclin dependent kinases*

chk2: kinase «*checkpoint*» 2, *checkpoint kinase 2*

chREBP: protéine liant l'élément de réponse aux glucides, *carbohydrate-responsive element-binding protein*,

COX: cyclooxygénase

CRP: protéine C réactive, *C-reactive protein*

Cyp7A1: 7 α -hydroxylase

DR: récepteurs «de mort», *death receptors*

DRAM: modulateur de l'autophagie régulé par les dommages, *damage-regulated autophagy modulator*

EDCF: facteurs constricteurs dérivés de l'endothélium, *endothelium-derived constricting factor*

EDHF: facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium, *endothelium-derived hyperpolarizing factor*

EDRF: facteurs relaxants dérivés de l'endothélium, *endothelium-derived relaxing factor*

eNOS ou NOS3: synthase endothéliale du monoxyde d'azote

ET: endothéline
ET_A: récepteur A de l'endothéline-1
ET_B: récepteur B de l'endothéline-1
FAD: flavine adénine dinucléotide
FMN: flavine mononucléotide
FXR: récepteur nucléaire farnesoid X, *farnesoid X receptor*
GAMT: guanidinoacétate méthyltransférase
GDF11: facteur 11 de croissance et de différenciation, *growth differentiation factor 11*
GLS2: glutaminase mitochondriale 2, *mitochondrial glutaminase 2*
GMPc: guanosine monophosphate cyclique
GPx: glutathione peroxydase
GSH: glutathione réduite
hApoB^{+/+}: souris C57Bl/6 qui surexpriment l'apoB humaine
HDL: lipoprotéine de haute densité, *high-density lipoprotein*
H₂O₂: peroxyde d'hydrogène
HO-1: hème oxygénase-1
IGF-1: facteur de croissance 1 similaire à l'insuline, *insulin-like growth factor 1*
IL: interleukine
iNOS ou NOS2: synthase inductible du monoxyde d'azote
IP: récepteur de la PGI₂
KC: chimiokine dérivée des kératinocytes, *keratinocyte-derived chemokine*
Keap-1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*
KLF2: facteur 2 Krüppel-like, *Krüppel-like factor 2*
LDL: lipoprotéine de faible densité, *low-density lipoprotein*
L-NAME: N ω -nitro-L-arginine méthyl ester, un inhibiteur des NOS
LXR: récepteur nucléaire hépatique X, *liver X receptor*
MCV: maladies cardiovasculaires
MLL3: histone H3-lysine-4 méthyltransférase du lignage mixte de la leucémie, *histone H3-lysine-4 methyltransferase mixed-lineage leukemia 3*
Mdm2: ubiquitine ligase *mouse double minute 2*
mTOR: cible de la rapamycine chez les mammifères, *mammalian target of rapamycin*
NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- κ B: facteur nucléaire- κ B, *nuclear factor- κ B*

nNOS ou NOS1: synthase neuronale du monoxyde d'azote

NO: monoxyde d'azote, *nitric oxide*

NOS: synthase du monoxyde d'azote, *nitric oxide synthase*

Nox: NADPH oxydase

Nrf2: facteur 2 relié au facteur nucléaire érythroïde 2, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

oxLDL: LDL oxydés

PDTC: dithiocarbamate de pyrrolidine, *pyrrolidinedithiocarbamate*, un inhibiteur de NF- κ B

PG: prostaglandines

PGD₂S: PGD₂ synthase

PGE₂S: PGE₂ synthase

PGF₂S: PGF₂ synthase

PGI₂: prostacycline

PGI₂S: prostacycline synthase

PIG: gènes induits par p53, *p53-induced genes*

PI3K: phosphatidylinositide 3-kinase

PKA: protéine kinase A

PKB: protéine kinase B

PKC: protéine kinase C

PKG: protéine kinase G

pRb: protéine du rétinoblastome, *retinoblastoma protein*

Prdx: peroxyrédoxine

PTP: pore de transition de la perméabilité, *permeability transition pore*

PUMA: modulateur de l'apoptose activé par p53, *p53 up-regulated modulator of apoptosis*

RAGE: récepteur des AGE

RS: espèces réactives, *reactive species*

SCO2: synthase du cytochrome c oxydase 2, *synthesis of cytochrome c oxidase 2*

Sesn: sestrines

SHP: partenaire de petits hétérodimères, *small heterodimer partner*

SHR: rat spontanément hypertendu, *spontaneously hypertensive rat*

siRNA: petit ARN d'interférence, *small interfering RNA*

Sirt-1: sirtuine-1

SNP: nitroprussiate de sodium

SOD : superoxyde dismutase

SOD1 ou CuZnSOD: superoxyde dismutase cytosolique

SOD2 ou MnSOD: superoxyde dismutase mitochondriale

SOD3 ou ecSOD: superoxyde dismutase extracellulaire

sRAGE: forme soluble du RAGE

SREBP: liaison avec la protéine de liaison à l'élément de réponse aux stéroïdes, *sterol-response element binding protein*

TBHP: *tert*-butyl hydroperoxyde

TFAM: facteur de transcription mitochondrial A, *mitochondrial transcription factor A*

TIGAR: gène régulateur de la glycolyse et de l'apoptose induit par p53, *Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator*

TNF- α : facteur- α de nécrose tumorale, *tumor necrosis factor- α*

TP: récepteur du thromboxane

TRAIL: ligand induisant l'apoptose reliée au TNF, *TNF related apoptosis inducing ligand*

Trx: thiorédoxine

TSC2: *tuberculosis sclerosis 2*

TXA₂: thromboxane A₂

TXS: thromboxane synthase

VSMC: cellules musculaires lisses vasculaires, *vascular smooth muscle cells*

WT: souris contrôles dites «sauvages», *wild type*

XO: xanthine oxydase

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

Tout d'abord, un immense merci aux membres du jury qui, malgré leur horaire chargé, ont pris le temps de lire ma thèse et d'émettre des commentaires afin d'améliorer mes travaux.

À Éric Thorin, mon directeur de recherche

Vous serez, à mes yeux, toujours plus un mentor qu'un « simple » directeur de doctorat. Mon retour dans votre laboratoire, à la suite de mon stage en 2004, fut l'une de mes meilleures décisions. Ce bref séjour m'avait permis de saisir que ce laboratoire était l'extension de votre famille. L'esprit d'équipe et d'entraide animant votre laboratoire, comme une famille bien tissée, découle de votre personnalité et de celle de Nathalie. Votre passion pour la recherche est contagieuse. Votre calme au quotidien, malgré l'incertitude et la quantité de travail requise pour assurer la survie d'un laboratoire de recherche, m'a toujours plu. Votre support et votre confiance m'ont amené à me dépasser. Vous avez toujours su me guider, sans m'imposer votre vision. Je dois avouer que je suis envieux de votre compréhension globale de la physiologie et de la pharmacologie. Ce fut un véritable plaisir de vous côtoyer pendant les dernières années, je vous serai toujours reconnaissant pour votre accueil et votre support. Si je deviens patron un jour, j'espère être comme vous!

À Nathalie Thorin-Trescases,

Merci d'être toujours prête à donner un coup de main avec le sourire! Ton aide m'a été d'une grande valeur. Chaque conseil, réponse à mes questions et commentaires étaient pour me faire avancer. Ton immense gentillesse et ta délicatesse font de toi une personne formidable, avec qui j'ai eu le privilège de travailler pendant ces années. J'ai appris énormément de toi, notamment de tes qualités de rédaction. J'espère un jour atteindre cette précision dans l'écriture qui me rend très jaloux!!

Aux « anciens » étudiants du laboratoire présents lors de mon stage,

Bien que nous ne nous soyons pas côtoyé longtemps, je garde un bon souvenir de chacun de vous! Il n'est pas impossible que nos chemins professionnels se rencontrent de nouveau!

Aux étudiants qui ont été à mes côtés pendant mon doctorat (par ordre alphabétique!),***À Albert,***

Avec toi, le plaisir était toujours au rendez-vous! Toujours prêt à argumenter avec Annick et Virginie pour stimuler des discussions et des réflexions souvent bien peu scientifiques! J'admire ta grande curiosité, qualité indiscutable de tout bon scientifique! Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi!

À Anie,

Nous n'avons pas travaillé ensemble longtemps, mais je n'oublierai jamais ta générosité! C'est pratique d'avoir une médecin comme collègue de travail lorsqu'on a de jeunes enfants...! Tu fais preuve de beaucoup de courage et de détermination en débutant une maîtrise, mais je suis persuadé que tu réussiras!

À Annick,

Avec toi, c'était sûr que j'allais rire aussi! En plus, tu étais toujours prête à répondre à mes questions! Les heures du midi n'ont plus jamais été les mêmes après ton départ! Une de mes grandes déceptions demeure de ne pas avoir eu la chance de partir en congrès avec toi, parce que c'est sûr qu'on aurait beaucoup ri...et qu'on serait allés voir plein de parties de basketball et autres sports! Ta personnalité enjouée et ta simplicité font de toi une personne avec qui on souhaite travailler longtemps!! J'espère que nos chemins professionnels se recroiseront!

To Carol,

Your arrival brought a new humorous and relaxed vibe in the lab! Nothing can seem to stress you out (and I mean it in a nice way)! You showed great patience in the beginning with the development of the Anptl-2 KO mice, but it seemed now to have paid off! It was always fun to be around you.

À Cécile,

Ton rire contagieux fait que j'aurais aimé avoir à travailler davantage avec toi! Je suis convaincu que tu auras une carrière scientifique fructueuse!

À Nada,

J'ai vraiment adoré travailler avec toi. Pas simplement parce que tu étais toujours capable de répondre à mes questions méthodologiques, mais parce que tu es réfléchie et extrêmement talentueuse. Ta grande persévérance t'a permis de compléter ton doctorat la tête bien haute malgré les embûches. C'était très inspirant d'être ton voisin! Comme ma progression au doctorat suivait la tienne, c'était vraiment bien de t'avoir pour discuter. J'ai eu un grand plaisir à te connaître et te côtoyer. Ton sourire constant me manque!!

À Nour,

Ta maîtrise s'est passée bien trop vite! Ce fut vraiment chouette d'avoir quelqu'un avec qui parler de football pour un moment! J'ai toujours senti que tu es une personne digne de confiance. Bien que ton séjour fût parsemé d'obstacles, tes aptitudes t'ont permis d'avancer et je suis convaincu que tu pourras te rendre loin!

À Virginie,

J'aurais aimé passer plus de temps avec toi car ta personnalité calme et posée, mais toujours prête à rire, fait de toi quelqu'un de vraiment super à côtoyer dans un laboratoire. Travailler avec toi est un vrai plaisir étant donné ton intelligence, ta rigueur et ton efficacité. Grâce à ta détermination et ton dévouement, je suis sûr que tu te rendras aussi loin que tu le souhaites. Si chaque laboratoire de la planète avait sa «Virginie», la médecine aurait progressé beaucoup plus rapidement! Je n'ai pas à te souhaiter bonne chance pour la suite, je suis convaincu que tu réussiras absolument tout ce que tu entreprendras.

To Xiaoyan,

Nobody can be sweetest than you! Always ready to help, and always with your great smile! You are always looking out for others and you want to take care of your peers. I am sure that whatever professional path you choose, you will succeed!

Aux membres du laboratoire de Gaétan Mayer,

Merci à Steve et Gaétan pour vos conseils et votre aide. Steve, je te dois une fière chandelle pour la réalisation des expériences et pour les corrections de mon second article. Ton aide aura beaucoup accéléré le processus! Merci également à Annie pour les manips qui n'auront finalement pas servi pour l'article! C'est vraiment super d'avoir d'aussi bons voisins!

Au Dr Jean Lambert,

Pas toujours facile de bien comprendre les statistiques! Merci à vous pour les nombreuses analyses statistiques que vous avez faites pour mon premier article! Et pour votre aide avec le logiciel SAS pour mon deuxième article! Merci infiniment!

Aux employés de l'Institut,

Merci à Louis Villeneuve et à Maya Mamarbachi qui m'ont toujours accueilli et soutenu avec le sourire. Vos conseils très utiles ont contribué à améliorer mes projets. Je vous remercie pour votre patience et votre plaisir à partager vos connaissances. Aux employés de l'animalerie, je n'aurais simplement pas pu faire ce doctorat sans vous. Merci d'avoir pris soin de « mes » souris et de m'avoir aidé dans la gestion de mes nombreux groupes et traitements!

Aux organismes subventionnaires,

Le soutien financier des Instituts de Recherche en Santé du Canada (ou IRSC) fut primordial pour la réalisation de mon doctorat. Une subvention de recherche au laboratoire m'a permis de débiter mon doctorat, puis l'année suivante j'ai obtenu une bourse qui m'a soutenu pour la majorité de mes études. Ce support fut intimement lié à la réussite de mes projets. Je remercie l'Institut de cardiologie de Montréal ainsi que le Département de pharmacologie qui m'ont également remis des bourses pendant mon parcours.

À mes nombreux amis,

Je ne peux vous remercier tous, mais sachez que votre support et vos encouragements m'ont toujours aidé à persévérer. Votre présence a toujours été et demeure très importante pour moi, et je suis devenu la personne que je suis aujourd'hui en partie

grâce à vous. Je prendrai quelques lignes pour exprimer ma reconnaissance à certains d'entre vous.

À Dave,

Si quelqu'un était entré au 1004 il y a 13 ans et nous avait dit que nous serions rendus ici, après deux baccalauréats, une maîtrise, un doctorat et un certificat (...), je doute que nous l'aurions cru! Ta ténacité, ton caractère et ta passion font de toi un être époustouflant. Ton intérêt envers ma curiosité scientifique et mes recherches me fait toujours plaisir, et j'aime discuter science avec toi! Sache que la fréquence de nos rencontres n'est absolument pas proportionnelle au plaisir que j'ai avec toi!

À Geneviève et Louis-Philippe,

Ma maîtrise à l'hôpital Sainte-Justine ne m'aura pas seulement donné les outils nécessaires pour passer au doctorat, mais m'a donné deux vrais amis. Le monde de la recherche possède un jargon bien à lui auquel peu sont initiés...avec vous je pouvais me laisser aller et parler de sciences en sachant que vous alliez me comprendre! Je suis tellement heureux que vous soyez toujours dans ma vie! Vous êtes des personnes sur qui je pourrai toujours compter, et qui m'êtes très précieuses!

À Sylvain,

À une certaine époque, tu surgissais toujours au bon moment pour nous aider à traverser des périodes plus troubles. Ta personnalité représente pour moi un idéal. Je ne connais personne d'aussi vrai et d'aussi fidèle à ses convictions. Et le plus merveilleux, c'est que tu n'imposes rien! Tu es toujours prêt à discuter ouvertement de tout et de rien... si seulement il y avait plus de gens comme toi...!

À Vincent,

Il est bien loin maintenant ce 24 février 2008, mais je ne t'oublie pas. Ta personnalité et ta façon d'être demeurent des idéaux. Dans les moments difficiles, j'ai une pensée pour toi et je continue d'avancer. Tu me manques. *Carpe diem!*

À mes parents et à mon frère Simon,

Ma « carrière » d'étudiant n'aurait pu être possible sans le support inconditionnel de mes parents et de mon grand frère. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir laissé choisir mon chemin. Vous êtes, et continuerez d'être des modèles pour moi. J'espère, cher papa, que tu seras plus serein maintenant que tout est fini! Simon, même si on ne se voisine pas aussi souvent que je le souhaiterais, je suis vraiment content que tu demeures à quelques pas... j'espère qu'Olivier s'occupera aussi bien de Gabriel que tu t'es occupé de moi. Et Cathy, tu fais partie de la famille également, merci d'être aussi généreuse et avenante envers nous. Si tout le monde avait un sourire comme le tien, je pense que la Terre se porterait mieux!

Enfinement à mes 3 amours,***À Valérie,***

Pour toi aussi, si quelqu'un était entré au 1004 il y a 14 ans et m'avait dit que nous en serions là et que je pourrais être aussi heureux aujourd'hui, j'aurais eu peine à le croire... Tu es ma meilleure amie depuis que je t'ai rencontrée et tu es en plus l'amour de ma vie... que demander de plus! Merci infiniment pour ton support et ta présence pendant toutes ces années. Le travail en laboratoire n'étant pas une routine de 9 à 5, tu as fait plusieurs sacrifices et je t'en remercie! Bien que tu n'aies pas concrètement contribué à la rédaction et aux expériences, il y a une partie de toi dans cette thèse. Merci de me faire rire et de m'endurer quand je suis bougon. Je suis devenu l'homme que je suis grâce à toi. Et ensemble, nous avons créé deux êtres fantastiques.

À Olivier et Gabriel,

Mes deux petits crapauds qui enchantent mes journées...et qui ont enchanté maintes nuits! Votre arrivée aura amélioré ma vie à tous les niveaux! Votre présence permet de garder les pieds sur terre et de mettre les choses en perspective. J'ai choisi de mettre de côté le travail à différentes occasions pour passer plus de temps avec vous et je ne le regretterai jamais. Merci de me faire rire chaque jour et de m'imbiber de bonheur à chaque seconde. Vous êtes magnifiques et je suis fier de vous. Je vous aime.

L'accomplissement de ce doctorat est un moment charnière dans ma vie. Je tenais du fond du cœur à vous remercier toutes et tous de m'avoir accompagné pendant ce périple.

Sur ce, j'espère que la lecture de cette thèse vous procurera autant de plaisir que celui ressenti à accomplir ce travail au cours des cinq dernières années! Bonne lecture!

François, Décembre 2013

*À Valérie,
Pour Olivier et Gabriel.*

«Nothing is work, unless you'd rather be doing something else.»

George Stanley Halas (1895-1983)

Fondateur des «Bears» de Chicago et de la «National Football League»

1. INTRODUCTION

En 2008, les maladies cardiovasculaires (MCV) étaient la cause de près de 15 000 décès au Québec et de près de 69 500 au Canada (Statistique Canada 2011). Heureusement, le nombre de décès relié aux MVC a diminué depuis plusieurs années au Canada, étant passé de 76 046 cas en 2000 à 69 648 cas en 2008 (Statistique Canada 2011). Le fardeau économique associé aux MCV demeure toutefois spectaculaire. En 2005, les coûts totaux reliés aux MCV frôlaient les 21 milliards de dollars au Canada, et les prévisions suggèrent une facture de 28,3 milliards en 2020 (Thériault et al. 2010). Ainsi, malgré une diminution du nombre de décès, les coûts associés aux MCV au Canada s'accroissent. À l'inverse des pays industrialisés, les pays émergents voient plutôt l'incidence des MCV grimper en flèche (Reddy et al. 1998; Indrayan 2005). En Inde par exemple, le nombre de cas de MCV qui était inférieur à 29 millions en 2000 devrait dépasser les 66 millions de cas en 2015 (Indrayan 2005). En 1990, les pays en développement contribuaient pour près de 70% à tous les décès cardiovasculaires mondiaux (Reddy et al. 1998). Selon les données fournies en 2008 par l'Organisation Mondiale de la Santé, les pays en développement seraient maintenant responsables de 80% des 17,3 millions de décès attribuables aux MCV, et ce chiffre devrait atteindre 23,3 millions en 2030. La progression rapide de l'obésité, associée aux MCV et au cancer, laisse même présager que l'augmentation constante de l'espérance de vie observée ces deux derniers siècles tire à sa fin (Olshansky et al. 2005). Certains suggèrent que nos enfants pourraient vivre moins longtemps que nous, et en moins bonne santé (Olshansky et al. 2005). Ce dernier énoncé est pour le moins alarmant, mais souligne l'importance de la recherche en santé pour trouver de nouvelles approches afin de prévenir la progression des MCV.

Le développement des MCV est accéléré par plusieurs facteurs de risque. Par exemple, les personnes souffrant de diabète ont le même risque d'avoir un infarctus que les patients non-diabétiques ayant déjà subi un infarctus (Haffner et al. 1998). Ainsi, les patients diabétiques ont environ 20% plus de chance d'avoir un infarctus dans les 7 années suivant le diagnostic de diabète (Haffner et al. 1998). Le vieillissement constitue également un facteur de risque indépendant de développer des MCV (Lakatta et al.

2003). Il est probable que ce risque accru provienne de la plus longue période durant laquelle une personne est exposée aux facteurs de risque cardiovasculaire qui s'accumulent avec l'âge (Lakatta et al. 2003).

Le système vasculaire subit directement les effets des facteurs de risque cardiovasculaire. Les cellules endothéliales sont les premières à subir les changements induits par les facteurs de risque cardiovasculaire puisqu'elles sont en contact direct avec la circulation sanguine. Le débalancement de l'homéostasie vasculaire a des répercussions capitales qui peuvent mener à la dysfonction endothéliale. Lors du développement cellulaire, des mécanismes endogènes sont mis en place pour protéger à long terme l'arbre vasculaire des stress environnants. Par exemple, des enzymes antioxydantes efficaces sont requises pour prévenir les dommages oxydants qui apparaissent en présence de facteurs de risque cardiovasculaire (Brandes et al. 2005). L'activation de gènes clés qui peuvent initier certains mécanismes de protection apparaissent également primordiaux pour la protection de l'organisme et du système vasculaire. L'activation du gène suppresseur de tumeurs p53 qui permet de maintenir l'intégrité cellulaire en régulant, entre autres, le cycle cellulaire apparaît comme l'un des principaux gènes protecteurs (Lane 1992; Levine 1997; Chumakov 2007). Une meilleure compréhension des mécanismes visant à protéger les fonctions vasculaires pourrait permettre d'identifier de nouveaux moyens pour augmenter cette résistance, d'identifier des comportements susceptibles de stimuler les défenses endogènes et de mieux faire face à une détérioration du système vasculaire lors de la progression des MCV. Dans ce contexte, mes travaux ont visé à mieux comprendre les impacts vasculaires et endothéliaux lors d'un changement d'un environnement favorable (pendant le développement des cellules) vers des conditions pro-athérosclérotiques plus tard dans la vie.

Pour mieux saisir la portée de mes recherches, il est important de définir plusieurs concepts-clés. Pour ce faire, la fonction endothéliale (section 1.1), les mécanismes menant à la dysfonction endothéliale (section 1.2) et certaines interventions pouvant ralentir le vieillissement vasculaire (section 1.3) seront discutés. De plus, une attention particulière sera portée au gène p53 étant donné la découverte de ses nouvelles fonctions métaboliques qui pourraient influencer l'homéostasie vasculaire (section 1.4).

1.1 La fonction endothéliale

L'endothélium représente la monocouche cellulaire qui tapisse les vaisseaux sanguins. Celui-ci n'agit pas seulement comme une simple barrière de protection. Lorsqu'il est sain, il favorise les processus de relaxation et l'angiogenèse, il réduit l'inflammation, il prévient l'hémostase, la fibrinolyse, l'adhésion et l'agrégation des plaquettes, et évite une hausse de la perméabilité vasculaire et du «*trafficking*» des leucocytes (Feletou 2011a).

L'endothélium est sensible aux stress environnants et il est la première cible des dommages associés aux facteurs de risque cardiovasculaire (Libby et al. 2011). Le diabète, l'hypercholestérolémie et l'hypertension sont associés à une hausse du stress oxydant qui est impliquée dans la dysfonction endothéliale (Hamilton et al. 2004). Ainsi, le bon fonctionnement de l'endothélium dépend d'un environnement *rédox* sain (Lakatta et al. 2003). La dysfonction endothéliale constitue un événement précoce majeur dans le développement des MCV (Ross 1999). La mesure directe de la capacité des artères à se dilater est une méthode efficace pour sa détection, bien qu'elle ne soit pas pratiquée de façon courante chez l'homme. On présuppose l'existence de la dysfonction endothéliale suite à la mesure de biomarqueurs tels que la protéine C réactive (CRP, *C-reactive protein*), la dyslipidémie ou l'hyperglycémie (Schachinger et al. 2000; Heitzer et al. 2001b). Le bon fonctionnement de l'endothélium et le maintien de ses propriétés relaxantes dépendent de la balance entre les facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF, *endothelium-derived relaxing factor*), et les facteurs constricteurs dérivés de l'endothélium (EDCF, *endothelium-derived constricting factor*).

1.1.1 Les EDRF

1.1.1.1 Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO, *nitric oxide*) constitue l'un des médiateurs clés dans le contrôle de l'homéostasie vasculaire. Outre ses rôles antiagrégants (Khan et al. 1996), antioxydants (Hogg et al. 1993) et antiprolifératifs des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC, *vascular smooth muscle cells*) (Bauer et al. 2001; Ignarro et al.

2001), il permet la relaxation des artères (Furchgott et al. 1980). Le NO a été le premier des EDRF à être identifié (Furchgott et al. 1980; Palmer et al. 1988), et cette découverte a valu aux Drs Furchgott, Ignarro et Murad d'obtenir le prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 1998.

Le NO est produit par la synthase du NO (NOS, *nitric oxide synthase*), dont il existe 3 isoformes: la NOS neuronale (nNOS ou NOS1), la NOS inductible (iNOS ou NOS2) et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS3). La numérotation de celles-ci est basée sur l'ordre chronologique de leur découverte, et non selon leur importance physiologique. L'absence des 3 isoformes chez la souris *n/i/eNOS^{-/-}* provoque des changements majeurs, soulignant l'importance capitale du NO dans l'homéostasie de l'organisme (Morishita et al. 2005; Nakata et al. 2008; Yatera et al. 2010). En effet, les souris *n/i/eNOS^{-/-}* ont une réduction de la fonction rénale (Morishita et al. 2005) et de l'espérance de vie due à la présence accrue d'infarctus du myocarde (Nakata et al. 2008; Yatera et al. 2010), ainsi qu'un développement accéléré de l'athérosclérose et du syndrome métabolique (Nakata et al. 2008; Yatera et al. 2010).

Chaque isoforme de la NOS utilise la L-arginine pour produire du NO (Figure 1) (Stuehr et al. 1991). La réaction nécessite aussi la présence d'oxygène et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Stuehr et al. 1991). Pour que la NOS puisse produire le NO, l'enzyme a également besoin de cofacteurs tels que la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN) et la (6R-)5,6,7,8-tétrahydro-L-bioptérine (BH₄) (Marletta 1993; Forstermann et al. 2012). De plus, la NOS doit former un homodimère (Marletta 1993; Forstermann et al. 2012). Une fois tous ces éléments en place, les électrons sont transférés successivement par la NOS à partir du NADPH vers la FAD, le FMN et le noyau hème de la NOS (Crane et al. 1997; Crane et al. 1998). Une fois les électrons dans le noyau hème, ils réduisent l'oxygène. Ce dernier oxyde la L-arginine en deux étapes pour produire le NO et la citrulline (Crane et al. 1997; Crane et al. 1998). La liaison entre la NOS et la calmoduline facilite le transfert des électrons à partir du NADPH vers l'hème, résultant en une production accrue de NO (Forstermann et al. 1991). Cette liaison est facilitée par la hausse de calcium intracellulaire pour les isoformes nNOS et eNOS, tandis que la iNOS ne requiert pas de changement dans la concentration de calcium intracellulaire (Forstermann et al. 1991; Cho et al. 1992), ce qui

constitue l'une des différences majeures entre les isoformes. La voie principale de signalisation du NO est l'activation de la guanylate cyclase soluble, qui augmente la concentration de guanosine monophosphate cyclique (GMPc), qui active alors la protéine kinase G (PKG) (Rapoport et al. 1983; Forstermann et al. 1986; Knowles et al. 1989). La PKG phosphoryle et active la protéine associée au récepteur de l'inositol 1,4,5-triphosphate, ce qui inhibe la relâche des réserves de calcium intracellulaire (Feletou 2011a), empêchant l'activation de la myosine kinase et la contraction des VSMC (Guyton et al. 2006). De plus, la PKG phosphoryle la phosphatase de la chaîne légère de la myosine, ce qui provoque la relaxation des VSMC par la déphosphorylation de la myosine (Feletou 2011a). La PKG activée par le NO permet donc la relaxation des artères en diminuant la concentration de calcium intracellulaire et l'état de phosphorylation de la myosine (Feletou 2011a).

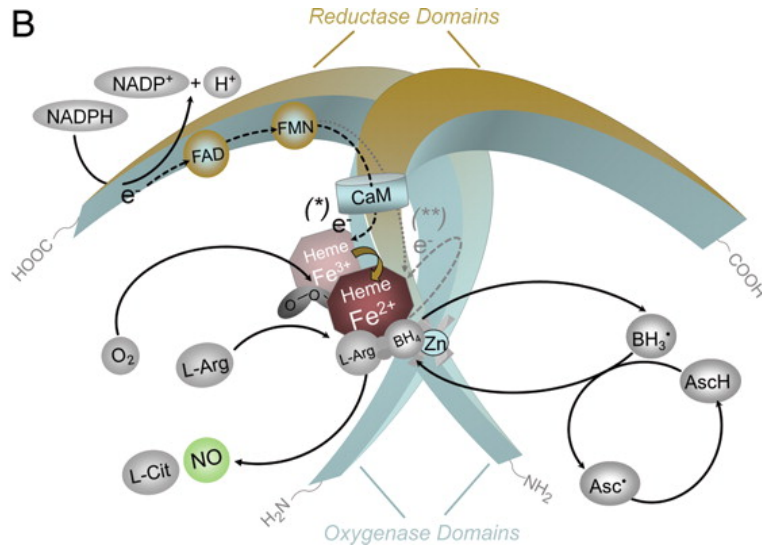


Figure 1 La production de NO par les NOS est un processus impliquant plusieurs acteurs.

La calmoduline (CaM) lie la NOS (une hausse de calcium intracellulaire est requise pour permettre cette liaison pour les isoformes de la eNOS et de la nNOS) pour faciliter le transfert des électrons de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) vers la flavine adénine dinucléotide (FAD), puis vers la flavine mononucléotide (FMN) pour se terminer dans le noyau hème de la NOS. Ainsi, l'oxygène est réduit (O_2) et l'oxydation subséquente de la L-arginine (L-Arg) et du (6R-)5,6,7,8-tétrahydro-L-bioptérine (BH_4) permet de produire du NO et de la L-citrulline (L-Cit). Le BH_4 oxydé (BH_3) pourra être recyclé et réduit en BH_4 par la vitamine C (Asc) par exemple.

Réimprimé avec la permission de Oxford University Press : European Heart Journal, U Förstermann, WC Sessa. Nitric oxide synthases : regulation and function, 33 (7) pp 829-837, Copyright (2012).

1.1.1.1.1 La eNOS

La eNOS constitue l'isoforme participant le plus au contrôle de l'homéostasie vasculaire. La première étude réalisée sur une souris déficiente en eNOS (eNOS^{-/-}) a montré que la perte de la eNOS provoquait l'hypertension et une absence de réponse à l'acétylcholine de l'aorte isolée (Huang et al. 1995). L'absence de réponse à l'acétylcholine a été confirmée dans divers lits vasculaires de la souris eNOS^{-/-} par la suite, tels l'aorte

(Chataigneau et al. 1999; Brandes et al. 2000), les carotides (Faraci et al. 1998; Chataigneau et al. 1999; Brandes et al. 2000), les coronaires (Chataigneau et al. 1999), les artères fémorales (Brandes et al. 2000) et les artères mésentériques (Chataigneau et al. 1999). À l'inverse, la surexpression de la eNOS provoque l'hypotension chez les souris, une hausse de production de NO et de GMPc (Ohashi et al. 1998). Étonnamment, les réponses à l'acétylcholine et au nitroprussiate de sodium (SNP), un donneur de NO, étaient moindres dans des artères isolées des souris surexprimant eNOS (Ohashi et al. 1998). Cet effet serait dû à une diminution de la sensibilité au NO lorsque sa présence est trop grande.

1.1.1.1.1 Le rôle anti-athérogénique de la eNOS

La eNOS serait importante dans la prévention de l'athérosclérose puisque le croisement de souris déficientes en apolipoprotéine (apo) E avec des souris surexprimant la eNOS ou déficientes en eNOS est, respectivement, protecteur (van Haperen et al. 2002) ou délétère (Knowles et al. 2000; Kuhlencordt et al. 2001). La production de NO par la eNOS inhibe l'agrégation plaquettaire (Alheid et al. 1987) et l'adhésion des leucocytes (Kubes et al. 1991; Arndt et al. 1993) et contrôle la prolifération des VSMC (Garg et al. 1989; Nakaki et al. 1990) et l'angiogenèse (Murohara et al. 1998). Le NO produit par la eNOS joue un rôle majeur dans les processus de relaxation dépendants de l'endothélium (Huang et al. 1995). La eNOS produit non seulement du NO, mais aussi du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui participe directement à la relaxation des artères mésentériques (Matoba et al. 2000) et cérébrales (Drouin et al. 2007; Drouin et al. 2009) chez la souris, dans les artères coronaires chez l'humain (Miura et al. 2003) et dans les carotides chez le cochon d'Inde (Gluais et al. 2005a). La eNOS joue donc un rôle majeur dans l'homéostasie vasculaire et elle est régulée de plusieurs façons.

1.1.1.1.2 La régulation de la eNOS

La hausse de la concentration de calcium intracellulaire active la eNOS (Forstermann et al. 1991), alors que la cavéoline-1 l'inhibe en permettant la séquestration de la eNOS dans les caveolae (Bucci et al. 2000; Sowa et al. 2001). Les caveolae sont des structures

riches en lipides situées dans la membrane plasmique. L'interaction entre la cavéoline-1 et la eNOS affecte la réponse à l'acétylcholine (Bucci et al. 2000; Drab et al. 2001). En effet, les aortes des souris cavéoline-1^{-/-} dilatent mieux en présence d'acétylcholine, et une hausse dans la production du NO et du GMPc est observée dans les VSMC en culture de souris cavéoline-1^{-/-} (Drab et al. 2001). À l'inverse, l'ajout d'un peptide (qui contient 23 acides aminés similaires à la cavéoline-1) mimant la liaison entre la cavéoline-1 et la eNOS diminue la réponse à l'acétylcholine dans les aortes de souris (Bucci et al. 2000). La protéine chaperonne Hsp90 est l'une des protéines qui active la eNOS (Garcia-Cardena et al. 1998): la présence de Hsp90 facilite la liaison du calcium à la calmoduline, ce qui promeut l'éloignement du complexe de la cavéoline-1 et permet l'activation de la eNOS (Gratton et al. 2000) et la dilatation (Vequaud et al. 2001).

L'état de phosphorylation de la eNOS influe aussi sur son activation. Les forces de cisaillement appliquées sur l'endothélium vasculaire, forces engendrées par le flux sanguin, sont l'un des stimuli qui module l'état de phosphorylation de la eNOS (Kuchan et al. 1994; Ayajiki et al. 1996; Fleming et al. 1998). Les forces de cisaillement activeraient la phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K) qui phosphorylerait en aval l'Akt/protéine kinase B (PKB), qui pourrait alors activer et phosphoryler la eNOS au niveau de la Ser1177 (la Ser1177 chez l'humain correspond à la Ser1179 chez les bovins et à la Ser1176 chez la souris; c'est le principal site de phosphorylation stimulant la eNOS) (Dimmeler et al. 1999; Fisslthaler et al. 2000). L'ajout de phosphate sur cet acide aminé permet de sensibiliser l'enzyme au calcium et facilite l'activation de la eNOS (McCabe et al. 2000). La protéine kinase A (PKA) pourrait aussi participer à la phosphorylation de la eNOS par les forces de cisaillement (Boo et al. 2002). L'inhibiteur de la PKA H89 a en effet bloqué la phosphorylation de la Ser1176 induite par un flux laminaire sur des cellules endothéliales aortiques bovines en culture (Boo et al. 2002). Le facteur de croissance endothélial vasculaire (ou VEGF) (Papapetropoulos et al. 1997; Dimmeler et al. 1999), l'estrogène (McNeill et al. 1999), la bradykinine (Fleming et al. 2001) et l'insuline (Zeng et al. 1996) sont d'autres peptides provoquant la phosphorylation de la eNOS. Les kinases Akt/PKB (Fulton et al. 1999; Michell et al. 1999), PI3K (Zeng et al. 1996; Papapetropoulos et al. 1997), la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) (Chen et al. 1999), PKA (Boo et al. 2002) et la kinase II dépendante de la calmoduline (ou CaMKII) (Fleming et al. 2001) peuvent aussi activer la eNOS,

principalement par la phosphorylation de la Ser1177. Toutefois, l'Akt1 est pour l'instant la seule kinase dont l'interaction a été démontrée *in vivo* avec la eNOS (Schleicher et al. 2009). Le résidu Thr495 (la Thr495 chez l'humain et la souris correspond à la Thr497 chez les bovins) de la eNOS est constitutivement phosphorylé par la protéine kinase C (PKC) et inhibe la production de NO (Fleming et al. 2001; Michell et al. 2001). La protéine phosphatase 1 facilite la production de NO en déphosphorylant la Thr495 (Fleming et al. 2001; Michell et al. 2001). L'état de phosphorylation sur les résidus Ser1177 et Thr495 est donc primordial pour la régulation de la production de NO par la eNOS (Fleming et al. 2001). La phosphorylation des Ser114, Ser633, Tyr81 et Tyr657 pourrait aussi participer à la régulation de la eNOS mais de façon moins importante que les Ser1177 et Thr495 (Fleming et al. 2003; Forstermann et al. 2012).

L'expression génique de la eNOS peut aussi être modulée. Par exemple, le facteur 2 Krüppel-like (KLF2, *Krüppel-like factor 2*), qui est directement régulé par les forces de cisaillement (Dekker et al. 2002; Parmar et al. 2006), peut activer la transcription de la eNOS (SenBanerjee et al. 2004) et augmenter la production de NO.

1.1.1.1.2 La nNOS

La nNOS a été isolée pour la première fois en 1990 à partir d'un homogénat de cervelets de rats (Bredt et al. 1990). Elle est exprimée constitutivement dans les neurones, mais également dans le cœur, les VSMC et dans le muscle squelettique où elle y est très présente (Nakane et al. 1993; Zhou et al. 2009). Le NO produit par la nNOS serait important dans la neurogénèse (Packer et al. 2003), la cognition (Weitzdoerfer et al. 2004; Yildiz Akar et al. 2007) et la mémoire (Bohme et al. 1993; Holscher et al. 1993). Il aurait aussi un effet systémique en maintenant la pression artérielle (Togashi et al. 1992; Toda et al. 2009). La formation de peroxy-nitrites à partir du NO originant de la nNOS participe au développement de la maladie de Parkinson (Gatto et al. 2000; Simic et al. 2000) et de la maladie d'Alzheimer (Smith et al. 1997; Aliev et al. 2009). Bien que la eNOS soit la principale source de NO permettant la relaxation (Huang et al. 1995), la nNOS peut aussi participer aux processus de relaxation dépendante de l'endothélium. La nNOS permet de maintenir la relaxation lorsque l'endothélium est dénudé dans les

aortes de rats (Schwarz et al. 1999), ou permet la relaxation dans les aortes de souris eNOS^{-/-} (Benkhoff et al. 2012). La nNOS pourrait aussi produire du H₂O₂ qui participerait à la relaxation en agissant comme EDRF dans les aortes de souris C57Bl/6 (Capettini et al. 2008). La nNOS pourrait donc compenser la perte de la eNOS afin de maintenir la relaxation dépendante de l'endothélium.

1.1.1.1.3 La iNOS

La iNOS, contrairement à la nNOS et la eNOS, n'est pas exprimée constitutivement mais est inductible. La iNOS est induite par les cytokines et participe à la réponse immunitaire lors de la présence de pathogènes (Xie et al. 1993; Wei et al. 1995; MacMicking et al. 1997a; MacMicking et al. 1997b). Le NO produit par la iNOS permet de provoquer la mort des parasites, et même celle de cellules tumorales (Green et al. 1990; Li et al. 1991). Puisque l'expression de la iNOS est associée à l'inflammation, son activation chronique n'est pas souhaitée. Le facteur nucléaire-κB (NF-κB, *nuclear factor-κB*), chef d'orchestre du processus inflammatoire, régule à la hausse l'expression de la iNOS (Lowenstein et al. 1993). Une hausse d'expression de la iNOS a été observée chez des personnes hypertendues (Smith et al. 2011), et dans un modèle d'inflammation chronique d'hypothyroïdie chez le rat (Viridis et al. 2009a). Cette hausse de production de NO par la iNOS, combinée à la hausse de stress oxydant n'améliore pas la relaxation dépendante de l'endothélium (Viridis et al. 2009a). Les anions superoxydes produits (indépendamment de la source) réagissent avec le NO pour former des peroxynitrites ce qui diminue la biodisponibilité du NO et réduit la relaxation dépendante de l'endothélium (Viridis et al. 2009a). Ainsi, l'inhibition spécifique de la iNOS avec l'aminoguanidine dans les aortes de rats hypertendus (Hong et al. 2000), avec le 1400W dans les artères mésentériques de patients (Rodriguez-Manas et al. 2009) et dans les aortes de rats âgés (Tian et al. 2010) améliore le processus de relaxation dans ces vaisseaux. De plus, la réduction de l'inflammation par l'inhibition du NF-κB chez le rat spontanément hypertendu (SHR, *spontaneously hypertensive rat*) diminue l'expression de la iNOS et favorise la relaxation dans l'aorte (Hong et al. 2000).

En résumé, le NO produit par les isoformes eNOS et nNOS favorise la santé vasculaire et permet les processus de relaxation dépendants de l'endothélium, tandis que le NO provenant de la iNOS serait métabolisé pour générer des espèces réactives (RS) et aurait des effets délétères. La eNOS, principalement, génère le NO et le H₂O₂ qui participent à la régulation de l'homéostasie vasculaire. Les altérations de l'expression ou du fonctionnement des NOS lors de conditions pathologiques participent au débalancement de l'équilibre des EDRF et EDCF. La prostacycline (PGI₂) et les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF, *endothelium-derived hyperpolarizing factor*) peuvent toutefois maintenir une relaxation dépendante de l'endothélium adéquate lorsque la contribution de la e/n/iNOS décroît.

1.1.1.2 La prostacycline

La PGI₂, comme toutes les prostaglandines (PG), dérive de l'acide arachidonique (AA). La phospholipase A₂ transforme les phospholipides membranaires en AA, puis, les cyclooxygénases (COX) 1 et 2 forment un précurseur commun, la PGH₂. Finalement, 5 prostanoïdes différents sont formés à partir de la PGH₂ grâce à leur synthèse respective: le thromboxane A₂ (TXA₂) par la thromboxane synthase (TXS), la PGD₂ par la PGD₂ synthase (PGD₂S), la PGE₂ par la PGE₂ synthase (PGE₂S), la PGF₂ par la PGF₂ synthase (PGF₂S) et la PGI₂ par la PGI₂ synthase (PGI₂S) (Feletou 2011a).

La PGI₂ est connue principalement pour ses rôles dans l'inhibition de l'agrégation des plaquettes et son effet vasodilatateur (Moncada et al. 1976; Dusting et al. 1978a; Dusting et al. 1978b; Dusting et al. 1978c; Gryglewski et al. 1978; Whittle et al. 1978). Chez des patients diabétiques dont la biodisponibilité du NO est diminuée, la PGI₂ participe au maintien de la relaxation dépendante de l'endothélium dans l'artère brachiale (Meeking et al. 2000). La PGI₂ agit en activant la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) par l'adénylate cyclase suite à la liaison au récepteur de la PGI₂ (IP) (Gorman et al. 1977; Tateson et al. 1977; Kukovetz et al. 1979). Cette hausse d'AMPC permet, entre autres, l'activation de la PKA qui stimule l'ouverture de canaux potassiques, menant à l'hyperpolarisation du muscle lisse et à la dilatation (Lawler et al. 2001; Feletou 2011a).

La PGI₂S est fortement exprimée dans les cellules endothéliales (Kawka et al. 2007). Les souris PGI₂S^{-/-} sont hypertendues, en plus de présenter une dysfonction rénale (Yokoyama et al. 2002). Tout comme pour la eNOS, la PGI₂S est sensible au stress oxydant: l'exposition de cellules endothéliales aortiques bovines en culture aux lipoprotéines de faible densité (LDL, *low-density lipoprotein*) oxydées (oxLDL) oxLDL inhibe la production de PGI₂ (Thorin et al. 1994) et il a été montré que le fonctionnement de la PGI₂S est altéré par les peroxy-nitrites (Zou et al. 2002; Schmidt et al. 2003). L'ajout de peroxy-nitrites sur des cellules endothéliales bovines en culture (Schmidt et al. 2003), ou la hausse de la production de peroxy-nitrites associée à un excès de glucose sur des cellules endothéliales humaines en culture (Zou et al. 2002) inhibent la PGI₂S via une hausse de sa nitration. Ainsi, une production accrue de PGI₂ par la PGI₂S ne peut que compenser temporairement une diminution de NO par la eNOS puisque les peroxy-nitrites finissent aussi par inhiber la PGI₂S (Zou et al. 2002; Schmidt et al. 2003). Toutefois, la production de PGI₂ peut également provenir de la COX2 (McAdam et al. 1999; Barbieri et al. 2012). Une augmentation de la production de PGI₂ via la COX2, afin de compenser la perte précoce de la eNOS, a été observée chez des souris dyslipidémiques (Gendron et al. 2007b). L'importance physiologique de la production de PGI₂ par la COX2 a été mise en évidence lors du retrait du marché du rofecoxib (Vioxx®). L'utilisation clinique du Vioxx®, un l'inhibiteur spécifique de la COX2, a été interrompue à cause d'un risque d'évènements cardiovasculaires plus élevé chez des patients atteints d'un cancer colorectal (Bresalier et al. 2005; Solomon et al. 2005), risque qui a été attribué à l'inhibition des effets protecteurs de la PGI₂ (Barbieri et al. 2012).

Les bienfaits de la PGI₂ nécessitent sa liaison au récepteur IP. La souris IP^{-/-} développe de manière accélérée l'athérosclérose (Egan et al. 2004; Kobayashi et al. 2004) et a un risque plus élevé de thrombose (Murata et al. 1997). De même, une mutation dans le récepteur IP accélère le développement de l'athérosclérose chez les patients à haut risque de MCV (Arehart et al. 2008). Si l'expression du récepteur IP est altérée, la PGI₂ lie le récepteur du thromboxane (TP) et provoque des effets délétères (section 1.1.2.1) (Numaguchi et al. 1999; Gluais et al. 2005b). Ainsi, les effets bénéfiques de la PGI₂ sont fortement dépendants de la présence et du bon fonctionnement du récepteur IP. Il faut noter que les effets protecteurs de la PGI₂ sont contrebalancés par le TXA₂ (section 1.1.2.1), ce qui suggère que le ratio PGI₂ / TXA₂ est primordial pour la santé

cardiovasculaire (Cipollone et al. 2008). Un déséquilibre de ce ratio est également associé au développement du cancer (Cathcart et al. 2010).

1.1.1.3 Les EDHF

Les EDHF participent aux processus de relaxation dépendants de l'endothélium chez les souris (Brandes et al. 2000; Scotland et al. 2005) et l'humain (Taddei et al. 2006) et à la régulation de la pression sanguine chez la souris (Brandes et al. 2000; Scotland et al. 2005). La contribution des EDHF à la relaxation dépendante de l'endothélium est inversement proportionnelle à la taille du vaisseau, leur impact étant le plus grand dans les petites artères de résistance (Urakami-Harasawa et al. 1997). La production des EDHF permettrait de compenser pour la diminution de NO et de PGI₂ afin de maintenir l'homéostasie vasculaire (Brandes et al. 2000; Scotland et al. 2005; Taddei et al. 2006). En effet, le NO inhibe la production des EDHF (Thorin et al. 1998; Nishikawa et al. 2000). De plus, la présence des EDHF permet la relaxation dépendante de l'endothélium dans les artères de résistance des souris eNOS^{-/-} (Brandes et al. 2000) et eNOS^{-/-}/COX1^{-/-} (Scotland et al. 2005). Les EDHF permettent aussi de compenser la dysfonction de la eNOS associée à la hausse de stress oxydant observée chez les patients hypertendus (Taddei et al. 2006).

Bien que le NO et la PGI₂ provoquent l'hyperpolarisation des VSMC, l'ion potassium (Edwards et al. 1998), les acides époxyeicosatriénoïques (ou EETs) provenant des enzymes du cytochrome P450 (Campbell et al. 1996; Krummen et al. 2005; Krummen et al. 2006), les métabolites de la lipooxygénase (acides hydroxyeicosatétraénoïques, ou HETEs) (Pfister et al. 1998; Faraci et al. 2001) et le H₂O₂ (Matoba et al. 2000; Miura et al. 2003; Gluais et al. 2005a; Drouin et al. 2007; Drouin et al. 2009) sont considérés comme des EDHF. Le peptide natriurétique de type-C (ou CNP), le monoxyde de carbone et le sulfure d'hydrogène peuvent aussi provoquer l'hyperpolarisation des VSMC quoique leur action comme EDHF ne soit pas encore confirmée (Feletou et al. 2006; Feletou et al. 2009).

La production des EDHF se fait suite à la hausse de calcium intracellulaire découlant, par exemple, de l'activation d'un récepteur couplé à une protéine G. Cette hausse de calcium

intracellulaire dans les cellules endothéliales permet l'ouverture des canaux potassiques dépendants du courant calcique de petite conductance (ou $K_{Ca2.3}$) et de conductance intermédiaire (ou $K_{Ca3.1}$), ce qui provoque l'hyperpolarisation de la cellule endothéliale (Feletou et al. 2006). Les VSMC seraient ensuite hyperpolarisées par 1) l'ion potassium lui-même qui pourrait activer les canaux potassiques des VSMC ou la pompe Na^+/K^+ -ATPase ou, 2) l'hyperpolarisation des cellules endothéliales pourrait être transmise directement aux VSMC par les jonctions «*gap*» (Feletou et al. 2006; Feletou 2011b).

En conclusion, la combinaison du NO, de la PGI_2 et des EDHF permet les processus de relaxation dépendants de l'endothélium dans les artères. Alors que le NO semble primordial dans les grosses artères de conductance, les EDHF sont plutôt impliqués dans les vaisseaux de résistance de petites tailles. Leur contribution relative est affectée par la progression du stress oxydant associée aux facteurs de risque cardiovasculaire. Avant l'apparition de la dysfonction endothéliale caractéristique des MCV, la perte d'un des EDRF semble pouvoir être compensée temporairement par les autres, afin de contrebalancer la hausse progressive des EDCF.

1.1.2 Les EDCF

1.1.2.1 Les EDCF dérivés de l'acide arachidonique

Certaines PG diminuent la relaxation dépendante de l'endothélium grâce à leur affinité pour le récepteur TP (Gluais et al. 2005b). La $PGF_{2\alpha}$ produite par la COX2 par exemple provoque la contraction d'aortes de hamsters en liant les récepteurs TP (Wong et al. 2009). Toutefois, c'est le TXA_2 , principal ligand des récepteurs TP, qui contrebalance majoritairement la relaxation dépendante de l'endothélium (Gluais et al. 2005b; Gluais et al. 2006). Une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium, attribuable à une hausse de TXA_2 , est observée avec l'âge dans les artères rénales de souris contrôles dites «sauvages» (WT, *wild type*) (Gendron et al. 2007a) et dans les artères cérébrales de souris WT et dyslipidémiques (Drouin et al. 2011b). Un traitement chronique avec un antioxydant permet de prévenir la dysfonction endothéliale et la hausse de TXA_2 observées chez les souris WT et dyslipidémiques âgées (Gendron et al. 2007a; Drouin et

al. 2011b), suggérant que le stress oxydant est impliqué dans les effets délétères du TXA₂. De plus, l'inhibition de la synthèse de TXA₂ prévient le développement de la dysfonction endothéliale dans les artères mésentériques de rats diabétiques (Matsumoto et al. 2009c). Le récepteur TP, situé en aval du TXA₂, est également important dans la régulation de la fonction endothéliale: l'absence du récepteur TP chez le lapin prévient la dysfonction endothéliale induite par une diète riche en cholestérol (Pfister 2006). De plus, l'activation du récepteur TP par un analogue du TXA₂ (U46619) inhibe la phosphorylation de la eNOS sur la Ser1177 dans une culture primaire de cellules endothéliales isolées à partir d'aortes de rats (Liu et al. 2009). Outre son impact négatif sur la relaxation dépendante de l'endothélium (Pfister 2006; Liu et al. 2009), le récepteur TP participe au développement de l'hypertension et promeut l'athérosclérose (Francois et al. 2004; Kobayashi et al. 2004; Pfister 2006; Francois et al. 2008). Bien que les souris TP^{-/-} aient une pression artérielle normale (Thomas et al. 1998), elles sont protégées contre l'hypertension induite par l'angiotensine II (AngII) (Francois et al. 2004) ou le N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, un inhibiteur des NOS) (Francois et al. 2008). L'absence du récepteur TP prévient l'athérosclérose chez la souris TP^{-/-}/apoE^{-/-} (Kobayashi et al. 2004) et chez le lapin déficient en récepteur TP nourri avec une diète riche en gras (Pfister 2006). Ainsi, autant le TXA₂ que son récepteur TP sont néfastes dans le processus de la relaxation dépendante de l'endothélium.

La production des EDCF dérivés de l'AA augmente avec l'âge et l'hypertension (Feletou et al. 2011), et il semble que la COX1 participe plus que la COX2 dans la production des EDCF (Tang et al. 2005). En effet, les aortes isolées des souris COX1^{-/-} produisent moins d'EDCF que les souris COX2^{-/-} (Tang et al. 2005). Le stress oxydant stimule la production des EDCF chez le rat hypertendu SHR, et la présence d'antioxydant ou l'inhibition spécifique (valéryl salicylate) ou non (indométacine) de COX1 bloque la production des EDCF (Yang et al. 2002; Tang et al. 2007). Paradoxalement et comme mentionné précédemment, la PGI₂ peut aussi agir comme EDCF en liant le récepteur TP si le récepteur IP est défaillant (Numaguchi et al. 1999; Gluais et al. 2005b).

La COX2, qui permet la production de PGI₂ (McAdam et al. 1999; Barbieri et al. 2012), peut aussi produire des EDCF. En effet, la production d'EDCF par la COX2 est augmentée avec l'âge (Heymes et al. 2000; Shi et al. 2008) et la présence de facteurs de

risque cardiovasculaire comme l'hypertension (Alvarez et al. 2005; Viridis et al. 2009b; Qu et al. 2010) et le diabète (Akamine et al. 2006b; Matsumoto et al. 2007a). Par exemple, une production accrue d'EDCF par la COX2 est observée dans les aortes (Heymes et al. 2000) et les artères fémorales (Shi et al. 2008) de rats âgés, engendrant une dysfonction endothéliale. L'activation de COX2 par le stress oxydant (Feng et al. 1995) serait responsable de la production d'EDCF (Akamine et al. 2006b; Matsumoto et al. 2007b; Shi et al. 2008; Viridis et al. 2009b).

L'infusion d'indométacine est pour l'instant la méthode utilisée cliniquement pour voir l'implication des COX dans la production des EDCF (Versari et al. 2009c), lorsqu'on désire évaluer la fonction endothéliale.

1.1.2.2 L'endothéline-1

L'endothéline (ET)-1 a été identifiée en 1988 (Yanagisawa et al. 1988a; Yanagisawa et al. 1988b; Yanagisawa et al. 1988c), quelques années après la première observation de la présence d'une substance contractile produite par l'endothélium (De Mey et al. 1982). Deux peptides similaires nommés ET-2 et ET-3 ont été identifiés après la découverte de l'ET-1 (Inoue et al. 1989); c'est toutefois l'ET-1 qui joue un rôle plus important au niveau vasculaire.

L'ET-1 constitue l'un des plus puissants EDCF (Yanagisawa et al. 1988a; Yanagisawa et al. 1988b; Yanagisawa et al. 1988c). Elle est synthétisée par les cellules endothéliales (Yanagisawa et al. 1988c) et agit via ses deux récepteurs: ET_A et ET_B (Arai et al. 1990; Sakurai et al. 1990). Le récepteur ET_A est situé sur les VSMC et participe à la constriction, tandis que le récepteur ET_B est localisé sur les cellules endothéliales et provoque dans la majorité des cas une relaxation (Nguyen et al. 2010; Thorin et al. 2010). Le NO peut inhiber la production d'ET-1 (Boulangier et al. 1990) et l'ET-1 peut atténuer l'effet des EDRF (Luscher et al. 1990). En condition non-pathologique, l'ET-1 favoriserait la liaison au récepteur ET_B et la vasodilatation (Nguyen et al. 2010). Toutefois, en conditions pathologiques, la production d'ET-1 est augmentée et favoriserait la vasoconstriction (Lerman et al. 1991; Winkles et al. 1993; Hasdai et al. 1997a; Hasdai et al. 1997b; Fan et al. 2000). Par exemple, chez des patients

athérosclérotiques la concentration plasmatique d'ET-1 est augmentée par rapport à des patients sains (Lerman et al. 1991). L'utilisation d'un antagoniste du récepteur ET_A améliore la relaxation dépendante de l'endothélium chez des patients coronariens (Halcox et al. 2001; Bohm et al. 2008). Chez la souris, les antagonistes du récepteur ET_A font régresser la plaque athéromateuse et améliorent la relaxation dépendante de l'endothélium dans l'aortes des souris apoE^{-/-} nourries avec une diète riche en gras (Barton et al. 1998). L'ET-1 peut aussi provoquer la hausse du stress oxydant dans les cellules endothéliales, ce qui participe au développement de la dysfonction endothéliale (Dong et al. 2005; Saitoh et al. 2009).

1.1.2.3 L'angiotensine II

L'implication du système rénine-angiotensine est majeure dans la régulation de la pression sanguine. Lorsque la pression chute, le rein produit de la rénine et la libère dans la circulation sanguine. La rénine clive l'angiotensinogène en angiotensine I, puis l'enzyme de conversion de l'angiotensinogène (ACE, *angiotensinogen converting enzyme*), présente principalement dans les poumons, clive l'angiotensine I en AngII (Guyton et al. 2006). Il y a plus de 40 ans, il a été démontré que les niveaux d'AngII sont augmentés chez les patients hypertendus rénaux (Catt et al. 1969), et le rôle de l'AngII est maintenant établi dans la pathogenèse de l'hypertension. L'AngII peut provoquer la hausse de la pression sanguine de 2 façons: 1) l'AngII induit la vasoconstriction des artérioles, ce qui augmente la résistance périphérique et mène à la hausse de la pression sanguine, 2) l'AngII peut directement, ou via la stimulation de la sécrétion d'aldostérone par les glandes surrénales, diminuer l'excrétion d'eau et favoriser la réabsorption de sodium, ce qui augmente le volume sanguin et donc la pression artérielle (Guyton et al. 2006).

L'AngII peut lier ses deux récepteurs, AT1 et AT2, mais c'est le récepteur AT1 qui est le plus fortement exprimé dans les tissus (Steckelings et al. 2005). Ainsi, l'activation du récepteur AT1 par l'AngII serait responsable de la vasoconstriction rénale et systémique, favoriserait la prolifération des VSMC, stimulerait la réabsorption du sodium et favoriserait la production du stress oxydant via l'activation de la NADPH oxydase (Nox) (Feletou 2011a). L'AngII peut, en effet, stimuler la production d'anions superoxydes par

la Nox (Rajagopalan et al. 1996; Landmesser et al. 2002; Touyz et al. 2002; Gragasin et al. 2003; Touyz et al. 2003). Il est intéressant de noter que l'AngII induit l'hypertension chez le rat au même niveau qu'une infusion avec de la norépinephrine, toutefois seule l'AngII active la production d'anions superoxydes dans les aortes (Rajagopalan et al. 1996). De plus, l'incubation de VSMC isolées de patients sains avec de l'AngII augmente l'expression de la Nox (Touyz et al. 2002; Touyz et al. 2003). Des données similaires ont été observées dans des cellules endothéliales isolées d'aortes bovines (Gragasin et al. 2003) et de souris (Landmesser et al. 2002). L'hypertension induite par l'infusion d'AngII est réduite chez les souris $p47phox^{-/-}$, une sous-unité de la Nox (section 1.2.1.1.1), démontrant l'implication de la Nox dans l'hypertension associée à l'AngII (Landmesser et al. 2002).

L'action pro-constrictrice de l'AngII via le récepteur AT1 et la production des anions superoxydes se traduisent *in vitro* par une dysfonction de l'endothélium. L'utilisation de médicaments ciblant le récepteur AT1 ou l'ACE réduit la tension artérielle et améliore la relaxation dépendante de l'endothélium, tant chez les patients (Enseleit et al. 2001), que dans les modèles animaux (Rajagopalan et al. 1996; Oak et al. 2007). L'inhibition de l'ACE chez des patients hypertendus traités pendant 12 à 24 mois améliore la relaxation dépendante de l'endothélium dans les artères brachiales (Taddei et al. 1998b) et glutéales (Schiffrin et al. 1995). Le candesartan (antagoniste AT1) et le captopril (un inhibiteur de l'ACE) ont prévenu la dysfonction endothéliale dans les aortes de souris diabétiques, suggérant que l'AngII participe à la dysfonction endothéliale (Oak et al. 2007). De même, le losartan a prévenu la dysfonction endothéliale et la hausse de stress oxydant induites par l'AngII dans les aortes chez le rat (Rajagopalan et al. 1996). Il est intéressant de mentionner que l'inhibition de l'ACE favorise aussi la relaxation dépendante de l'endothélium en empêchant la dégradation de la bradykinine, un autre EDRF (Enseleit et al. 2001).

En conclusion, les EDCF contrebalancent les effets bénéfiques des EDRF sur la relaxation dépendante de l'endothélium. La quantité d'EDCF augmente avec la présence des facteurs de risque cardiovasculaire et la progression des MCV. Le suivi de la concentration des EDCF (ou de leurs métabolites) pourrait ultimement permettre de détecter le développement de la dysfonction endothéliale. Le déséquilibre entre la

production des EDRF et des EDCF constitue l'un des mécanismes clés dans la progression de la dysfonction endothéliale.

1.2 La dysfonction endothéliale, un marqueur précoce des MCV

Un endothélium sain est primordial pour maintenir une bonne santé cardiovasculaire. Toutefois, avec l'âge (Lakatta et al. 2003) et la présence de facteurs de risque cardiovasculaire (Hamburg et al. 2008), la dysfonction endothéliale progresse. Le profil des cellules endothéliales change de protecteur à pro-athérosclérotique à mesure qu'elles deviennent dysfonctionnelles, ce qui favorise la pathogenèse des MCV (Rossi et al. 2004; Rossi et al. 2005). La dysfonction endothéliale a un intérêt clinique réel puisqu'il s'agit d'un marqueur d'évènements cardiovasculaires à venir (Lerman et al. 2005). Il est donc essentiel de comprendre comment la dysfonction endothéliale se développe pour mieux identifier les moyens de la prévenir.

1.2.1 Le stress oxydant

L'un des éléments déclencheurs dans l'initiation de la dysfonction endothéliale est la présence de stress oxydant dans les vaisseaux (Brandes et al. 2005). L'équilibre entre la production des RS et leur inactivation est importante pour éviter l'apparition de dommages oxydants sur les protéines, les lipides ou l'ADN. Cependant, un système d'enzymes antioxydantes finement régulées est en place pour protéger les vaisseaux face à une hausse de RS (section 1.2.1.2). De plus, l'apport exogène d'antioxydants dans la nourriture participe à la prévention des dommages oxydants (section 1.3.2).

1.2.1.1 Origine du stress oxydant vasculaire : les sources des RS

Les RS peuvent être radicalaires (un électron non-apparié) ou non, oxygénées, azotées (Tableau I) ou chlorées (comme l'acide hypochloreux par exemple).

Tableau I Liste des principales espèces réactives (RS) dans la fonction vasculaire

RS radicalaires	RS non-radicalaires
<u>Dérivées de l'oxygène</u>	
Anion superoxyde, $O_2^{\bullet-}$	Peroxyde d'hydrogène, H_2O_2
Radical hydroxyle, OH^{\bullet}	Peroxynitrite, $ONOO^-$
<u>Dérivées de l'azote</u>	
Monoxyde d'azote, NO	Peroxynitrite, $ONOO^-$

Les RS proviennent de plusieurs sources (Halliwell et al. 2007). Plusieurs enzymes peuvent participer à la production de RS au niveau vasculaire. Ces dernières jouent un rôle dans le déséquilibre de l'équilibre *rédox* menant à la dysfonction endothéliale (Figure 2).

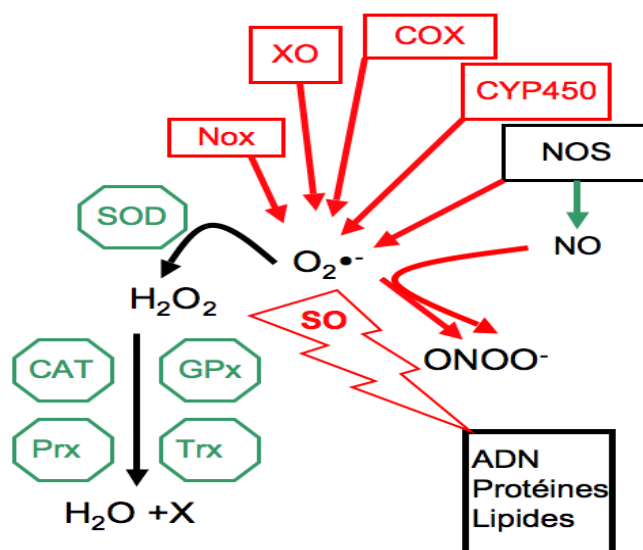


Figure 2 Les principales enzymes antioxydantes et pro-oxydantes et leurs espèces réactives associées.

L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est produit par la NADPH oxydase (Nox), la xanthine oxydase (XO), les cyclooxygénases (COX), les enzymes du cytochrome P450 (CYP450) ou la synthase du monoxyde d'azote (NOS) découplée. L' $O_2^{\bullet-}$ est transformé par la superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2); il peut aussi réagir avec le monoxyde d'azote (NO) pour former du peroxynitrite ($ONOO^-$). Le H_2O_2 est métabolisé en eau (et autres métabolites (X) selon la réaction enzymatique) par diverses enzymes: la glutathione peroxydase (GPx), la catalase (CAT), les peroxyrédoxines (Prx) et les thiorédoxines (Trx). Le stress oxydant (SO) généré altère la fonction primaire de l'ADN, des protéines et des lipides.

Certaines RS ont des effets plus marqués sur la fonction endothéliale. Alors que le NO et le H₂O₂ produits par la eNOS favorisent la relaxation des artères (section 1.1.1.1.1), les anions superoxydes et les peroxynitrites jouent un rôle clé dans la dysfonction endothéliale. L'un des principaux dangers d'une surproduction d'anions superoxydes est la production rapide de peroxynitrite à partir du NO. En effet, l'anion superoxyde réagit trois fois plus rapidement avec le NO qu'avec la superoxyde dismutase (SOD) (Thomson et al. 1995). Étant donné sa stabilité, le peroxynitrite peut réagir et altérer la fonction de diverses protéines et enzymes, en plus d'entraîner la dysfonction de la mitochondrie (Beckman et al. 1996). Une augmentation de la quantité des peroxynitrites est associée à une diminution de la biodisponibilité du NO et à la dysfonction endothéliale.

Les anions superoxydes peuvent être générés par les mitochondries, la xanthine oxydase (XO), les enzymes du cytochrome P450, les COX, la Nox et le découplage de la NOS (Cai et al. 2000; Halliwell et al. 2007; Chen et al. 2012). Par exemple, les oxLDL impliquées dans la pathogenèse de l'athérosclérose (Libby et al. 2011) stimulent la production de RS par les mitochondries des cellules endothéliales (Zmijewski et al. 2005). La dysfonction mitochondriale induite par la roténone, un inhibiteur du transfert des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale, provoque une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium dans les aortes (Weir et al. 1991) et les artères pulmonaires (Rodman et al. 1991) de rats attribuable à une hausse du stress oxydant provenant des mitochondries dysfonctionnelles (Csiszar et al. 2006a). Dans une méta-analyse, l'inhibition de la XO chez des patients (avec ou sans facteur de risque cardiovasculaire) améliore la fonction endothéliale de l'artère brachiale (stimulation par le flux ou l'acétylcholine) en plus de réduire la quantité de lipides oxydés dans le sang (mesure du malondialdéhyde) (Higgins et al. 2012). Bien que ces exemples illustrent l'importance de la mitochondrie et de la XO dans la production de RS, ce sont toutefois la Nox et le découplage de la eNOS qui sont les principaux responsables de la dysfonction endothéliale associée au stress oxydant.

1.2.1.1.1 La NADPH oxydase

La production accrue de l'anion superoxyde suite à la hausse de l'activité ou de l'expression de la Nox est l'une des principales sources de RS dans les MCV (Cai et al. 2000; Higashi et al. 2009; Brandes et al. 2010). La famille de la Nox contient 7 sous-unités catalytiques et 6 sous-unités régulatrices (Lassegue et al. 2012). Les sous-unités catalytiques sont les Nox1-5 et Duox1-2 et les sous-unités régulatrices sont p22phox, p40phox, p47phox, p67phox, Noxa1 et Noxo1 (Bedard et al. 2007; Lassegue et al. 2012). Pour obtenir un isoforme fonctionnel de la Nox, une sous-unité catalytique s'associe avec une ou plusieurs sous-unités régulatrices (Figure 3). La Nox4 est le principal isoforme dans les cellules endothéliales, Nox1 et Nox4 se retrouvent dans les VSMC et la Nox2 (originellement appelée gp91phox) est présente dans les macrophages (Bedard et al. 2007). Nox5 est aussi retrouvée dans les VSMC et les cellules endothéliales, cet isoforme ne requiert toutefois pas p22phox pour son activation contrairement aux Nox1, Nox2 et Nox4 (Lassegue et al. 2012). Bien qu'initialement tous les isoformes étaient supposés être associés à la production de l'anion superoxyde, il semble que Nox4 produise plutôt du H₂O₂ (Ray et al. 2011; Takac et al. 2011; Schroder et al. 2012). Nox3 est principalement située dans l'oreille interne et Duox1 et Duox2 se retrouvent dans la glande thyroïde (Bedard et al. 2007); ces sous-unités n'ont toutefois pour l'instant aucun intérêt cardiovasculaire et ne seront pas discutées.

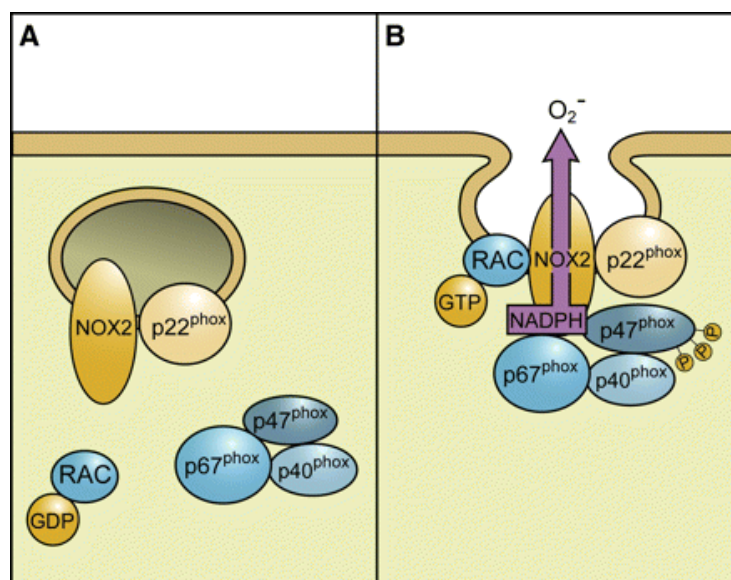


Figure 3 La structure de Nox2.

La sous unité catalytique Nox2 et la sous-unité régulatrice p22phox sont associées ensemble à la membrane de vésicules intracellulaires. La phosphorylation de p47phox permet son association avec p22phox. L'échange de GDP en GTP sur la protéine RAC permet sa liaison à Nox2. Une fois toutes les sous-unités de Nox2 associées à la membrane, le transfert des électrons s'effectue à partir du NADPH vers l'oxygène pour former l'anion superoxyde.

Réimprimé avec la permission de The American Physiological Society: Physiological Reviews, K Bedard, KH Krause. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology, 87 pp 245-313, Copyright (2007).

Les expressions des sous-unités de la Nox sont augmentées en présence de pathologies. Par exemple, chez des rats diabétiques, l'expression protéique de Nox2, Nox4, p22phox et p47phox est accrue dans les reins (Etoh et al. 2003; Asaba et al. 2005). Un traitement avec l'apocynine, un inhibiteur non-spécifique de la Nox, permet de prévenir la hausse des expressions rénales de Nox2, p22phox et p47phox associées à la hausse de la peroxydation lipidique de rats diabétiques (Asaba et al. 2005). L'augmentation des dommages oxydants rénaux mesurés par le 8-hydroxy-déoxyguanosine (ou 8-OHdG) ainsi que la hausse des expressions de Nox4 et p22phox peut aussi être prévenue par un traitement de 6 semaines à l'insuline chez des rats diabétiques (Etoh et al. 2003). L'hypertension stimule également les expressions de

plusieurs sous-unités de la Nox chez les rongeurs (Cifuentes et al. 2000; Landmesser et al. 2002; Mollnau et al. 2002; Touyz et al. 2002). Chez la souris, une infusion de 7 jours d'AngII provoque une hausse de plus de 40 mmHg de la pression systolique qui coïncide avec une hausse de la production des anions superoxydes et une hausse des expressions de Nox2, p47phox et p67phox dans l'aorte (Cifuentes et al. 2000; Landmesser et al. 2002). Le losartan, un antagoniste du récepteur AT1, prévient la hausse de la pression sanguine induite par l'AngII, ainsi que la hausse de l'expression des sous-unités de la Nox et les dommages oxydants dans l'aorte (Cifuentes et al. 2000).

La hausse des expressions aortiques de Nox1, Nox2 et p22phox induite par l'AngII chez le rat mène à la dysfonction endothéliale suite à la hausse de la production des anions superoxydes (Mollnau et al. 2002). L'inhibition de la Nox par l'apocynine peut renverser les effets délétères sur la relaxation dépendante de l'endothélium observés avec l'âge dans les carotides des souris (Rippe et al. 2010), avec la dyslipidémie dans les artères cérébrales de souris (Drouin et al. 2011b) ou avec le diabète dans les artères basilaires de rats (Matsumoto et al. 2007b). La délétion de Nox2 (Gorlach et al. 2000) ou de Nox1 (Matsuno et al. 2005) chez la souris favorise la relaxation dépendante de l'endothélium, confirmant le rôle important de la Nox dans la dysfonction endothéliale. De plus, l'amélioration de la relaxation dépendante de l'endothélium par les statines dans les aortes de rats pourrait provenir, du moins en partie, de la diminution des RS générés par la Nox (Wagner et al. 2000).

Bien que l'expression de Nox4 soit augmentée par l'hypertension induite par l'AngII (Wingler et al. 2001; Matsuno et al. 2005), le rôle de Nox4 semble différer des autres membres de la famille. La souris Nox4^{-/-} a pour phénotype une inflammation vasculaire accrue et une dysfonction endothéliale aortique (Schroder et al. 2012), alors que la surexpression de Nox4 spécifiquement dans l'endothélium améliore la relaxation dépendante de l'endothélium par une hausse de la production de H₂O₂ dans les aortes (Ray et al. 2011). Ces données suggèrent plutôt un rôle bénéfique au niveau vasculaire de Nox4, contrairement aux isoformes 1 et 2.

1.2.1.1.2 La eNOS découplée

Le découplage de la eNOS sous-entend que la eNOS produit de l'anion superoxyde plutôt que du NO, et ce phénomène s'accroît avec la présence de facteurs de risque cardiovasculaire (Brandes et al. 2005). Le découplage de la eNOS a été démontré dans les aortes de rats (Kerr et al. 1999) et de souris (Landmesser et al. 2003) hypertendus, de rats âgés (Csiszar et al. 2002) et de souris pro-athérosclérotiques apoE^{-/-} (Laursen et al. 2001; Ozaki et al. 2002). L'absence de L-arginine et du BH₄ mène au découplage de la eNOS et à une production accrue des anions superoxydes vasculaires (Pou et al. 1992; Vasquez-Vivar et al. 1998; Kerr et al. 1999). Le peroxyde d'azote, produit par la réaction entre le NO et l'anion superoxyde, accentue la dysfonction endothéliale aortique chez les souris apoE^{-/-} en inactivant le BH₄ (Laursen et al. 2001). À l'inverse, l'ajout exogène de BH₄ permet de diminuer la production d'anion superoxyde chez des souris hypertendues (Landmesser et al. 2003); la dénudation de l'endothélium ou la prise de L-NAME diminue la production de l'anion superoxyde chez le rat hypertendu (Kerr et al. 1999). La surexpression de la eNOS dans la souris apoE^{-/-}, à l'inverse de l'hypothèse initiale, accélère le développement de la plaque athéromateuse par la production accrue d'anions superoxydes dans l'aorte (Ozaki et al. 2002). Ces études démontrent l'importance cardiovasculaire du découplage de la eNOS.

En résumé, l'excès de RS a un effet vasculaire délétère. Ces RS peuvent provenir de différentes sources et accélèrent le développement de la dysfonction endothéliale. Pour diminuer le risque de l'accumulation de dommages oxydants et l'altération de la fonction endothéliale, un système endogène d'enzymes antioxydantes existe pour contrebalancer les effets des RS.

1.2.1.2 Les défenses antioxydantes endogènes

L'organisme subit constamment des agressions des RS endogènes ou provenant de l'environnement. Ainsi, pour éviter une accumulation de dommages oxydants, les cellules possèdent les ressources nécessaires pour faire face aux hausses aiguës et chroniques de RS. Les principales RS auxquelles les cellules doivent faire face sont l'anion

superoxyde et le H₂O₂, qui sont inactivés par les enzymes présentées dans les prochaines sections.

1.2.1.2.1 La superoxyde dismutase

La SOD se présente en 3 isoformes qui permettent toutes la dismutation de l'anion superoxyde en H₂O₂ (Figure 2). Les SOD 1 (ou CuZnSOD) et 3 (ou ecSOD) contiennent du cuivre et du zinc dans leur site actif, tandis que la SOD2 (ou MnSOD) contient plutôt du manganèse (Halliwell et al. 2007). La SOD1 est présente dans la majorité des cellules eucaryotes au niveau du cytosol, la SOD2 est localisée dans les mitochondries alors que la SOD3 se retrouve dans les fluides extracellulaires (Halliwell et al. 2007). La délétion des SOD 1 ou 3 n'affecte pas le développement des souris (Carlsson et al. 1995; Elchuri et al. 2005), tandis que les souris SOD2^{-/-} décèdent dans les premiers jours de leur vie (Li et al. 1995). Les souris SOD1^{-/-} et SOD2^{+/-} montrent, sans surprise, une hausse des dommages oxydants et une incidence accrue de cancer (Van Remmen et al. 2003; Elchuri et al. 2005). La délétion *in vitro* de la SOD3 par des petits ARN d'interférence (siRNA, *small interfering RNA*) promeut également une hausse des dommages oxydants et un phénotype cancérogène (Singh et al. 2012).

1.2.1.2.2 Les enzymes métabolisant les peroxydes

La catalase permet directement la décomposition du H₂O₂ en eau et en oxygène (Figure 2) (Halliwell et al. 2007). La souris catalase^{-/-} ne montre pas de phénotype majeur lors du développement (Ho et al. 2004). Une supplémentation en vitamine E permet toutefois de réduire l'incidence de cancer chez les souris acatalasémiques (Ishii et al. 1996). La catalase, qui est principalement localisée dans les peroxysomes, permet d'augmenter l'espérance de vie chez la souris seulement lorsqu'elle est surexprimée dans les mitochondries, et non dans les peroxysomes ou le noyau (Schriner et al. 2005), confirmant le rôle primordial de la mitochondrie dans la production et le métabolisme des RS. La surexpression de la catalase chez des souris pro-athérosclérotiques apoE^{-/-} diminue l'évolution de la plaque athérosclérotique et réduit la peroxydation lipidique dans

l'aorte, alors que la surexpression de la SOD1 est sans effet (Yang et al. 2004b). Ces résultats suggèrent que le H₂O₂ serait important dans le développement de l'athérosclérose chez les souris apoE^{-/-} (Yang et al. 2004b).

La glutathione peroxydase (GPx) transforme le H₂O₂ en oxydant la glutathione réduite (GSH), ce qui produit de l'eau et de la glutathione oxydée (Figure 2) (Halliwell et al. 2007). La GPx peut aussi dégrader les peroxydes lipidiques (Styskal et al. 2012), diminuant ainsi les dommages aux lipides. La GPx compte 8 isoformes et la GPx1 est celle qui est la plus exprimée (Halliwell et al. 2007; Styskal et al. 2012). L'activité de la GPx1 dans les érythrocytes de patients coronariens corrèle inversement avec le risque d'évènements cardiovasculaires (Blankenberg et al. 2003). Les souris GPx1^{-/-}/apoE^{-/-} développent l'athérosclérose plus rapidement que les souris apoE^{-/-} lorsqu'elles sont soumises à une diète de type western (Torzewski et al. 2007) ou suite à l'induction du diabète par la streptozotocine (Lewis et al. 2007). La délétion de la GPx1 chez les souris apoE^{-/-} augmente la présence de peroxydite et le stress oxydant dans les aortes, ce qui diminue la biodisponibilité du NO (Lewis et al. 2007; Torzewski et al. 2007). Ces données démontrent le rôle important joué par la GPx dans la protection des cellules endothéliales.

Chez les mammifères, la peroxyrédoxine (Prdx) compte 6 isoformes (PrdxI à PrdxVI) qui sont présents principalement dans le cytosol (Wood et al. 2003). Les Prdx ont la capacité de dégrader le peroxydite dans les bactéries (Bryk et al. 2000) et les levures (Wong et al. 2002; Pedrajas et al. 2010), ce qui les rend potentiellement intéressantes d'un point de vue vasculaire. Les Prdx ont-elles le même rôle au niveau vasculaire? Toutefois, à notre connaissance, aucune étude chez les mammifères dans ce contexte vasculaire n'a été réalisée à ce jour.

La thiorédoxine (Trx) compte 2 isoformes, la Trx1 est située dans le cytosol et la Trx2 dans la mitochondrie (Halliwell et al. 2007). L'expression de la Trx est augmentée en condition pathologique comme l'arthrite rhumatoïde (Yoshida et al. 1999), dans la plaque athérosclérotique (Takagi et al. 1998) et dans la défaillance cardiaque (Kishimoto et al. 2001). De même, une hausse d'expression de la Trx dans les artères coronaires de patients coronariens a été rapportée (Okuda et al. 2001). Cette dernière serait une

réponse protectrice face à la hausse de stress oxydant observé lors de la progression de l'athérosclérose (Okuda et al. 2001).

Les différentes enzymes métabolisant les peroxydes peuvent agir de manière concertée afin de maintenir les niveaux de RS faibles et éviter les dommages oxydants. Ainsi, la GPx et la Prdx pourraient métaboliser le H₂O₂ lorsque celui-ci est présent à faible concentration, alors que la catalase serait responsable de détoxifier le H₂O₂ lorsque sa concentration augmente (Wassmann et al. 2004; Neumann et al. 2009).

1.2.1.2.5 Le Nrf2

La régulation de l'expression des enzymes antioxydantes et des mécanismes de défense est complexe et plusieurs facteurs de transcription peuvent y participer (Halliwell et al. 2007). L'un de ceux qui suscite le plus d'intérêt est le facteur 2 relié au facteur nucléaire érythroïde 2 (Nrf2, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*).

Le Nrf2 est maintenu dans le cytosol par son inhibiteur endogène le *Kelch-like ECH-associated protein1* (Keap-1) (Itoh et al. 1999). La liaison de Keap-1 à Nrf2 mène ce dernier vers sa dégradation par le protéasome (Singh et al. 2010). Au contraire, la protéine DJ-1 stabilise Nrf2 et facilite sa translocation au noyau (Clements et al. 2006). Une fois entré dans le noyau, Nrf2 se lie à l'élément de réponse antioxydant (ARE, *antioxidant response element*) (Venugopal et al. 1996) présent sur le promoteur de plusieurs enzymes antioxydantes, comme la hème oxygénase-1 (HO-1) (Alam et al. 1999), la catalase (Venugopal et al. 1996) et la SOD3 (Folz et al. 1994; Singh et al. 2012). Puisqu'il active l'expression des enzymes antioxydantes, la surexpression de Nrf2 diminue la quantité des oxLDL dans les aortes de lapin (Levonen et al. 2007). De plus, la translocation nucléaire de Nrf2 induite par les forces mécaniques mimant le flux sanguin réduit la production de RS dans les cellules endothéliales humaines en culture (Dai et al. 2007). À l'inverse, les souris Nrf2^{-/-}/apoE^{-/-} ont plus de oxLDL que les souris apoE^{-/-}, avec (Sussan et al. 2008) ou sans diète pro-athérogénique (Barajas et al. 2011). Le Nrf2 active également des enzymes de phases II qui participent au métabolisme des médicaments (Singh et al. 2010).

De par ses propriétés antioxydantes, le Nrf2 pourrait jouer un rôle protecteur contre le cancer, les MCV, les maladies neurodégénératives et les maladies pulmonaires (Singh et al. 2010). La surexpression de Nrf2 permet de réduire l'inflammation occasionnée dans l'aorte dans un modèle de dénudation endothéliale induite par ballon chez le lapin («*rabbit aortic balloon denudation model*») (Levonen et al. 2007). À l'inverse, Nrf2 est inhibé par NF- κ B (Liu et al. 2008). Ces données suggèrent que Nrf2 est sensible aux processus inflammatoires associés aux MCV. Il a été démontré que les VSMC isolées de jeunes macaques Rhésus résistent au stress induit par le H₂O₂ via l'activation de Nrf2 et de ses gènes antioxydants cibles, tandis que le H₂O₂ n'active pas Nrf2 chez les macaques âgés, provoquant en retour des dommages oxydants (Ungvari et al. 2011a). Ainsi, dans les VSMC de macaques âgés, le H₂O₂ stimule NF- κ B et les processus inflammatoires (Ungvari et al. 2011a). Un phénomène similaire a été observé dans les aortes isolées de rats: l'expression de Nrf2 diminue avec l'âge (diminution concomitante à une hausse du stress oxydant) alors que les gènes cibles de NF- κ B (interleukine (IL)-6 et la molécule 1 de l'adhésion intercellulaire (ou ICAM-1)) augmentent (Ungvari et al. 2011b). Ainsi, il semble que les fonctions antioxydantes de Nrf2 diminuent avec l'âge, le stress oxydant et l'inflammation.

Tout comme pour KLF2 (Dekker et al. 2002; Parmar et al. 2006), les forces de cisaillement sur les parois des vaisseaux occasionnées par le flux sanguin activent aussi Nrf2 (Warabi et al. 2007). De plus, KLF2 facilite l'activation de Nrf2 et de ses gènes cibles sur des cellules endothéliales humaines en culture (Fledderus et al. 2008). Toutefois, le profil d'expression de Nrf2 n'est pas constant. Dans les régions vasculaires où le flux promeut l'athérosclérose, l'expression de Nrf2 est plus faible (Hosoya et al. 2005; Dai et al. 2007). Le développement de la plaque athérosclérotique est ralenti chez la souris Nrf2^{-/-}/apoE^{-/-} nourrie avec une diète riche en gras (Sussan et al. 2008; Barajas et al. 2011; Harada et al. 2012). Cette observation est surprenante puisque la HO-1, dont l'expression est régulée par Nrf2 (Alam et al. 1999), semble bénéfique pour contrer le développement de la plaque (Yet et al. 2003). Cette diminution de la plaque en absence de Nrf2 serait attribuable à la diminution du captage des lipides par les macrophages, entre autres par une diminution dans la quantité du récepteur CD36 (Sussan et al. 2008; Barajas et al. 2011), qui capte les oxLDL dans les macrophages (Endemann et al. 1993; Nozaki et al. 1995) et dont l'expression est régulée par Nrf2 (Ishii

et al. 2004). Ces données relient Nrf2 au métabolisme de la plaque, une étape cruciale dans la progression de l'athérosclérose et des MCV.

Les cellules possèdent donc un système de défense comprenant plusieurs enzymes antioxydantes qui neutralisent les divers RS. Ces enzymes travaillent de manière coordonnée pour éviter les dommages oxydants sur les lipides, les protéines ou l'ADN des cellules. Une altération dans le fonctionnement du métabolisme antioxydant dirige la cellule vasculaire lentement vers sa dysfonction, ce qui pourrait accélérer son vieillissement.

1.2.2. Le vieillissement

Plusieurs théories du vieillissement existent (Medvedev 1990): certains gènes de longévité ont été identifiés (section 1.2.2.1), une défaillance du système endocrinien ou immunitaire a été suggérée, et diverses théories ont prôné que l'accumulation de dommages cellulaires (de diverses origines) provoquerait le vieillissement (Halliwell et al. 2007). Il semble plutôt que chaque théorie ne contienne qu'une portion de la réponse et que le vieillissement provienne de processus aléatoires affectant plusieurs mécanismes (Holliday 2006; Hayflick 2007). Kirkwood suggère quant à lui que *«le vieillissement est caractérisé par une dysfonction graduelle et généralisée des fonctions résultant en une vulnérabilité accrue à l'environnement et un risque grandissant de maladies, menant vers la mort»* (Kirkwood 2005).

Le vieillissement vasculaire est quant à lui spécifique à la dysfonction progressive des fonctions vasculaires qui survient au fil du temps et est accélérée par la présence de facteurs de risque cardiovasculaire (Brandes et al. 2005). Le vieillissement vasculaire se caractérise entre autres par la dysfonction endothéliale (Brandes et al. 2005). Voyons de façon plus détaillée les théories du vieillissement les plus importantes, qui sont aussi impliquées dans le vieillissement vasculaire.

1.2.2.1 Les gènes de longévité

Plusieurs gènes ont été impliqués dans le processus de vieillissement (North et al. 2012). Certains de ces gènes jouent un rôle important dans l'équilibre *rédox* cellulaire ou affectent l'expression de gènes clés dans la fonction endothéliale.

Le p66shc est une protéine adaptatrice dont la répression chez la souris p66shc^{-/-} augmente l'espérance de vie de 30% tout en augmentant la résistance aux stress (H₂O₂, rayonnement UV, paraquat) (Migliaccio et al. 1999). Cette dernière observation souligne le rôle pro-apoptotique de p66shc via la production de H₂O₂. En effet, p66shc réorienterait une partie du flux mitochondrial des électrons vers la production de H₂O₂, oxydant du même coup le cytochrome c et engendrant l'ouverture du pore de transition de la perméabilité (PTP, *permeability transition pore*) pour mener la cellule vers l'apoptose (Giorgio et al. 2005). Le p66shc serait un médiateur important dans l'apoptose sous le contrôle de p53 (Migliaccio et al. 1999; Trinei et al. 2002), mais serait aussi une source majeure de RS (Giorgio et al. 2005). La perte de p66shc dans les macrophages provoquerait une dysfonction de la Nox tout en diminuant la production des anions superoxydes (Tomilov et al. 2010). Le rôle de p66shc dans le vieillissement est souligné par le fait que la délétion de p66shc permet de ralentir le développement des pathologies cardiovasculaires associés aux processus du vieillissement chez les souris p66shc^{-/-} tels que le diabète (Menini et al. 2006; Rota et al. 2006; Camici et al. 2007), l'hypertension (Graiani et al. 2005), les accidents vasculaires cérébraux (Spescha et al. 2013) et l'athérosclérose (Napoli et al. 2003; Martin-Padura et al. 2008). L'inhibition avec des siRNA de p66shc favorise également la phosphorylation de la eNOS au site Ser1177, augmentant la production de NO et favorisant la relaxation dépendante de l'endothélium de l'aorte chez le rat (Yamamori et al. 2005).

La sirtuine-1 (Sirt-1) est quant à elle une NAD⁺ histone déacétylase qui affecte plusieurs protéines majeures. L'intérêt suscité par la Sirt-1 provient du fait que sa surexpression augmente l'espérance de vie chez le ver (Tissenbaum et al. 2001) et la mouche à fruits (Rogina et al. 2004). De plus, il semble que la présence de la Sirt-1 soit un prérequis chez la drosophile pour permettre l'allongement de son espérance de vie dans le cadre d'une restriction calorique (Rogina et al. 2004). La déacétylation par la Sirt-1 du gène

suppresseur de tumeurs p53 (Luo et al. 2001; Vaziri et al. 2001) et du «*forkhead box O3*» (ou FOXO3) (Brunet et al. 2004) permettrait respectivement de réduire l'apoptose et d'augmenter la réponse au stress, ce qui expliquerait l'impact positif sur le vieillissement de la Sirt-1. L'activation de la Sirt-1 permet aussi de prévenir le vieillissement vasculaire accéléré observé suite au diabète dans des cellules endothéliales humaines (Orimo et al. 2009) ou suite à une diète riche en gras chez la souris apoE^{-/-} (Zhang et al. 2008). La Sirt-1 déacétyle *in vitro* la eNOS pour favoriser la relaxation dépendante de l'endothélium (Mattagajasingh et al. 2007). L'inhibition de la Sirt-1 avec le nicotinamide diminue la relaxation dépendante de l'endothélium dans les aortes isolées chez le rat (Zaruelo et al. 2013). Cette dysfonction serait attribuable à la hausse de production des anions superoxydes aortiques par la Nox (Zaruelo et al. 2013).

En résumé, l'activation de la Sirt-1 ou l'inhibition de p66shc seraient des cibles potentielles pour ralentir le vieillissement et pour prévenir le développement de plusieurs pathologies associées au vieillissement (Camici et al. 2010). Leur rôle dans la dysfonction endothéliale et le vieillissement provient en partie de leur impact sur la production des RS.

1.2.2.2 La théorie des radicaux libres

La théorie des radicaux libres propose que l'accumulation de dommages oxydants provoque le vieillissement (Harman 1956; Harman 2006). Cette théorie a initialement été proposée en 1956 par Harman (Harman 1956), et a été amendée par la suite à quelques reprises (Harman 1972; Harman 1983; Harman 2006). Étant donné le rôle important des mitochondries dans la production de RS, une place importante leur a été dédiée (Harman 1972).

Les groupes de recherche des Drs Anna Csiszar et Zoltan Ungvari en Oklahoma ont réalisé plusieurs études en faveur de la théorie des radicaux libres (Csiszar et al. 2002; Labinsky et al. 2006; Csiszar et al. 2007b; Ungvari et al. 2011a; Ungvari et al. 2011b; Ungvari et al. 2011c; Ungvari et al. 2013a; Ungvari et al. 2013b). En effet, ils ont montré qu'avec l'âge, la quantité de RS augmentait dans les artères coronaires chez le rat (Csiszar et al. 2002). Ils ont de plus démontré que chez les souris *Peromyscus leucopus*,

qui ont une espérance de vie maximale doublée par rapport aux souris *Mus musculus*, les niveaux de dommages oxydants vasculaires sont inférieurs (Csiszar et al. 2007b). Dans les aortes des souris *Peromyscus leucopus*, une production de RS inférieure et une expression protéique supérieure de la catalase, la GPx-1 et la HO-1 par rapport aux souris *Mus musculus* sont observées (Csiszar et al. 2007b). Chez les mollusques, qui sont des modèles fréquemment utilisés dans les études sur le vieillissement, la palourde *Arctica islandica* qui peut vivre plusieurs centaines d'années a moins de dommages oxydants dans son cœur et ses branchies que son voisin taxinomique *Mercenaria mercenaria* qui vit environ 100 ans (Ungvari et al. 2011c). Ces résultats confirment plusieurs observations publiées auparavant par d'autres groupes dans d'autres espèces: l'étude du rein et du cœur chez 7 différents mammifères (souris, hamster, rat, lapin, porc, vache, cochon d'Inde) avait montré une corrélation inverse entre l'espérance de vie et la production mitochondriale de RS (Ku et al. 1993a). Une étude similaire chez 8 mammifères (souris, rat, lapin, cochon d'Inde, mouton, vache, cheval, porc) était arrivée à la même conclusion: il y a une corrélation inverse entre les dommages oxydants dans le cerveau et le cœur et l'espérance de vie (Barja et al. 2000). Chez le rat et le pigeon, 2 espèces ayant une masse corporelle similaire, l'espérance de vie supérieure du pigeon serait attribuable à la production inférieure de RS dans le cerveau, le cœur et les reins, couplée à des activités antioxydantes supérieures de la catalase, de la GPx et de la SOD dans ces tissus (Ku et al. 1993b; Barja et al. 1998). Toutes ces données sont en accord avec la théorie des radicaux libres.

Les espèces qui présentent moins de dommages oxydants et vivent plus longtemps résistent également mieux face à des stress exogènes (Migliaccio et al. 1999; Labinskyy et al. 2006; Csiszar et al. 2007b; Ungvari et al. 2011a; Ungvari et al. 2011b; Ungvari et al. 2011c; Ungvari et al. 2013a; Ungvari et al. 2013b). Cette observation est en accord avec la théorie des radicaux libres puisque la capacité à éviter une hausse de stress oxydant favorise la survie. Les artères carotides isolées du «*naked mole rat*», le rongeur ayant l'espérance de vie maximale la plus longue (28 ans), présentent moins de dommages oxydants et une activation des caspases inférieure par rapport aux carotides isolées de la souris *Mus musculus* en présence de H₂O₂ (Labinskyy et al. 2006). Les palourdes ayant une espérance de vie maximale plus grande (*Arctica islandica* et *Tridacna derasa*) ont mieux résisté (taux de survie plus grand) aux stress génotoxiques du *tert*-butyl

hydroperoxyde (TBHP), du gaz moutarde et du méthyl méthanesulfonate par rapport à la palourde *Argopecten irradians irradians* qui a une espérance de vie plus courte (Ungvari et al. 2013a; Ungvari et al. 2013b). La palourde *Arctica islandica* présente aussi moins d'apoptose en présence du TBHP que *Mercenaria mercenaria* (Ungvari et al. 2011c). Les aortes des souris *Peromyscus leucopus* résistent mieux (moins d'apoptose et de stress oxydant) face à une forte concentration de glucose ou de oxLDL (Csiszar et al. 2007b). Les fibroblastes isolés des souris p66shc^{-/-}, qui ont une espérance de vie supérieure aux souris WT, ont une résistance accrue face à la toxicité du H₂O₂ (Migliaccio et al. 1999). De plus, les souris p66shc^{-/-} survivent plus longtemps que les souris WT suite à une injection de paraquat, qui génère une dose massive de RS (Migliaccio et al. 1999). À l'inverse, les cellules endothéliales et les VSMC isolées de rats ou macaques âgés ne parviennent pas à se défendre efficacement contre une concentration élevée de H₂O₂ ou de glucose car le vieillissement provoque une dérégulation de la voie protectrice du Nrf2 (Ungvari et al. 2011a; Ungvari et al. 2011b).

Bien que la théorie des radicaux libres soit appuyée par différentes études montrant que le stress oxydant s'accroît avec l'âge (Finkel et al. 2000), plusieurs voix se sont élevées pour s'y opposer (Blagosklonny et al. 2010; Lapointe et al. 2010). Selon les opposants, si la seule raison du vieillissement provient d'un excès de RS, alors la surexpression des enzymes antioxydantes devrait prolonger la survie et leur inhibition devrait diminuer l'espérance de vie (Lapointe et al. 2010). Toutefois, seule la surexpression de la catalase chez la souris a montré un effet direct sur l'espérance de vie (Schriner et al. 2005), alors que la surexpression ou l'inhibition des autres enzymes antioxydantes chez la souris se sont avérées sans effet (Perez et al. 2009b; Perez et al. 2009c). Bien que la consommation d'antioxydants comme le N-acétyl-cystéine (Sablina et al. 2005) ou le resvératrol (Baur et al. 2006) chez la souris réduise le stress oxydant et prolonge la vie, ce phénomène n'est pas observé chez l'humain (Steinberg et al. 2002; Katsiki et al. 2009) (section 1.3.2.1). Il semble donc que le processus du vieillissement soit en fait complexe et multifactoriel, tout en étant compatible avec une hausse du stress oxydant (Holliday 2006; Hayflick 2007).

1.2.2.3 L'«*inflammaging*»

Avec l'âge, les marqueurs inflammatoires tels que les cytokines augmentent (Kritchevsky et al. 2005; Libby et al. 2010), et la présence chronique de cette inflammation participerait au processus du vieillissement (Franceschi et al. 2000). Pour illustrer le rôle de l'inflammation dans le vieillissement, le nom d'«*inflammaging*» a été attribué à ce phénomène (Figure 4) (Franceschi et al. 2000).

L'inflammation, qui est initialement un mécanisme bénéfique pour favoriser la réparation des tissus, devient délétère lorsqu'elle est continuellement présente puisqu'elle épuise le système immunitaire peu à peu (Goto 2008). La théorie de l'*inflammaging* propose que l'inflammation délétère débute lorsqu'une certaine limite est atteinte en fonction de la capacité individuelle définie selon la génétique et l'environnement. Cet état proinflammatoire mène ensuite vers le vieillissement et les maladies associées au vieillissement, comme les MCV et le cancer (Figure 4) (Franceschi et al. 2000). Cette hausse d'inflammation est aussi intimement liée à la présence grandissante du stress oxydant associé au vieillissement (Franceschi et al. 2000; Singh et al. 2011).

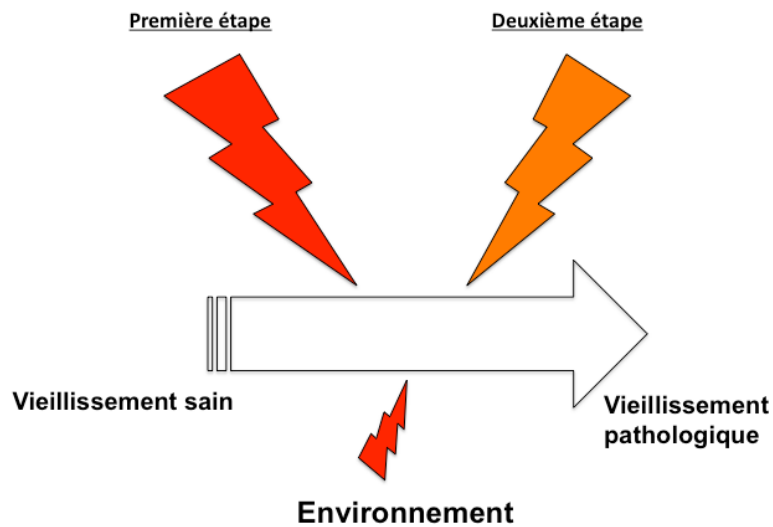


Figure 4 L'«*inflammaging*».

La première étape de l'«*inflammaging*» est l'état proinflammatoire qui découle des mécanismes d'adaptation face au vieillissement : le génotype des individus déterminera la durée de cette étape. La deuxième étape est l'absence de variants géniques protecteurs ou la présence de variants qui fragilisent les individus face à l'environnement, et accélérera le processus du vieillissement.

Réimprimé et adapté avec la permission de John Wiley and Sons: Annals of the New York Academy of Sciences. Claudio Franceschi, Massimiliano Bonafè, Silvana Valensin, Fabiola Olivieri, Maria De Luca, Enzo Ottaviani, Giovanna De Benedictis. Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenesence, 908 pp 244-254, Copyright (2000).

Cette hausse d'inflammation avec l'âge a été observée principalement par l'augmentation des niveaux plasmatiques d'IL-6 et de CRP (Singh et al. 2011). Les personnes saines mais âgées présentent des taux d'IL-6 plasmatiques supérieurs à ceux des personnes jeunes, et la concentration d'IL-6 corrèle avec l'âge (Wei et al. 1992; Roubenoff et al. 1998; Ferrucci et al. 2005). De plus, une faible quantité circulante d'IL-6 suggère un âge biologique plus jeune que l'âge chronologique chez l'humain (Holly et al. 2013). L'augmentation de l'adiposité observée avec l'âge et la réduction des niveaux d'hormones sexuelles produites pourraient expliquer la hausse des cytokines plasmatiques associée au vieillissement (Singh et al. 2011). Des corrélations positives entre l'inflammation et l'obésité ont été observées dans des études cliniques (Pou et al. 2007; Schragger et al. 2007; Beasley et al. 2009). La quantité de graisse viscérale

abdominale a été associée de manière significative aux quantités circulantes d'IL-6 et de CRP, et ce peu importe l'ethnie et le sexe chez plus de 2500 patients âgés entre 70 et 79 ans (Beasley et al. 2009). Chez 1250 patients (âge moyen de 60 ± 9 ans) de la cohorte de Framingham, les niveaux circulants d'IL-6, de CRP et d'isoprostanes corrélaient également avec la masse adipeuse viscérale (Pou et al. 2007). Chez plus de 800 patients de plus de 65 ans (âge moyen de 74 ± 7 ans), l'IL-6 et la CRP corrélaient également avec la circonférence de la taille (Schrager et al. 2007). Quant au rôle des hormones sexuelles, il a été montré que la testostérone (Keller et al. 1996) et l'estrogène (Ray et al. 1997) peuvent réprimer *in vitro* l'expression génique de l'IL-6 en liant son promoteur. Ceci pourrait expliquer l'augmentation avec l'âge du niveau d'IL-6 plasmatiques puisque les hormones sexuelles diminuent avec l'âge (Singh et al. 2011). Chez près de 500 hommes âgés de 65 ans et plus, le niveau plasmatique de testostérone ne corréle pas avec la quantité circulante d'IL-6, mais plutôt avec la forme soluble du récepteur de l'IL-6 (Maggio et al. 2006a), un maillon essentiel dans la signalisation de l'IL-6 (Maggio et al. 2006b). Le niveau circulant d'IL-6 augmente avec l'âge chez les femmes et corréle avec le statut «post-ménopause» (Kania et al. 1995). Ainsi, la concentration de cytokines circulantes augmente avec l'âge et une inflammation chronique est présente dans plusieurs pathologies associées au vieillissement comme le cancer (Mantovani et al. 2008), le diabète (Wellen et al. 2005) et les MCV (section 1.2.3.4) (Ridker 1998).

En résumé, plusieurs mécanismes cellulaires participent au vieillissement de l'organisme. La diminution de l'expression de gènes de longévité comme la Sirt-1 réduit la capacité des cellules à se défendre. De même, la hausse d'expression de gènes délétères comme le p66shc, une hausse du stress oxydant et/ou la mise en place de l'inflammation de manière chronique induisent des dommages cellulaires irréversibles. Ainsi, des agressions chroniques épuisent les mécanismes de défenses des cellules, les rendant plus vulnérables aux stress futurs. Lorsque certains de ces mécanismes sont épuisés au niveau vasculaire, ils favorisent la dysfonction endothéliale.

1.2.3 Le vieillissement vasculaire mène vers la dysfonction endothéliale

Puisque l'endothélium est très exposé, il est susceptible aux dommages induits par l'environnement (Lakatta 2003). L'intégrité et la fonction des cellules endothéliales diminuent avec le temps (Lakatta 2003). Bien qu'elle ne soit pas mesurée fréquemment en clinique, la mesure de la fonction endothéliale pourrait être un bon outil pour évaluer la santé cardiovasculaire des patients (Landmesser et al. 2004; Versari et al. 2009b). Plusieurs études ont en effet montré que la dysfonction endothéliale permet de prédire le risque d'évènements coronariens futurs (Schachinger et al. 2000; Suwaidi et al. 2000; Heitzer et al. 2001b; Halcox et al. 2002; Targonski et al. 2003).

Avec l'âge, le stress oxydant augmente et la dysfonction endothéliale qui se développe est intimement reliée à ce déséquilibre *rédox* (Ku et al. 1993a; Ku et al. 1993b; Barja et al. 1998; Barja et al. 2000; Csiszar et al. 2002; Csiszar et al. 2007b; Ungvari et al. 2011c). Ce phénomène a été répertorié maintes fois autant chez les rongeurs (van der Loo et al. 2000; Hamilton et al. 2001; Csiszar et al. 2002; Sindler et al. 2011; Dal-Ros et al. 2012) que chez l'homme (Eskurza et al. 2006; Donato et al. 2007; Gates et al. 2007). Chez des patients âgés, une hausse des niveaux circulants de oxLDL est corrélée avec une diminution de la dilatation induite par le flux dans les artères brachiales (Eskurza et al. 2006; Gates et al. 2007). Une hausse de la nitrotyrosine, le marqueur principal des peroxy-nitrites, est retrouvée dans les artères coronaires de rats âgés conjointement à une augmentation de la production d'anions superoxydes (Csiszar et al. 2002). Cet accroissement dans la production des anions superoxydes avec l'âge est presque toujours présent dans les vaisseaux, dont les sources sont: la Nox (Hamilton et al. 2001; Donato et al. 2007; Drouin et al. 2011b; Sindler et al. 2011; Dal-Ros et al. 2012), la iNOS (Csiszar et al. 2002; Francia et al. 2004; Ungvari et al. 2011a) et la eNOS découplée (van der Loo et al. 2000). Les anions superoxydes produits réagissent avec le NO pour donner des peroxy-nitrites. Ceux-ci altèrent la fonction de la SOD2 (van der Loo et al. 2000), diminuant les défenses antioxydantes endogènes et favorisant la hausse de stress oxydant. Cette hausse de stress oxydant joue un rôle majeur dans la détérioration de la fonction endothéliale avec l'âge, et la voie du NO est principalement touchée (section 1.2.3.1). De plus, un déséquilibre entre les EDRF et les EDCF (section 1.2.3.2),

la dysfonction des VSMC (section 1.2.3.3) et la présence chronique de l'inflammation (section 1.2.3.4) observés avec l'âge contribuent également à détériorer la fonction endothéliale.

1.2.3.1 Diminution de la biodisponibilité du NO

La contribution du NO, très impliqué dans les processus de la relaxation dépendante de l'endothélium (section 1.1.1.1), diminue avec l'âge (Matz et al. 2000; Taddei et al. 2001; Al-Shaer et al. 2006). Ceci peut s'expliquer par une baisse directe de la production du NO, ou par une augmentation de son catabolisme (Figure 5).

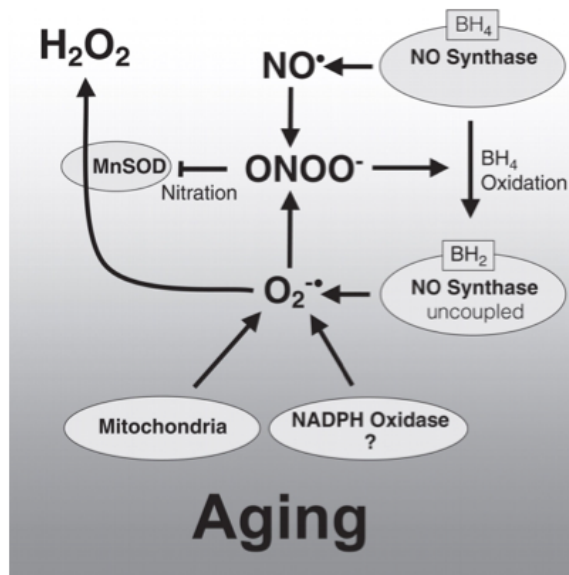


Figure 5 Le métabolisme du NO est altéré par le stress oxydant associé au vieillissement.

Avec l'âge, la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) par la mitochondrie, la NADPH oxydase et la eNOS découplée est augmentée. Cet $O_2^{\bullet-}$ réagit avec le NO pour produire du peroxynitrite ($ONOO^-$). Ce dernier oxyde le BH_4 et augmente le découplage de la eNOS. Le $ONOO^-$ réagit avec la superoxyde dismutase mitochondriale (MnSOD) et altère son fonctionnement.

Réimprimé avec la permission de Oxford University Press : Cardiovascular Research, Ralf P. Brandes, Ingrid Fleming, Rudi Busse., Endothelial aging, **66**(2): 286-294., Copyright (2005).

Il a été rapporté qu'avec l'âge, l'expression protéique de la eNOS diminue dans les aortes de rats (Csiszar et al. 2002; Wu et al. 2007) et de souris (Sindler et al. 2011; Fleenor et al. 2012), ou augmente dans les aortes (Matz et al. 2000; van der Loo et al. 2000) et les artères mésentériques (Matz et al. 2000; Dal-Ros et al. 2012) de rats, ce qui ne permet pas d'affirmer quel est l'effet direct du vieillissement sur l'expression de la eNOS. Toutefois, une diminution de la biodisponibilité du NO est généralement observée (van der Loo et al. 2000; Hamilton et al. 2001; Sindler et al. 2011). Une hausse de l'expression et de l'activité aortique de la eNOS chez le rat provoquerait en fait des dommages car elle produirait de l'anion superoxyde plutôt que du NO (van der Loo et al. 2000). De plus, puisque l'anion superoxyde réagit plus rapidement avec le NO qu'avec la SOD (Thomson et al. 1995), une hausse de l'expression de la eNOS (Dal-Ros et al. 2012) ou de la iNOS (Csiszar et al. 2002; Francia et al. 2004; Tian et al. 2010) pourrait augmenter la production de peroxynitrites. Cette hausse de peroxynitrites est très fréquemment observée avec l'âge et contribue à la dysfonction endothéliale observée dans les aortes (van der Loo et al. 2000; Hamilton et al. 2001; Tian et al. 2010), les artères mésentériques (Dal-Ros et al. 2012) et coronaires (Csiszar et al. 2002) chez le rat, dans les aortes de souris (Sindler et al. 2011; Fleenor et al. 2012) et les artères brachiales humaines (Donato et al. 2007). Une supplémentation en nitrate pour compenser la diminution de la biodisponibilité du NO avec l'âge, permet de prévenir la baisse de la relaxation dépendante de l'endothélium, tout en diminuant la hausse de stress oxydant et de l'inflammation associée avec l'âge dans les aortes de souris (Sindler et al. 2011).

Outre le découplage de la eNOS, la hausse de peroxynitrites peut également provenir de l'augmentation de la production de l'anion superoxyde via la hausse d'expression ou d'activité de la Nox dans les aortes de rats (Hamilton et al. 2001) et de souris (Sindler et al. 2011; Fleenor et al. 2012), dans les artères mésentériques de rats (Dal-Ros et al. 2012) et dans les artères brachiales humaines (Donato et al. 2007). D'autre part, une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes pouvant neutraliser les RS, comme la baisse des SOD1 et 2 dans les aortes de rats (van der Loo et al. 2000) et de souris pourrait aussi expliquer la hausse de peroxynitrites observée avec l'âge (Csiszar et al. 2008a; Sindler et al. 2011; Fleenor et al. 2012). L'utilisation d'analogues de la SOD (tempol ou tiron) ou l'inhibition des Nox par l'apocynine bloquent la hausse de la

production des peroxy-nitrites, ce qui maintient la relaxation dépendante de l'endothélium dans les aortes (Hamilton et al. 2001), les artères mésentériques (Dal-Ros et al. 2012) et les artères coronaires (Csiszar et al. 2002) chez le rat et dans les aortes (Sindler et al. 2011; Fleenor et al. 2012) et les artères cérébrales (Drouin et al. 2011b) de souris.

Le niveau de BH₄ est également primordial pour le bon fonctionnement de la eNOS (Landmesser et al. 2003). La quantité de BH₄ diminue avec l'âge (Delp et al. 2008; Sindler et al. 2009), ce qui contribue à l'altération de la relaxation dépendante de l'endothélium puisqu'une déficience en BH₄ promeut le découplage de la eNOS (Vasquez-Vivar et al. 1998). Puisque le BH₄ peut aussi être oxydé par les peroxy-nitrites, la hausse de peroxy-nitrites engendre un cercle vicieux, où la hausse des anions superoxydes génère plus de peroxy-nitrites, qui diminuent la quantité de NO biodisponible en plus de promouvoir le découplage de la eNOS (Figure 5). Dans un contexte clinique expérimental (études avec moins de 50 patients), la supplémentation en BH₄ a amélioré la relaxation dépendante de l'endothélium dans les artères brachiales de patients âgés (Eskurza et al. 2005; Higashi et al. 2006). De façon similaire, la supplémentation en BH₄ a amélioré la fonction endothéliale des artères carotides chez des souris âgées (Sindler et al. 2011).

L'arginase est une enzyme dégradant le substrat des NOS, la L-arginine. Une hausse d'expression aortique de l'arginase est observée avec l'âge chez le rat, ce qui pourrait également contribuer à la diminution de la biodisponibilité du NO (Kim et al. 2009). L'inhibition de l'arginase avec un antisens (White et al. 2006) ou le difluorométhylornithine (Berkowitz et al. 2003) améliore la relaxation dépendante de l'endothélium dans l'aorte chez le rat. De plus, la perte de vasodilatation observée avec l'âge a été renversée par une supplémentation aigue (20 minutes) en L-arginine et par l'inhibition de l'arginase par une combinaison d'inhibiteurs (le (S)-(2-boronoéthyl)-L-cystéine-HCl et le N^ω-hydroxy-nor-L-arginine) chez 9 patients âgés (Holowatz et al. 2006).

Le diméthylarginine asymétrique (ADMA, *asymmetric dimethylarginine*) est un inhibiteur endogène du NO et provient de la méthylation de la L-arginine (Teerlink et al. 2009). Celui-ci serait important dans la pathogenèse de l'athérosclérose (Valkonen et al. 2001), et sa concentration plasmatique augmente avec l'âge chez l'humain (Kielstein et al.

2003). Toutefois, son rôle dans la relaxation dépendante de l'endothélium n'est pas clair: alors que certaines études voient un lien entre l'ADMA et la dysfonction endothéliale avec l'âge (Xiong et al. 2001), d'autres ne le confirment pas (Gates et al. 2007).

Bien que la voie du NO soit majeure dans les processus de la relaxation dépendant de l'endothélium, c'est l'équilibre final entre les différents EDRF et EDCF qui dicte la réponse dilatatrice.

1.2.3.2 Débalancement des EDRF et EDCF

La relaxation dépendante de l'endothélium est la résultante d'un équilibre entre les EDRF et les EDCF (section 1.1). Avec l'âge, la contribution des EDCF augmente, ce qui altère la réponse à l'acétylcholine (Koga et al. 1989; Heymes et al. 2000; Shi et al. 2008; Tang et al. 2008). Cependant, une hausse de production des EDRF peut temporairement retarder la diminution de la fonction endothéliale (Figure 6). Par exemple, une production plus grande de la PGI₂ via la COX2 dans les artères rénales des souris dyslipidémiques permet de compenser pour la diminution de NO (Gendron et al. 2007b). Dans les artères fémorales de souris, la dyslipidémie accélère l'expression de la composante EDHF qui favorise paradoxalement une relaxation dépendante de l'endothélium plus élevée comparée à des souris WT (Krummen et al. 2005). Cependant, cette hausse compensatoire de l'EDHF n'est que transitoire et elle disparaît avec l'âge en association avec une hausse du stress oxydant (Krummen et al. 2006), et potentiellement avec une augmentation de la quantité des EDCF produits (Drouin et al. 2011b).

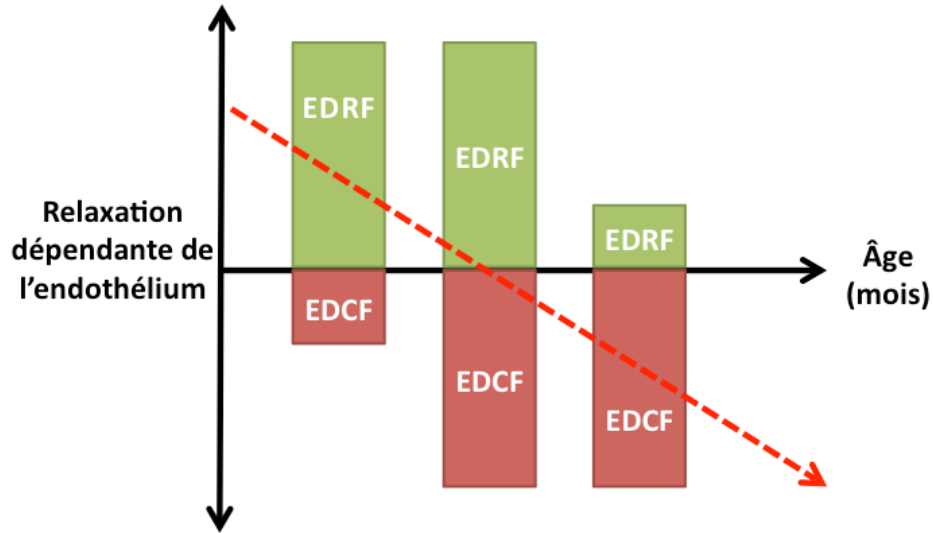


Figure 6 La contribution des EDRF et des EDCF varie avec l'âge des souris

Avec l'âge, la proportion relative des EDRF et des EDCF change et ultimement la relaxation dépendante de l'endothélium diminue (représentée par la ligne pointillée rouge).

Une hausse de l'expression des COX1 et 2 dans les artères pourrait expliquer la diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium avec l'âge (Matz et al. 2000; Shi et al. 2008; Tang et al. 2008). Par exemple, l'expression protéique de COX1, plutôt associée à la production de TXA_2 (Feletou 2011a), est augmentée dans les artères fémorales (Shi et al. 2008) et les aortes (Matz et al. 2000; Tang et al. 2008) de rats âgés. L'inhibition non-spécifique des COX avec l'indométacine permet d'améliorer la relaxation dépendante de l'endothélium dans les aortes de rats SHR (Koga et al. 1989) et des artères fémorales de rats âgés (Shi et al. 2008). La $PGF_{2\alpha}$ produite par la COX2 est également responsable de la contraction des aortes de hamsters âgés via sa liaison au récepteur TP (Wong et al. 2009). Les COX ne sont évidemment pas la seule source de PG, une hausse avec l'âge dans les expressions de la TXS, PGD_2S , PGE_2S et PGF_2S dans les cellules endothéliales de rats suggèrent que plusieurs PG peuvent agir comme EDCF (Tang et al. 2008). Une hausse de la production du TXA_2 via la TXS et de la $PGF_{2\alpha}$ via la PGF_2S participerait à la diminution de la réponse à l'acétylcholine dans les aortes de rats âgés (Heymes et al. 2000). En effet, l'inhibition de la TXS par le CV-4151

restaure partiellement la hausse de la contractilité aortique observée chez les rats âgés (Koga et al. 1989) et l'antagonisme du récepteur TP avec le SQ-29548 (Heymes et al. 2000) ou le terutroban (Shi et al. 2008) améliore la relaxation dépendante de l'endothélium, respectivement dans les aortes et les artères fémorales de rats. Cette hausse de TXA₂ observée avec l'âge est associée à une augmentation de RS chez la souris (Gendron et al. 2007a; Drouin et al. 2011b). Chez les souris dyslipidémiques, la consommation chronique de l'antioxydant catéchine pendant 3 et 9 mois favorise, respectivement, la dilatation des artères rénales (Gendron et al. 2007a) et cérébrales (Drouin et al. 2011b). Ces améliorations de la fonction endothéliale sont associées à une diminution de la production de TXA₂ par les artères rénales (Gendron et al. 2007a) et par une diminution de l'expression de la TXS dans les artères cérébrales (Drouin et al. 2011b). De plus, les RS peuvent eux-mêmes agir comme EDCF, comme observé dans les artères fémorales de rats âgés (Shi et al. 2008).

L'inhibition de la signalisation de l'ET-1 et de l'AngII, tous deux des EDCF (sections 1.1.2.2 et 1.1.2.3), est aussi bénéfique pour la fonction endothéliale (Mancini et al. 1996; Van Guilder et al. 2007; Matsumoto et al. 2010). En effet, le flux sanguin mesuré dans l'avant-bras est amélioré chez des personnes âgées par la prise du BQ-123, un antagoniste sélectif du récepteur ET_A, suggérant une augmentation de la production d'ET-1 avec l'âge (Van Guilder et al. 2007). L'inhibition de l'ACE par le quinapril pendant 6 mois améliore la réponse à l'acétylcholine (mesurée par angiographie coronaire) dans les artères coronaires de patients coronariens normotendus (Mancini et al. 1996). La prise de losartan (antagoniste du récepteur AT₁) pendant 4 semaines dans un modèle de rats diabétiques renverse la dysfonction endothéliale observée dans les artères mésentériques (Matsumoto et al. 2010). Le losartan inhibe la production de PGI₂, PGE₂, PGF_{2α} et du TXA₂ tout en réduisant la production des anions superoxydes (Matsumoto et al. 2010). Ces données suggèrent donc un rôle pour l'ET-1 et l'AngII dans la dysfonction endothéliale observée avec l'âge ou les MCV.

En résumé, la proportion des EDCF tend à augmenter avec l'âge (Figure 6). Pendant une période non-définie, les EDRF compensent temporairement cette hausse de facteurs contractiles et permettent une relaxation «normale» des artères. Cependant, avec le

temps, la contribution des EDRF n'est plus en mesure de contrer les effets des EDCF et la relaxation dépendante de l'endothélium diminue.

1.2.3.3 Dysfonction des VSMC

La fonction dilatatrice des VSMC évaluée par une molécule donneur de NO, comme le SNP, est généralement peu affectée par l'âge (Csiszar et al. 2002; Durrant et al. 2009). Toutefois, certaines études ont montré une détérioration de la réponse dilatatrice indépendante de l'endothélium avec l'âge (Ishida et al. 2003; Al-Shaer et al. 2006). Par exemple, la réponse au SNP est diminuée chez les patients âgés comparativement aux jeunes patients (Al-Shaer et al. 2006). De même, le flux mesuré dans les artères coronaires induit par la papavérine (donneur de NO) est inversement corrélé avec l'âge des patients (Ishida et al. 2003). Quant à la réponse contractile des artères, elle ne semble pas affectée par l'âge (Matz et al. 2001; Ibarra et al. 2006). La contraction aortique maximale induite par la sérotonine est similaire chez les rats âgés de 9 ou de 70 semaines (Ibarra et al. 2006). La contraction maximale induite par le KCl (100 mM) ne varie pas dans les aortes de rats Wistar Kyoto et de rats SHR âgés de 9, 18, 36 et 72 semaines lorsque l'aorte est dénudée (Matz et al. 2001).

Les VSMC maintiennent généralement leur fonction avec l'âge. Celles-ci participent donc peu à la progression de la dysfonction vasculaire observée avec l'âge qui serait principalement attribuable à la dysfonction des cellules endothéliales.

1.2.3.4 L'inflammation

L'inflammation fait partie du processus de vieillissement vasculaire normal, car avec l'âge les niveaux de cytokines inflammatoires augmentent (Csiszar et al. 2003; Csiszar et al. 2004; Miles et al. 2008). Chez l'humain, les niveaux circulants de CRP et d'IL-6 corrélerent avec le risque d'évènements coronariens (Koenig et al. 1999; Ridker et al. 2002; Albert et al. 2003; Cesari et al. 2003; Cushman et al. 2005; Rodondi et al. 2010). Le risque relatif d'incidents cardiovasculaires est de 1,45 chez les personnes ayant une CRP plasmatique supérieure à 3,0 mg/L comparativement aux personnes avec moins de 1,0

mg/L dans le sang, et ce indépendamment de la présence de facteurs de risque cardiovasculaire (Cushman et al. 2005). Ridker et al. ont montré dans une cohorte de 28 000 femmes que le risque d'avoir un premier événement cardiovasculaire corrèle positivement avec la concentration plasmatique de CRP (le risque relatif est de 2,3 pour les femmes situées dans le quintile supérieur de la concentration de CRP plasmatique par rapport à celles du quintile inférieur) (Ridker et al. 2002). Pour l'IL-6, une étude clinique chez des patients en santé âgés entre 70 et 79 ans a montré qu'une concentration élevée d'IL-6 double le risque d'événements cardiovasculaires dans cette population (Cesari et al. 2003).

La hausse d'expression de NF- κ B qui est observée avec l'âge explique probablement en partie ce phénomène d'inflammation (Helenius et al. 1996; Sung et al. 2006; Zou et al. 2006; Donato et al. 2007; Ungvari et al. 2007; Donato et al. 2008). Le NF- κ B régule l'expression de plusieurs cytokines et autres gènes généralement délétères comme les molécules d'adhésion, la iNOS, la Nox et l'IL-6 (Manea et al. 2007; Csiszar et al. 2008b; Brasier 2010; Ungvari et al. 2010b). Le NF- κ B est activé entre autres par l'AngII, le facteur- α de nécrose tumorale (TNF- α , *tumor necrosis factor- α*) et les RS (Csiszar et al. 2008b; Brasier 2010; Ungvari et al. 2010b). La hausse d'expression de NF- κ B est associée à un profil athérogénique vasculaire qui peut être amélioré par son inhibition chez le rat, par la thiazolidinedione (un agoniste des récepteurs γ du peroxydase activé par la prolifération (ou PPAR- γ pour «*peroxisome proliferator-activated receptors*»)) (Sung et al. 2006), le dithiocarbamate de pyrrolidine (PDTC, *pyrrolidinedithiocarbamate*) (Ungvari et al. 2007) et le resvératrol (Ungvari et al. 2007). Chez la souris, le NF- κ B est plus activé dans les régions de l'aorte sujettes au développement de la plaque athérosclérotique (Hajra et al. 2000) et en présence du diabète (Gao et al. 2008). Une hausse de NF- κ B est aussi associée à l'augmentation du stress oxydant avec l'âge et affecte négativement la relaxation dépendante de l'endothélium dans les artères brachiales humaines (Donato et al. 2007; Donato et al. 2008), dans les carotides de singe Rhesus (Ungvari et al. 2011a) et dans les aortes de rats (Ungvari et al. 2011b).

Certains gènes activés par NF- κ B peuvent également altérer la relaxation dépendante de l'endothélium, comme le TNF- α qui est associé à la progression de l'athérosclérose chez les patients âgés (Bruunsgaard et al. 2000). Le TNF- α participerait à la dysfonction

endothéliale associée à l'inflammation puisque son antagonisme permet d'améliorer la relaxation dépendante de l'endothélium lors du vieillissement (Arenas et al. 2006; Csiszar et al. 2007a). En effet, l'utilisation d'etanercept a prévenu la dysfonction endothéliale observée avec l'âge dans les artères mésentériques (Arenas et al. 2006) et les carotides (Csiszar et al. 2007a) de rats.

L'activation de la iNOS par le NF- κ B aurait également un effet délétère sur la fonction endothéliale en augmentant la production de l'anion superoxyde et la quantité de peroxynitrites (El Assar et al. 2012). L'inhibition spécifique de la iNOS avec le 1400W dans les artères mésentériques humaines isolées protège contre la diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium observée avec l'âge (Rodriguez-Manas et al. 2009). Ainsi, la hausse de l'inflammation qui se développe avec l'âge, même en absence d'autres facteurs de risque, contribue à altérer le phénotype protecteur de l'endothélium.

En résumé, la théorie des radicaux libres de Harman n'explique pas à elle seule le pourquoi et le comment du vieillissement vasculaire. Le stress oxydant, en association avec l'inflammation chronique et une hausse de la production des EDCF altèrent globalement la fonction endothéliale (Lakatta 2003; Lakatta et al. 2003; Brandes et al. 2005; Cosentino et al. 2007; Versari et al. 2009a). La présence de facteurs de risque cardiovasculaire accélère la dysfonction endothéliale observée avec l'âge.

1.2.4 La dysfonction endothéliale est accélérée par les facteurs de risque cardiovasculaire

La hausse de stress oxydant et l'inflammation chronique présentes lors de la dysfonction endothéliale associée au processus de vieillissement sont aussi observées dans les MCV (Versari et al. 2009a). L'hypertension, par exemple, a été décrite comme pouvant accélérer le processus de vieillissement artériel, précipitant le développement de la dysfonction endothéliale (Versari et al. 2009a) (Figure 7). Les mécanismes cellulaires menant à la dysfonction endothéliale observés lors du vieillissement ou en présence de

facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'hypertension, le diabète et l'hypercholestérolémie sont très similaires.

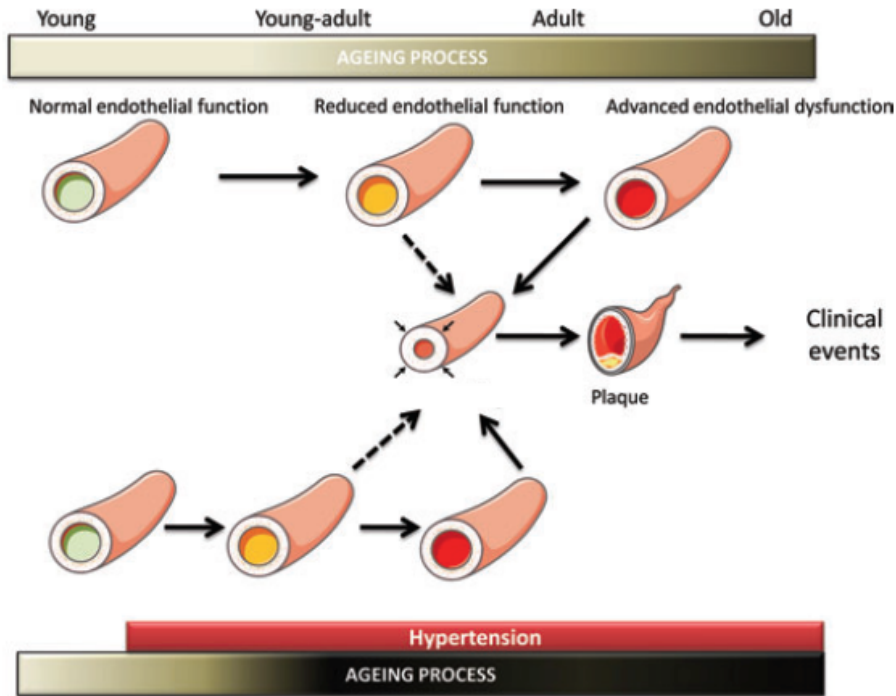


Figure 7 L'hypertension accélère le vieillissement artériel.

Réimprimé avec la permission de John Wiley and Sons : *Experimental Physiology*, Daniele Versari, Elena Daghini, Agostino Virdis, Lorenzo Ghiadoni, Stefano Taddei, The ageing endothelium, cardiovascular risk and disease in man, 94 (3) pp 317–321., Copyright (2009).

1.2.4.1 L'hypertension

L'étude de Taddei et *al.*, parue en 1997, suggère que l'hypertension accélère le vieillissement des artères (Taddei et al. 1997). En effet, la L-arginine améliore de façon similaire la relaxation dépendante de l'endothélium dans l'artère brachiale de jeunes patients hypertendus ou de patients âgés normotendus (Taddei et al. 1997). De plus, l'ajout d'indométacine améliore la relaxation dépendante de l'endothélium chez les

patients normotendus âgés et les patients hypertendus de tous les âges (Taddei et al. 1997). L'amélioration de la fonction endothéliale en présence de L-arginine ou d'indométacine suggère, respectivement, que la eNOS est dysfonctionnelle et qu'un EDCF produit par les COX altère de la même façon la relaxation dépendante de l'endothélium chez les patients âgés et chez les patients hypertendus jeunes (Taddei et al. 1997). Le stress vasculaire occasionné par l'hypertension semble donc accélérer le processus de vieillissement dans les artères.

Une étude animale parue en 1996 aide à mieux comprendre comment l'hypertension accélère le vieillissement vasculaire. L'infusion d'AngII chez le rat provoque une hausse de la pression artérielle et une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium aortique attribuable à la hausse de la production d'anions superoxydes (Rajagopalan et al. 1996). En effet, l'incubation des aortes isolées avec de la SOD encapsulée dans des liposomes restaure la relaxation dépendante de l'endothélium chez les rats hypertendus (Rajagopalan et al. 1996). De plus, la dénudation de l'endothélium diminue la production des anions superoxydes dans le groupe de rats hypertendus, suggérant que l'endothélium est directement impliqué dans la génération des anions superoxydes délétères pour la fonction endothéliale (Rajagopalan et al. 1996).

La Nox est aussi très importante dans la hausse de la production des anions superoxydes associée à l'hypertension. Chez les souris gp91phox^{-/-} dont les artères rénales ont été clippées pour provoquer une hypertension secondaire, la relaxation dépendante de l'endothélium de l'aorte en présence d'acétylcholine n'a pas été affectée 4 semaines après la chirurgie (Jung et al. 2004). L'hypertension induite par le clip rénal a provoqué une hausse de la pression artérielle inférieure d'environ 10 mmHg chez les souris gp91phox^{-/-} par rapport aux souris WT, et l'hypertension a diminué la relaxation dépendante de l'endothélium seulement dans les aortes des souris WT (Jung et al. 2004). L'ajout de SOD exogène ou l'inhibition spécifique de gp91phox par le peptide gp91ds-tat a permis de prévenir la hausse de stress oxydant et la diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium aortique chez les souris WT hypertendues, mais n'a eu aucun effet chez les souris gp91phox^{-/-} hypertendues (Jung et al. 2004). Dans le modèle de rats SHR, l'inhibition non-spécifique de la Nox par le dextrométhorphan a réduit la pression artérielle moyenne de 10% et a amélioré significativement la relaxation

dépendante de l'endothélium dans les aortes (Wu et al. 2012). Ainsi, la Nox semble une source importante de RS au cours de l'hypertension où elle participe à l'établissement de la dysfonction endothéliale.

La iNOS participerait aussi à la dysfonction endothéliale observée avec l'hypertension. La dilatation est diminuée chez les patients hypertendus, en association avec une hausse d'expression protéique de la iNOS dans la peau, sans changement dans les expressions de eNOS et de nNOS (Smith et al. 2011). L'inhibition de iNOS (par la perfusion de 1400W dans l'avant-bras) a amélioré la réponse locale cutanée à la chaleur (qui est dépendante du NO) des patients hypertendus au niveau observé chez les patients normotendus (Smith et al. 2011). De même, l'utilisation pendant 11 semaines chez le rat SHR de l'aminoguanidine, un inhibiteur spécifique de la iNOS, a prévenu le développement de l'hypertension et la dysfonction endothéliale en diminuant la production d'anions superoxydes et de peroxy-nitrites dans l'aorte (Hong et al. 2000).

Une hausse de production des EDCF dérivés des COX participe également à la dysfonction endothéliale observée dans l'aorte de rats SHR (Luscher et al. 1986; Koga et al. 1989; Yang et al. 2004a; Alvarez et al. 2005). La présence d'indométacine (Luscher et al. 1986; Koga et al. 1989; Yang et al. 2004a; Alvarez et al. 2005) et l'utilisation d'un antagoniste du récepteur TP (le S18886 ou le SQ29548) (Yang et al. 2004a; Alvarez et al. 2005) préviennent la diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium dans les aortes isolées de rats SHR. Toutefois, l'utilisation du furegrelate (inhibiteur de la TXS) n'améliore pas la relaxation dépendante de l'endothélium (Alvarez et al. 2005). Il semble que le ou les prostanoïdes produits par les COX agissent via le récepteur TP, et que la PGI₂ pourrait être la molécule en cause. En effet, l'expression de la COX2 et la quantité de PGI₂ sont augmentées dans les artères mésentériques des rats SHR (Viridis et al. 2009b), en association avec une hausse d'expression de la PGI₂S dans les aortes des rats SHR (Tang et al. 2008). La PGI₂ produite viendrait lier le récepteur TP et provoquer la constriction des aortes chez le rat SHR (Tang et al. 2008). L'inhibition spécifique de la COX2 améliore la relaxation dépendante de l'endothélium au même niveau que l'antagonisme du récepteur TP dans les artères mésentériques des rats SHR (Viridis et al. 2009b). Ces données ont été confirmées dans les aortes de rats hypertendus (hypertension induite par le L-NAME) où l'inhibition spécifique de la COX2 et du

récepteur TP améliorent aussi la relaxation dépendante de l'endothélium (Qu et al. 2010). Ainsi, la COX2 produirait des prostanoides, vraisemblablement la PGI₂, qui agirait comme EDCF via le récepteur TP.

Il est intéressant de noter chez le rat que le traitement de l'hypertension par le losartan, un antagoniste du récepteur AT1, empêche la dysfonction endothéliale induite par l'AngII dans les aortes (Rajagopalan et al. 1996). En revanche, la prise d'atorvastatine chez le rat SHR maintient l'hypertension, mais prévient la dysfonction endothéliale en diminuant le stress oxydant (Virdis et al. 2009b). De plus, bien que le diurétique hydrochlorothiazide a un effet hypotenseur chez le rat hypertendu SHR prompt aux accidents vasculaires-cérébraux (ou «*salt-loaded stroke-prone SHR*»), il n'améliore pas la fonction endothéliale aortique, ne diminue pas la production des anions superoxydes ou n'augmente pas la phosphorylation de la eNOS comme le fait l'antagoniste du récepteur AT1 olmésartan (Yamamoto et al. 2012). Il semble donc que la diminution de la pression artérielle ne soit bénéfique sur la fonction endothéliale que si elle est accompagnée d'une diminution du stress oxydant.

1.2.4.2 Le diabète

Le diabète est associé à une hausse du stress oxydant, ce qui coïncide avec la dysfonction endothéliale observée chez les patients diabétiques (Stehouwer et al. 1992; Hogikyan et al. 1998; Vehkavaara et al. 1999) et chez les rongeurs diabétiques (Wang et al. 1993; Taylor et al. 1994; Matsumoto et al. 2007a; Matsumoto et al. 2007b; Gao et al. 2008; Riad et al. 2008; Matsumoto et al. 2009c; Cheang et al. 2011; Youn et al. 2012; Sukumar et al. 2013). La réponse à l'infusion d'acétylcholine dans les artères brachiales de patients diabétiques est réduite d'environ 50% comparée à des patients non-diabétiques, et cette altération de la relaxation dépendante de l'endothélium est indépendante de l'obésité (Hogikyan et al. 1998). Le diabète n'a pas besoin d'être diagnostiqué pour altérer la fonction endothéliale: l'étude du flux sanguin de l'artère brachiale suite à une infusion d'acétylcholine a démontré une réponse réduite d'environ 38% chez les patients avec une glycémie à jeun élevée (6,5 mmol/L vs 5,6 mmol/L pour les contrôles) sans aucun autre facteur de risque cardiovasculaire (Vehkavaara et al. 1999). L'hyperglycémie serait donc un médiateur important dans la dysfonction

endothéliale. En effet, la prise chronique d'insuline (injections ou pompe implantée) chez des rats diabétiques améliore la relaxation dépendante de l'endothélium dans les artères mésentériques suite à la diminution de la glycémie (Taylor et al. 1994). L'excès de glucose plasmatique provoque la glycation avancée des séquences terminales des protéines (AGE, *advanced glycation end products*) qui augmente le stress oxydant et favorise la dysfonction endothéliale et la progression de l'athérosclérose dans le diabète (Hadi et al. 2007). L'inhibition de la voie du récepteur des AGE (RAGE) avec une forme soluble du RAGE (sRAGE) prévient la dysfonction endothéliale des artères coronaires, la hausse de l'inflammation et du stress oxydant observés chez des souris *db/db* (Gao et al. 2008). L'utilisation du tempol, un analogue de la SOD, empêche la hausse d'expression des RAGE chez des souris *db/db* (Gao et al. 2008). La restauration de la fonction endothéliale des artères coronaires des souris *db/db* avec le sRAGE pourrait s'expliquer par la diminution de l'activité et de l'expression des sous-unités gp91phox, p22phox et p40phox de la Nox2 (Gao et al. 2008). L'utilisation du sRAGE réduit aussi les expressions protéiques de TNF- α et de NF- κ B, suggérant un rôle de l'inflammation et du stress oxydant dans la dysfonction endothéliale associée au diabète (Gao et al. 2008).

Comme décrit précédemment, le NO est très sensible à la présence des anions superoxydes. Une hausse de production d'anions superoxydes est rapportée dans les aortes des souris injectées à la streptozotocine (diabète de type 1) (Youn et al. 2012), dans les artères basilaires de rats spontanément diabétiques (diabète de type 2) (Matsumoto et al. 2007b) et dans les aortes de souris résistantes à l'insuline (Sukumar et al. 2013). La sous-unité de Nox2 responsable de la surproduction des anions superoxydes pourrait varier selon la progression du diabète, l'artère et l'espèce. Dans les souris diabétiques de type 1, la p47phox semble majeure (Youn et al. 2012), tandis que la gp91phox serait responsable de la surproduction des anions superoxydes dans les artères basilaires des rats diabétiques de type 2 (Matsumoto et al. 2007b) et dans les aortes de souris résistantes à l'insuline (Sukumar et al. 2013). Cette hausse de la production des anions superoxydes vient altérer le métabolisme du NO et la relaxation des artères. L'incubation des artères basilaires isolées de rats diabétiques avec l'apocynine, la SOD ou le tempol permet de maintenir la relaxation dépendante de l'endothélium au niveau des rats contrôles (Matsumoto et al. 2007b), démontrant encore

une fois la sensibilité des processus de relaxation dépendante de l'endothélium face à l'anion superoxyde.

L'augmentation de l'expression de la eNOS par l'AVE3085, une molécule stimulant la transcription de la eNOS, peut protéger la fonction endothéliale des aortes, des artères rénales et des artères mésentériques isolées des souris diabétiques *db/db* (Cheang et al. 2011). La prise d'AVE3085 prévient aussi la hausse de RS induite par la concentration élevée de glucose dans les aortes des souris contrôles, préservant ainsi la relaxation dépendante de l'endothélium (Cheang et al. 2011). L'utilisation de l'AVE3085 chez des rats diabétiques (après l'injection de streptozotocine) a aussi amélioré la relaxation dépendante de l'endothélium dans l'aorte, en plus de réduire les peroxy-nitrites et l'expression de la iNOS dans un homogénat de quadriceps (Riad et al. 2008). Bien qu'une hausse d'expression de la eNOS puisse augmenter la production de RS via son découplage (van der Loo et al. 2000; Brandes et al. 2005), l'utilisation de l'AVE3085 a prévenu la hausse d'anions superoxydes et de RS dans les aortes des souris diabétiques (Cheang et al. 2011). Ainsi, la biodisponibilité du NO demeure un facteur important dans la relaxation dépendante de l'endothélium des rongeurs diabétiques.

Le débalancement dans la production des EDRF et des EDCF est aussi observée dans le contexte du diabète: alors que la contribution du NO et de l'EDHF dans la relaxation dépendante de l'endothélium est diminuée dans les artères mésentériques de rats diabétiques, une plus grande proportion d'EDCF (TXA₂ et PGE₂) découlant de la hausse des expressions des COX1 et 2 participe à la dysfonction endothéliale chez des rats diabétiques (Matsumoto et al. 2007a). La prise chronique d'ozagrel, un inhibiteur de la TXS, a pour effet de prévenir la dysfonction endothéliale dans les artères mésentériques, sans pour autant renverser les effets métaboliques (hyperinsulinémie, hyperglycémie, hypertriglycéridémie, hypertension) observés chez les rats diabétiques (Matsumoto et al. 2009c). Cette hausse de production des EDCF est aussi associée à une hausse d'activité du NF-κB (Matsumoto et al. 2009a). Son inhibition par le PDTC provoque en effet une diminution de la production des EDCF (TXA₂ et PGE₂) pour favoriser un profil vasculaire plus sain dans les artères mésentériques de rats diabétiques (Matsumoto et al. 2009a).

En résumé, le diabète constitue un facteur de risque cardiovasculaire important et son développement accélère le vieillissement vasculaire. La hausse du stress oxydant et le déséquilibre du ratio EDRF/EDCF participent grandement à la dysfonction endothéliale associée au diabète.

1.2.4.3 La dyslipidémie

Chez des patients hypercholestérolémiques, la relaxation dépendante de l'endothélium induite par l'infusion de métagoline dans l'artère brachiale est diminuée d'environ 25% par rapport à celle observée chez des sujets contrôles (Creager et al. 1990). Des patients ayant des niveaux circulants de cholestérol total et de LDL supérieurs à la normale voient leur sensibilité à la sérotonine (mesure de la relaxation dépendante de l'endothélium) réduite par rapport aux sujets sains, sans modification de la réponse au SNP (Stroes et al. 1995). Le traitement de l'hypercholestérolémie par des statines (Egashira et al. 1994; Treasure et al. 1995), la cholestyramine (une résine) (Leung et al. 1993) ou la combinaison des 2 (Anderson et al. 1995) a un effet bénéfique sur la relaxation dépendante de l'endothélium des patients dyslipidémiques. La prise de lovastatine pendant 5,5 mois a amélioré la réponse à l'acétylcholine dans les artères coronaires de 11 patients hypercholestérolémiques comparativement à celle mesurée chez 12 contrôles n'ayant modifié que leur diète, et chez qui la réponse à l'acétylcholine est restée inchangée (Treasure et al. 1995). La capacité des statines à activer l'expression de la eNOS et à diminuer le stress oxydant (Wolfrum et al. 2003) soulève toutefois une question: l'amélioration de la relaxation dépendante de l'endothélium avec les statines provient-elle de leur effet hypolipidémiant ou d'un effet direct sur l'endothélium? L'utilisation de l'ézétimibe, un hypocholestérolémiant qui inhibe l'absorption du cholestérol (Garcia-Calvo et al. 2005), donne une preuve supplémentaire que la diminution du cholestérol améliore la relaxation dépendante de l'endothélium (Grigore et al. 2013). L'ézétimibe et la pravastatine ont individuellement amélioré la relaxation dépendante de l'endothélium des artères brachiales de patients hypercholestérolémiques suite à une diminution similaire de 20% des LDL circulants (Grigore et al. 2013). Ainsi, la réduction de la cholestérolémie chez l'humain préserve la fonction endothéliale.

Tout comme chez les humains, l'hypercholestérolémie diminue la relaxation dépendante de l'endothélium dans les modèles animaux. Une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium est observée chez des souris dyslipidémiques dans les aortes (Gendron et al. 2010), les artères fémorales (Krummen et al. 2006), les artères rénales (Gendron et al. 2007b; Gendron et al. 2010) et les artères cérébrales (Bolduc et al. 2011; Drouin et al. 2011a; Drouin et al. 2011b; Bolduc et al. 2012). La sévérité de la dyslipidémie accélère la dysfonction endothéliale. En effet, la dilatation des artères rénales de souris C57Bl/6 qui surexpriment l'apoB humaine (hApoB^{+/+}) est réduite à l'âge de 6 mois (Gendron et al. 2007b), alors que chez des souris LDLR^{-/-}; hApoB^{+/+} qui ont une dyslipidémie plus sévère, la dysfonction endothéliale de l'artère rénale apparaît dès l'âge de 3 mois (Gendron et al. 2010). L'hypercholestérolémie, comme les autres facteurs de risque cardiovasculaire, accélère donc le vieillissement vasculaire. La dyslipidémie sévère des souris LDLR^{-/-}; hApoB^{+/+} accélère la dysfonction endothéliale dans les artères cérébrales, en altérant la voie de la eNOS, en stimulant la production du TXA₂ et en augmentant le stress oxydant dès l'âge de 3 mois, affectant la fonction endothéliale à un niveau similaire à celui normalement observé chez les souris WT âgées de 12 mois (Drouin et al. 2011b). Chez des souris LDLR^{-/-}; hApoB^{+/+} âgées de 12 mois, la fonction endothéliale est encore plus détériorée que chez les souris WT du même âge, et la consommation chronique de l'antioxydant catéchine ralentit le développement de la dysfonction endothéliale (Drouin et al. 2011b). Chez les souris apoE^{-/-}, une hausse de production d'anions superoxydes et une expression accrue de gp91phox sont observées dans l'aorte alors que chez les souris apoE^{-/-}/gp91phox^{-/-} la plaque est diminuée, il y a 75% moins d'anions superoxydes et une hausse significative de la quantité de NO biodisponible (Judkins et al. 2010). Ainsi, la Nox2 jouerait un rôle important dans la dysfonction endothéliale causée par la dyslipidémie.

D'autre part, une altération dans le métabolisme du NO produit par la eNOS est observée en présence de dyslipidémie. En effet, l'inhibition de la eNOS par le N^G-méthyl-L-arginine (ou L-NMMA) améliore paradoxalement la relaxation dépendante de l'endothélium dans l'artère brachiale chez des patients hypercholestérolémiques, suggérant que la eNOS est découplée en présence de dyslipidémie (Stroes et al. 1995). De même, l'infusion de BH₄ améliore la relaxation dépendante de l'endothélium chez des patients hypercholestérolémiques, mais pas chez des patients contrôles (Stroes et al.

1995). De plus, la supplémentation en sepiapterin, un précurseur du BH₄, améliore la relaxation dépendante de l'endothélium de souris nourries avec une diète riche en gras (Miller et al. 2013), démontrant une altération de la fonction de la eNOS en présence de dyslipidémie.

Les LDL sont également l'une des cibles du stress oxydant et les oxLDL ont un effet néfaste sur l'endothélium. L'incubation de cellules endothéliales aortiques bovines en culture avec des oxLDL à concentration égale aux LDL natifs provoque une diminution de la quantité de PGI₂ et du NO et une hausse de la production des anions superoxydes (Liao 1994; Thorin et al. 1994; Vergnani et al. 2000). L'ajout de L-NAME amenuise les effets délétères des LDL natifs et des oxLDL sur le découplage de la eNOS, démontrant la susceptibilité des cellules endothéliales et de la voie du NO à l'hypercholestérolémie (Vergnani et al. 2000).

Finalement, une production accrue des EDCF est aussi observée en présence d'hypercholestérolémie. La production d'EDCF par les COX semble importante puisque l'incubation d'aortes isolées de lapins hypercholestérolémiques avec l'indométacine améliore la relaxation dépendante de l'endothélium (Jerez et al. 2008). Dans un modèle de lapin ayant une déficience naturelle dans le récepteur TP, une diète riche en cholestérol pendant 3 semaines n'affecte pas la relaxation dépendante de l'endothélium dans l'aorte, contrairement aux lapins contrôles (Pfister 2006). La contribution accrue du TXA₂ semble responsable, du moins en partie, de la diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium observée dans des artères cérébrales de souris dyslipidémiques par rapport aux souris WT (Drouin et al. 2011b). L'ajout d'indométacine et de furegrelate dans le bain isolé a en effet amélioré la relaxation des artères cérébrales des souris dyslipidémiques, mais pas celle des souris WT (Drouin et al. 2011b).

En conclusion, l'hypertension, le diabète et la dyslipidémie altèrent la fonction endothéliale en accélérant le vieillissement vasculaire. Une hausse du stress oxydant, une altération du métabolisme du NO et un déséquilibre du ratio EDRF/EDCF participent à la diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium. Il est cependant

possible d'intervenir pour ralentir la progression des MCV, afin de maintenir plus longtemps une bonne santé vasculaire.

1.3 Peut-on ralentir le vieillissement vasculaire?

Certaines interventions pharmacologiques peuvent améliorer la fonction endothéliale associées au vieillissement vasculaire, combinées ou non aux MCV. Par exemple, certains antihypertenseurs (Mancini et al. 1996; Modena et al. 2002) ou la prise de statines améliorent la relaxation dépendante de l'endothélium (Wagner et al. 2000; Beckman et al. 2004; Sen-Banerjee et al. 2005), tout en traitant en premier lieu respectivement l'hypertension et l'hypercholestérolémie. Cependant, ces traitements sont initiés lorsque les MCV sont déjà établies et la dysfonction endothéliale est difficilement réversible. Il existe néanmoins des moyens non-pharmacologiques qui peuvent être initiés en prévention primaire et s'intégrer au quotidien, comme l'exercice physique (section 1.3.1), une saine alimentation (section 1.3.2), ou des moyens plus drastiques tels que la restriction calorique (section 1.3.3).

1.3.1 L'exercice

La pratique de l'exercice régulier est fortement encouragée par les agences de santé publique Canadiennes (Société canadienne de physiologie de l'exercice 2012) et Américaines (Physical Activity Guidelines Advisory Committee and the Physical Activity Guidelines writing group 2008). L'exercice permet de diminuer le risque de mortalité (section 1.3.1.1) et de prévenir le développement de virtuellement toutes les pathologies, ce qui explique les efforts gouvernementaux pour la promotion de la pratique régulière d'une activité physique. La fonction vasculaire bénéficie également des effets de l'exercice. Ainsi, la pratique régulière de l'exercice permet de ralentir la dysfonction endothéliale causée par le vieillissement et les MCV (section 1.3.1.2).

1.3.1.1 L'exercice diminue le risque de mortalité

Le bénéfice principal de l'exercice est simple: il diminue significativement tout risque de mortalité chez les personnes saines et malades (Blair et al. 1995; Chakravarty et al. 2008; Nocon et al. 2008). Une revue systématique de 33 études incluant près de 900 000 participants a conclu que l'exercice diminue de 35% la mortalité associée aux MCV, et de 33% pour toutes les causes confondues (Nocon et al. 2008). Une étude longitudinale sur 21 ans réalisée en Californie, a montré que les membres d'un club de course à pied avaient un risque relatif («*hazard ratio*») de mortalité et de morbidité de 0,6 comparativement à des personnes sédentaires (Chakravarty et al. 2008). Dans une autre étude, le risque de mortalité toutes causes confondues des sujets ayant participé à un programme d'exercice physique était 44% plus faible au bout de cinq ans comparativement aux sujets étant restés sédentaires (Blair et al. 1995). De plus, les enfants et adolescents qui sont physiquement actifs dans une journée ont un meilleur profil métabolique (pression systolique, tour de taille, insulinémie, niveau de lipoprotéines de haute densité (HDL) et triglycérides) (Ekelund et al. 2012). Ces études cliniques démontrent que l'exercice est bénéfique à tous les âges.

L'exercice permet d'activer les fonctions du système immunitaire. Ainsi, la pratique de la course diminue de 20 fois le risque de mourir d'une infection pulmonaire (Chakravarty et al. 2008). L'exercice induit une hausse de l'activité des cellules protectrices «*natural killers NK*» (Nieman et al. 1993; Woods et al. 1999), en plus de diminuer les concentrations plasmatiques de CRP et d'IL-6 qui réduisent la fonction immunitaire (Mattusch et al. 2000; Colbert et al. 2004; Lee et al. 2011). D'autre part, la prévention de l'activation du NF- κ B par l'activité physique pourrait expliquer la protection face à l'inflammation (Pierce et al. 2011). Un entraînement de 12 semaines sur tapis roulant chez des rats hyperphagiques diabétiques a permis d'augmenter de 130% la sécrétion par le tissu adipeux d'IL-10 qui est bénéfique (Tedgui et al. 2006), et de ramener le niveau circulant d'IL-6, qui est délétère, à celui des rats sains (Jenkins et al. 2012). De plus, l'exercice confère une résistance au stress: une séance de vélo de 2,5 heures prévient la hausse de TNF- α dans le sang suite à une injection de *E. coli* chez l'humain (Starkie et al. 2003).

L'exercice diminue le risque d'accident vasculaire cérébral (Lee et al. 2003; Wendel-Vos et al. 2004), maintient les fonctions cognitives (Laurin et al. 2001; Colcombe et al. 2003; Rovio et al. 2005; Jedrzejewski et al. 2010) et prévient la démence (Aarsland et al. 2010). Ces bénéfices de l'exercice s'expliqueraient par une hausse de la relaxation dépendante de l'endothélium (Mayhan et al. 2004; Mayhan et al. 2011), une compliance adéquate des artères cérébrales et carotides (Tanaka et al. 2000; Bolduc et al. 2011), un débit sanguin cérébral de base augmenté (Endres et al. 2003) et une meilleure capacité de récupération des fonctions cérébrales suite à une ischémie (Gertz et al. 2006). Toutes ces fonctions bénéfiques de l'exercice contribuent à réduire le risque de mortalité.

1.3.1.2 L'exercice réduit la dysfonction endothéliale

L'un des bénéfices cardiovasculaires majeurs de l'exercice est la protection de la fonction endothéliale (Taddei et al. 2000). Non seulement l'exercice en prévention primaire prévient l'altération de la relaxation dépendante de l'endothélium au cours du vieillissement (Taddei et al. 2000), mais il permet aussi chez les sujets âgés d'atteindre des relaxations d'amplitudes similaires à celles observées chez les sujets jeunes (DeSouza et al. 2000). Alors que la sédentarité diminue la fonction endothéliale (Chen et al. 2001; De Moraes et al. 2004; Laufs et al. 2005; Hamburg et al. 2007; Navasolava et al. 2010), l'introduction de l'exercice renverse cette dysfonction chez les souris sédentaires (Suvorava et al. 2004). L'exercice permet également de renverser la dysfonction endothéliale observée avec l'hypertension (Yen et al. 1995; Roque et al. 2012), le diabète (Bunker et al. 2010), le vieillissement (Durrant et al. 2009) et l'obésité (Park et al. 2012). L'exercice favorise une hausse de l'expression ou de la phosphorylation de la eNOS dans le cœur (Park et al. 2012), l'aorte (Laufs et al. 2005; Durrant et al. 2009) et les cellules endothéliales isolées de l'aorte (Bunker et al. 2010) chez la souris, ce qui permet d'augmenter la production de NO et de favoriser la relaxation dépendante de l'endothélium. L'exercice pourrait aussi favoriser la production d'EDHF pour permettre une meilleure relaxation dépendante de l'endothélium dans les aortes et les artères mésentériques de rats (Yen et al. 1995; Chen et al. 2001). Les bienfaits de l'exercice peuvent être attribuables, du moins en partie, à l'activation de la Sirt-1 (Suwa et al. 2008; Bayod et al. 2012), qui active la eNOS par sa déacétylation et ainsi améliore la relaxation dépendante de l'endothélium (Mattagajasingh et al. 2007).

1.3.1.2.1 L'exercice augmente les forces de cisaillement

Durant l'exercice, la hausse du métabolisme et la demande accrue en oxygène provoquent une hausse du flux sanguin (Padilla et al. 2011). La hausse des forces de cisaillement engendrée stimule l'expression de la eNOS *in vivo* (Nadaud et al. 1996) et *in vitro* (Uematsu et al. 1995), ce qui induit une production accrue d'EDRF (Frangos et al. 1985; Rubanyi et al. 1986). Il a été démontré que la pratique du vélo améliore la relaxation dépendante de l'endothélium mesurée dans l'artère brachiale et que cette amélioration pouvait être bloquée par le port d'un manchon autour du bras empêchant la hausse des forces de cisaillement associées à l'exercice (Tinken et al. 2009).

1.3.1.2.2 L'exercice diminue le stress oxydant

Alors que pendant l'exercice des RS sont produits, l'exercice diminue à long terme la production des RS vasculaires, principalement l'anion superoxyde originant de la Nox (Laufs et al. 2005; Durrant et al. 2009; Pierce et al. 2011; Park et al. 2012). Par exemple, la course (en prévention primaire) prévient les hausses de l'expression et de l'activité de la Nox observées avec l'âge dans les aortes de souris (Durrant et al. 2009) ou suite à une diète riche en gras dans les artères coronaires (Park et al. 2012). De même, l'exercice diminue l'expression protéique de la Nox dans les artères brachiales de patients âgés (Pierce et al. 2011). Une hausse d'expression des enzymes antioxydantes est également observée suite à l'exercice dans divers tissus (Leeuwenburgh et al. 1999; Durrant et al. 2009; Pierce et al. 2011; Park et al. 2012; Teodoro et al. 2012). La SOD est l'enzyme antioxydante dont l'expression protéique est la plus fréquemment augmentée par l'exercice, comme observé dans les artères coronaires (Park et al. 2012) et les aortes (Durrant et al. 2009) de souris et les artères brachiales humaines (Pierce et al. 2011). D'autres études ont démontré une augmentation de l'activité de la SOD et de la GPx dans le muscle de rats (Leeuwenburgh et al. 1999) et de la SOD et de la catalase dans le foie de souris (Teodoro et al. 2012). Toutefois, plusieurs études n'ont rapporté aucun effet bénéfique de l'exercice sur les enzymes antioxydantes (Filaire et al. 2009; Bunker et al. 2010; Bayod et al. 2012). Chez le rat par exemple, la course n'a pas modifié l'expression protéique de la SOD dans les aortes (Bunker et al. 2010), ni les

activités de la SOD et de la catalase dans le foie et le muscle (Filaire et al. 2009; Bayod et al. 2012). Bien que l'impact de l'exercice sur les expressions de la Nox et des enzymes antioxydantes varie selon les études, ces dernières ont en commun une diminution des dommages oxydants et une hausse de la biodisponibilité du NO (Durrant et al. 2009; Filaire et al. 2009; Bunker et al. 2010; Pierce et al. 2011; Bayod et al. 2012). L'exercice permet également de protéger le BH₄ de l'oxydation par l'anion superoxyde puisque l'administration de BH₄ améliore la relaxation dépendante de l'endothélium chez les sujets sédentaires et non chez ceux qui pratiquent l'exercice (Eskurza et al. 2005).

1.3.1.3 Différents types d'exercice : différents effets vasculaires

Il est important de mentionner que des séances d'exercice d'intensité et de durée modérées sont généralement utilisées dans les études et que les effets d'un entraînement plus extrême (comme les ultra-marathons) demeurent incertains. Alors qu'un régime modéré de course pendant 6 semaines chez des souris âgées a amélioré le profil des gènes antioxydants activés par la voie Nrf2 / ARE dans le cœur, deux journées d'exercice intense (intensité et durée doublées) préviennent cette amélioration, suggérant que l'exercice intense est moins bénéfique (Gounder et al. 2012). Toutefois, bien que certaines études démontrent suite à un exercice intense (courses de 50 km et plus, «*ironman*») une hausse des dommages lipidiques (Kanter et al. 1988; Mastaloudis et al. 2001) ou une susceptibilité accrue d'oxydation des LDL (Sanchez-Quesada et al. 1995), d'autres ne montrent aucun effet délétère (Ginsburg et al. 1996; Margaritis et al. 1997). De plus, le type d'exercice (endurance versus intervalle) affecte différemment la relaxation dépendante de l'endothélium. Dans un groupe de 27 patients défailants cardiaques, l'exercice par intervalle pendant 12 semaines a amélioré la dilation induite par le flux dans les artères brachiales, a augmenté la capacité antioxydante plasmatique et a réduit la quantité de oxLDL en circulation par rapport à l'exercice en continu (Wisloff et al. 2007). Suite à un programme par intervalle de 6 mois chez 40 patients coronariens, la dilatation induite par le flux a augmenté significativement d'environ 5% et leur CRP plasmatique a diminué par rapport aux patients non-entraînés (Munk et al. 2009). Chez des patients angineux stables, un programme d'exercice par intervalle d'intensité élevée de 6 mois a aussi provoqué la diminution des niveaux circulants d'IL-6 (Munk et al. 2011). La réduction de l'inflammation et du stress oxydant observée participe

probablement à l'amélioration de la fonction endothéliale observée chez les patients coronariens (Wisloff et al. 2007; Munk et al. 2009; Munk et al. 2011). Bien que les bénéfices puissent varier selon le type, l'intensité ou la durée de l'exercice, il n'en demeure pas moins que l'exercice ralentit les mécanismes qui mènent au vieillissement et au développement des maladies qui lui sont associées (Figure 8).

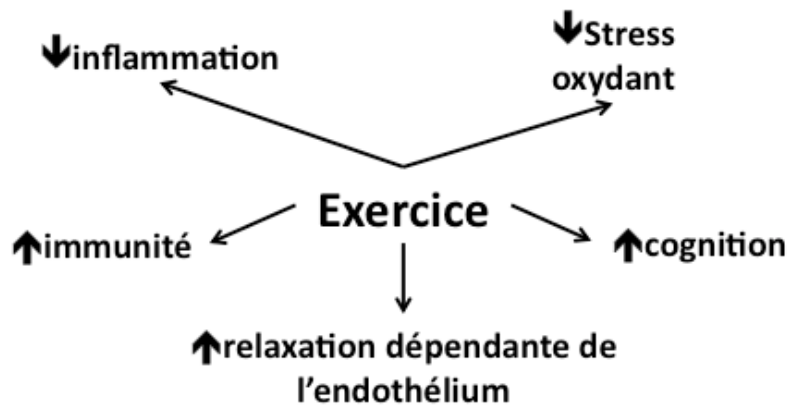


Figure 8 L'exercice provoque des effets systémiques prévenant le développement des MCV.

Les bienfaits de l'exercice sont systémiques et permettent de diminuer la dysfonction endothéliale induite par la sédentarité et le vieillissement en prévention primaire. Il demeure incertain jusqu'à quel niveau de dommages l'exercice pourrait améliorer la fonction endothéliale de patients âgés ou souffrant de MCV lorsqu'instauré en prévention secondaire, ou même si les bienfaits de l'exercice perdurent lorsque le programme d'exercice physique est interrompu. Il convient donc de considérer d'autres alternatives qui, seules ou combinées à l'exercice, ont elles aussi le potentiel de retarder le développement de la dysfonction endothéliale associée au vieillissement et aux MCV.

1.3.2 La nutrition et les antioxydants

Hippocrate aurait dit «*que ta nourriture soit ta médecine, et ta médecine soit ta nourriture*». Cette phrase illustre qu'une saine alimentation permet de prévenir le développement de pathologies. Une alimentation équilibrée permet d'avoir accès à une

variété de micronutriments bénéfiques, comme les antioxydants et les acides gras oméga-3.

1.3.2.1 Les antioxydants et la mortalité

Au début des années 90, des études épidémiologiques ont initialement montré que le risque de mortalité associée à une MCV était inversement proportionnel à la consommation d'antioxydants dans la nourriture (Rimm et al. 1993; Stampfer et al. 1993; Knekt et al. 1994; Hertog et al. 1995; Kushi et al. 1996; Klipstein-Grobusch et al. 1999; Todd et al. 1999; Ye et al. 2008). D'autre part, des études pré-cliniques ont démontré les bénéfices de compléter la diète avec des antioxydants: le resvératrol prolonge l'espérance de vie de souris nourries avec une diète riche en gras (Baur et al. 2006) et le N-acétyl-cystéine évite la mort prématurée dans un modèle de souris prompt à la tumorigenèse (Sablina et al. 2005). Toutefois, les résultats des études interventionnelles ont été très décevants. La prise de vitamine E et C ou de β -carotène en traitement primaire ou secondaire n'a eu aucun effet sur la mortalité autant chez les patients sains que chez ceux atteints de MCV (Stephens et al. 1996; 2002; Vivekananthan et al. 2003; Kris-Etherton et al. 2004). Une diète enrichie en vitamine E (≥ 400 unités internationales) a même augmenté le risque de mortalité chez des patients souffrant de maladies chroniques (MCV ou diabète par exemple) (Lonn et al. 2005; Miller et al. 2005).

À l'inverse, la diète méditerranéenne (riche en poissons, fibres alimentaires, fruits, légumes, polyphénols et pauvre en viandes et en gras saturés) est efficace pour prévenir le risque de développer des MCV et pour diminuer la mortalité (Dilis et al. 2012; Estruch et al. 2013). Toutefois, une étude approfondie de l'impact individuel des différentes composantes de la diète ne permet pas de conclure à un effet bénéfique (Dilis et al. 2012), ce qui suggère l'existence d'une synergie entre les nutriments de la diète méditerranéenne (Martinez-Gonzalez et al. 2012). Cette découverte pourrait aussi s'appliquer, en partie, aux résultats négatifs des études cliniques avec des antioxydants isolés ou combinés (Steinberg et al. 2002; Katsiki et al. 2009). Cependant, la consommation de poissons (He et al. 2004) et de vin rouge (Renaud et al. 1992; Costanzo et al. 2010) qui sont présents dans la diète méditerranéenne, est associée à

une diminution de la mortalité associée aux MCV. Des bénéfices des acides gras oméga-3, présents dans le poisson, et des polyphénols présents dans le vin rouge ont été rapportés sur la santé cardiovasculaire, comme la diminution de la pression artérielle (Geleijnse et al. 2002; Chiva-Blanch et al. 2012b) et de l'inflammation (Meydani et al. 1991; Trebble et al. 2003; Chiva-Blanch et al. 2012a).

1.3.2.2 Les antioxydants et la fonction endothéliale

Les bienfaits des antioxydants sur la fonction endothéliale ont été répertoriés chez l'humain et dans les modèles animaux. La vitamine C a montré à plusieurs reprises son effet bénéfique pour améliorer la relaxation dépendante de l'endothélium chez des patients ayant un ou des facteurs de risque cardiovasculaire (Heitzer et al. 1996; Ting et al. 1997; Taddei et al. 1998a; Timimi et al. 1998; Natali et al. 2000; Heitzer et al. 2001a; Schinzari et al. 2012). Par exemple, l'infusion de vitamine C dans les artères brachiales de patients hypertendus a amélioré la dilation induite par le flux, démontrant le rôle du stress oxydant dans la dysfonction endothéliale chez ces patients (Taddei et al. 1998a). Outre l'effet direct de la vitamine C sur la séquestration des RS, une hausse de la phosphorylation de la eNOS dans les cellules endothéliales humaines (Ladurner et al. 2012) et la stabilisation du BH₄ (Huang et al. 2000; Heller et al. 2001) ont été démontrées *in vitro* dans des cellules endothéliales humaines et porcines.

Depuis la publication du «*French paradox*» montrant que la consommation modérée de vin rouge promeut la santé cardiovasculaire (Renaud et al. 1992), plusieurs études ont démontré un lien entre le vin rouge et la relaxation dépendante de l'endothélium. Dans un premier temps, il a été démontré que le vin rouge provoque directement la relaxation dépendante de l'endothélium dans les aortes de rats (Fitzpatrick et al. 1993). Puis, il a été rapporté que la consommation de vin rouge pendant 30 jours permet de prévenir la diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium associée à la consommation d'une diète riche en gras dans les artères brachiales chez des volontaires sains (Cuevas et al. 2000). La découverte que la consommation de vin rouge désalcoolisé soit plus efficace sur la relaxation dépendante de l'endothélium que le vin rouge alcoolisé suggère que les bienfaits proviennent des constituants de type polyphénols (Hashimoto et al. 2001; Karatzi et al. 2004). La consommation des polyphénols du vin rouge dans l'eau de

boisson pendant 4 semaines prévient la dysfonction endothéliale associée au vieillissement en diminuant le stress oxydant dans les artères mésentériques chez des rats (Dal-Ros et al. 2012). L'étude systématique des différents polyphénols présents dans le vin a démontré que le resvératrol était le plus efficace pour activer la eNOS (Wallerath et al. 2005). Toutefois, le vin rouge était plus efficace que des doses équivalentes de polyphénols appliquées individuellement pour activer la eNOS sur des cellules endothéliales humaines (Wallerath et al. 2005), suggérant encore une fois qu'une synergie est présente entre les différents antioxydants retrouvés dans le vin pour augmenter leur efficacité. Le resvératrol améliore la relaxation dépendante de l'endothélium par des mécanismes NO-dépendants et NO-indépendants (Chen et al. 1996; Naderali et al. 2001; Novakovic et al. 2006; Rush et al. 2007; Pearson et al. 2008). Le resvératrol augmente l'expression de la eNOS et active la libération de NO dans des cellules endothéliales humaines (Leikert et al. 2002; Wallerath et al. 2002). Le resvératrol est un activateur de la Sirt-1 (Howitz et al. 2003; Wood et al. 2004; Gracia-Sancho et al. 2010), connue pour activer la eNOS et favoriser la relaxation dépendante de l'endothélium (Mattagajasingh et al. 2007). Il est possible que cette activation de la eNOS provienne de l'activation de KLF2 par la Sirt-1 (Gracia-Sancho et al. 2010). De plus, la souris *Nrf2^{-/-}* est insensible à la protection endothéliale conférée par le resvératrol suite à une diète riche en gras contrairement à la souris WT, suggérant que le resvératrol pourrait activer le facteur de transcription Nrf2 (Ungvari et al. 2010a). Finalement, le resvératrol à dose élevée permet aussi la relaxation des aortes de rats en activant directement les VSMC (Chen et al. 1996)

La consommation de thé et de catéchine (sous ses formes d'épigallocatechine gallate ou d'épicatéchine), l'un des principaux composants du thé vert mais aussi retrouvée dans les fruits, les légumes et le chocolat noir, améliore la relaxation dépendante de l'endothélium dans les artères brachiales chez l'humain (Duffy et al. 2001; Schroeter et al. 2006; Widlansky et al. 2007) et active *in vitro* l'activité de eNOS dans les cellules endothéliales aortiques bovines (Lorenz et al. 2004).

Outre la vitamine C, le resvératrol et la catéchine, plusieurs autres antioxydants et micronutriments ont aussi montré des effets positifs sur la relaxation dépendante de l'endothélium en présence de MCV (Tableau II).

Tableau II Effets bénéfiques sur la relaxation dépendant de l'endothélium des micronutriments autres que la vitamine C, le resvératrol et la catéchine.

Micronutriments	Facteurs de risque / diètes	Artères / site de mesure	Références
Espèces			
Acide α-lipoïque			
Humains	Diabète	Brachiale	(Heitzer et al. 2001a)
β-carotène			
Lapins	Diète riche en cholestérol	Aorte	(Keaney et al. 1993)
Rats	Diète riche en huiles	Aorte	(Lutz et al. 1995)
BH₄			
Humains	Hypercholestérolémie	Brachiale	(Stroes et al. 1997)
Humains	Diabète	Brachiale	(Heitzer et al. 2000)
Rats	Diabète	Mésentérique	(Akamine et al. 2006a)
Humains	Vieillessement	Carotides	(Pierce et al. 2012)
Flavanols (cacao)			
Humains	Aucun	Cutanée	(Fisher et al. 2003)
Humains	Aucun	Brachiale	(Engler et al. 2004)
Oméga-3			
Rats	Diabète	Mésentériques	(Matsumoto et al. 2009b)
Procyanidines oligomériques (cacao et raisins)			
Humains	Aucun	Mammaires	(Aldini et al. 2003)
Lapins	Aucun	Aorte	(Karim et al. 2000)
Quercertin			
Rats	Aucun	Aorte	(Fitzpatrick et al. 1993)
Rats	Diabète	Aorte	(Machha et al. 2007)
Rats	Hypertension	Aorte	(Sanchez et al. 2006; Sanchez et al. 2007)
Vitamine E			
Humains	Hypercholestérolémie	Brachiale	(Green et al. 1998; Heitzer et al. 1999)
Rats	Diabète	Aorte	(Karasu et al. 1997; Cinar et al. 2001)

Sans surprise, les antioxydants permettent de diminuer le stress oxydant (Baur et al. 2006; Pearson et al. 2008; Gendron et al. 2010; Lebel et al. 2010; Massip et al. 2010; Drouin et al. 2011a; Drouin et al. 2011b; Bolduc et al. 2012), ce qui permet d'améliorer ou de maintenir la biodisponibilité du NO.

Toutefois, plusieurs d'entre eux ont aussi des effets métaboliques: la vitamine C (Massip et al. 2010), mais pas la catéchine (Lebel et al. 2010), permet de ralentir le phénotype du vieillissement prématuré dans un modèle murin du syndrome de Werner. Pourtant, la catéchine a déjà démontré sa capacité à réduire l'inflammation causée par le diabète en diminuant la production de cytokines et l'activation de NF- κ B dans les cellules endothéliales de souris *db/db* (Babu et al. 2012). Finalement, le resvératrol permet de renverser le profil métabolique délétère dans le foie de souris nourries avec une diète riche en gras, en plus de prolonger leur espérance de vie (Baur et al. 2006). Le resvératrol serait considéré comme un produit mimant les effets bénéfiques de la restriction calorique, probablement par son action via la Sirt-1 (Wood et al. 2004; Pearson et al. 2008).

En résumé, notre alimentation est composée d'une foule de micronutriments et d'antioxydants bénéfiques pour notre santé, comme les vitamines et les polyphénols. Initialement, leur intérêt semblait provenir de leur capacité à diminuer le stress oxydant, ce qui a motivé plusieurs études cliniques d'envergure chez l'humain qui n'ont pas obtenu les résultats attendus. Toutefois, il est maintenant plus clair que les antioxydants comme la vitamine C et la catéchine ont des effets métaboliques bénéfiques complexes, et que l'utilisation de vitamines isolées est potentiellement moins efficace que la consommation d'un fruit entier. Le resvératrol se démarque potentiellement des autres par sa capacité à activer la Sirt-1, un gène clé qui serait aussi majeur dans les bienfaits de la restriction calorique.

1.3.3 La restriction calorique

Dès le début du XX^e siècle, il a été démontré que la diminution de l'apport calorique par un changement de diète ou une sous-nutrition permettait de retarder la croissance de

certaines tumeurs transplantées chez le rat (Rous 1914). Cette étude a pavé la voie aux recherches sur les impacts d'une restriction calorique. Plusieurs décennies plus tard, la restriction calorique suscite toujours l'intérêt des chercheurs, puisqu'elle serait l'approche la plus reproductible pour allonger l'espérance de vie entre les espèces, sans modification génique (Sinclair 2005). Il est important de mentionner que la restriction calorique utilisée par Rous en 1914, comme celle utilisée aujourd'hui, contient tous les micronutriments et macronutriments requis pour un fonctionnement et un développement adéquat (Rous 1914). À l'inverse, les épisodes de famine ne constituent pas une restriction calorique «saine». Par exemple, une famine survenue durant l'hiver 1944-45 au Pays-Bas a provoqué une hausse marquée de la mortalité à court terme (Banning 1946), ainsi qu'une hausse des MCV chez les enfants qui étaient en gestation pendant cette période (Roseboom et al. 2000).

1.3.3.1 Les bienfaits de la restriction calorique sur la longévité et le métabolisme

Une vingtaine d'années après la publication de Peyton Rous, McCay et *al.* ont montré qu'une restriction calorique dès le sevrage permettait d'augmenter l'espérance de vie chez des rats (McCay et al. 1935). La restriction calorique a doublé l'espérance de vie moyenne (de 483 jours à 894 jours) des rats mâles, alors que 36% (15/42) des rats femelles ont vécu plus de 1000 jours comparativement à 27% (6/22) des rates ayant eu accès à la nourriture *ad libitum* (chez les mâles 11/28 individus sous restriction calorique ont dépassé 1000 jours contrairement à 0/14 pour les rats nourris *ad libitum*) (McCay et al. 1935). L'efficacité de la restriction calorique à augmenter l'espérance de vie a été démontrée dans différentes espèces, de la levure aux rongeurs (Yu et al. 1985; Weindruch et al. 1986; Lakowski et al. 1998; Jiang et al. 2000; Cohen et al. 2004; Rogina et al. 2004), jusqu'au primates non-humains (Colman et al. 2009).

La restriction calorique permet d'atténuer la hausse du stress oxydant associée au vieillissement (Pieri et al. 1992; Xia et al. 1995; Guo et al. 2001; Zou et al. 2004; Filaire et al. 2009) et à l'athérosclérose (Guo et al. 2002). Une diminution de la production d'anions superoxydes (Guo et al. 2002; Zou et al. 2004; Ketonen et al. 2010; Rippe et al. 2010) ou un maintien des enzymes antioxydantes (Chen et al. 1992; Pieri et al. 1992; Xia et al. 1995; Guo et al. 2001; Filaire et al. 2009; Rippe et al. 2010) pourraient expliquer ce

phénomène. L'effet de la restriction calorique sur les défenses antioxydantes varie selon les tissus étudiés (Xia et al. 1995; Filaire et al. 2009). Chez des rats soumis à une restriction calorique de 40% l'activité de la catalase est augmentée à 16 mois dans le cœur et le rein, mais l'activité de la catalase demeure similaire dans le cortex cérébral, l'intestin et le foie (Xia et al. 1995). De la même façon, l'activité de la GPx n'est augmentée que dans le cœur et reste inchangée dans le rein, le cortex cérébral, l'intestin et le foie (Xia et al. 1995).

Cependant, certaines études ont démontré différentes réponses face à la restriction calorique dans différentes souches de la même espèce (Colman et al. 2009; Liao et al. 2010; Mattison et al. 2012). Une importante étude ayant soumis 41 souches différentes de souris à la restriction calorique a montré que l'espérance de vie était plus souvent réduite qu'augmentée, suggérant un effet fortement dépendant de la souche (Liao et al. 2010). Un phénomène similaire a été décrit dans 2 importantes études chez le macaque *macaca mulatta* (Colman et al. 2009; Mattison et al. 2012). Une première étude débutée en 1987 au «*National Institute of Aging*» n'a pas montré d'effet positif de la restriction calorique sur l'espérance de vie (Mattison et al. 2012). À l'inverse, l'étude du «*Wisconsin National Primate Research Center*» initiée en 1989, a rapporté une baisse de plus de 50% de la mortalité due aux maladies associées au vieillissement grâce à la restriction calorique (Colman et al. 2009). Mattison et al. ont suggéré que ces divergences de résultats pouvaient provenir d'un profil génétique différent des macaques (le pays d'origine était différent), ainsi que de la composition et de l'origine des micronutriments présents dans les diètes (Mattison et al. 2012). Malgré cette différence d'effet sur la longévité, la littérature regorge d'études montrant des effets bénéfiques de la restriction calorique chez le macaque en prévention du vieillissement (Zainal et al. 2000; Messaoudi et al. 2006; Kastman et al. 2010; Mattison et al. 2012), du cancer (Colman et al. 2009; Mattison et al. 2012), du diabète (Kemnitz et al. 1994; Colman et al. 2009), de la sarcopénie (Colman et al. 2008), de l'inflammation (Branch-Mays et al. 2008) et du développement des MCV (Colman et al. 2009).

Chez l'humain, des études sur les effets de la restriction calorique sur la longévité sont très improbables, toutefois des effets positifs sur le métabolisme ont été rapportés (Walford et al. 2002; Fontana et al. 2004; Heilbronn et al. 2006; Larson-Meyer et al.

2006; Meyer et al. 2006; Racette et al. 2006; Villareal et al. 2006; Weiss et al. 2006; Redman et al. 2007; Meydani et al. 2011). Dans un premier temps, l'expérience Biosphère 2 (1991-1993) qui a eu lieu dans le complexe du même nom en Arizona, a montré que la restriction calorique durant 2 ans (qui n'était pas prévue initialement) chez des volontaires sains a permis d'améliorer l'insulinémie, la cholestérolémie, la glycémie et la pression sanguine des participants tout en diminuant de $17\pm 5\%$ leur poids corporel (Walford et al. 2002). Il est important de mentionner que tous les participants de l'expérience Biosphère 2 sont sortis en bonne santé (Walford et al. 2002). Le projet CALERIE («*comprehensive assessment of long-term effects of reducing intake of energy*») conduit dans 3 centres américains a montré que la restriction calorique d'environ 20% chez des individus sains en surplus de poids (indice de masse corporelle variant entre 25 et 30) permet de diminuer de 10 à 15% le poids, la quantité de graisse viscérale et sous-cutanée et améliore le profil plasmatique des individus avec une restriction calorique de 6 mois à 1 an (Heilbronn et al. 2006; Larson-Meyer et al. 2006; Racette et al. 2006; Villareal et al. 2006; Weiss et al. 2006; Redman et al. 2007; Meydani et al. 2011). Des données obtenues chez des membres de la «*caloric restriction society*» aux États-Unis a aussi montré les bénéfices de la restriction calorique dans la prévention du développement de l'athérosclérose et de la dysfonction diastolique (Fontana et al. 2004; Meyer et al. 2006). Ainsi, il semble que la restriction calorique améliore le profil métabolique et la santé chez l'homme (Pletcher et al. 2002). Cette protection proviendrait de la capacité de la restriction calorique à ralentir les processus du vieillissement (Pletcher et al. 2002), probablement via l'activation de la Sirt-1 (Cohen et al. 2004). La restriction calorique permet de prévenir la hausse de stress oxydant associés avec l'âge et l'athérosclérose, soit en prévenant la hausse de production de l'anion superoxyde (Guo et al. 2002; Zou et al. 2004; Ketonen et al. 2010; Rippe et al. 2010) ou en activant l'expression des défenses antioxydantes (Chen et al. 1992; Pieri et al. 1992; Xia et al. 1995; Guo et al. 2001; Hyun et al. 2006; Filaire et al. 2009; Rippe et al. 2010).

1.3.3.2 La restriction calorique et la fonction endothéliale

Les bienfaits cardiovasculaires de la restriction calorique sont aussi dus à son effet positif sur le maintien de la fonction endothéliale. La réduction de l'apport calorique chez des patients obèses pendant 12 semaines a résulté en une amélioration du profil plasmatique

et une amélioration de la relaxation dépendante de l'endothélium de l'artère brachiale (Pierce et al. 2008). De la même façon que l'exercice, la restriction calorique peut protéger la fonction endothéliale des effets délétères des facteurs de risque cardiovasculaire (Pierce et al. 2008; Csiszar et al. 2009; Ketonen et al. 2010; Rippe et al. 2010). Une restriction calorique de 8 semaines peut même renverser la dysfonction endothéliale déjà établie par le vieillissement chez la souris (Rippe et al. 2010). La relaxation dépendante de l'endothélium est maintenue par la restriction calorique en prévenant la baisse de la biodisponibilité du NO et la hausse du stress oxydant (Pierce et al. 2008; Csiszar et al. 2009; Ketonen et al. 2010; Rippe et al. 2010). Une augmentation de l'expression et de la phosphorylation de la eNOS (Ketonen et al. 2010; Rippe et al. 2010), une diminution de la production d'anions superoxydes et de peroxy-nitrites (Csiszar et al. 2009; Ketonen et al. 2010; Rippe et al. 2010), une diminution de l'activation du NF- κ B (Csiszar et al. 2009) et de la production de cytokines inflammatoires (Csiszar et al. 2009) participent tous aux bienfaits de la restriction calorique sur la relaxation dépendante de l'endothélium. Une hausse d'activité de la SOD2 a aussi été observée (Rippe et al. 2010). L'activation de la eNOS par la Sirt-1 serait aussi un facteur améliorant la relaxation dépendante de l'endothélium suite à la restriction calorique (Mattagajasingh et al. 2007). L'ajout de sérum isolé chez des rats soumis à une restriction calorique sur des cellules endothéliales en culture a montré l'implication de la Sirt-1 dans les bienfaits de la restriction calorique: l'utilisation de ce sérum a bloqué la hausse de stress oxydant, l'activation de NF- κ B et la hausse d'expression de la iNOS et d'IL-6 induit par le TNF- α , alors que le siRNA contre la Sirt-1 a bloqué ces bénéfices (Csiszar et al. 2009).

1.3.3.3 Toutes les formes de restriction calorique s'équivalent-elles?

La restriction calorique peut être réalisée en diminuant la quantité de calories présentes dans la nourriture, ou en réduisant l'accès à la nourriture. Par exemple, le jeûne intermittent, qui donne l'accès à la nourriture un jour sur deux, permet aussi de prolonger l'espérance de vie chez les souris, l'impact variant selon le génotype (Goodrick et al. 1990). Les effets bénéfiques provenant de la réduction de l'apport calorique ou du jeûne intermittent sont très similaires (Mattson et al. 2005), toutefois le jeûne intermittent serait

plus efficace pour protéger les neurones face au stress de l'acide kainique qui induit des crises («*seizures*») (Anson et al. 2003), suggérant que le jeûne intermittent active les mécanismes de défenses neuronales plus efficacement (Mattson et al. 2005).

Bien que l'approche de la restriction calorique semble plus difficilement applicable au quotidien qu'une nutrition saine et/ou que l'exercice physique, beaucoup d'études soulignent ses bienfaits métaboliques. La restriction calorique protège l'organisme face aux pathologies. Il semble probable que la capacité de la restriction calorique, tout comme celle de l'exercice, à activer les mécanismes de défenses soit l'une des voies expliquant l'amélioration du profil métabolique lors du vieillissement. La restriction calorique, tout comme l'exercice, pourrait donc être considérée comme une intervention «*hormétique*».

1.3.4 La théorie de l'hormesis, ou «*ce qui ne nous tue pas nous rend plus forts*»

Le philosophe allemand Friedrich Nietzsche a dit «*ce qui ne nous tue pas nous rend plus forts*», ce qui résume bien le concept de l'hormesis (Gems et al. 2008). Ce principe provient de la toxicologie et stipule qu'un stimulus dangereux à forte dose, promeut des effets bénéfiques à faible dose, en stimulant les systèmes de défenses endogènes de l'organisme (Figure 9) (Calabrese et al. 2007).

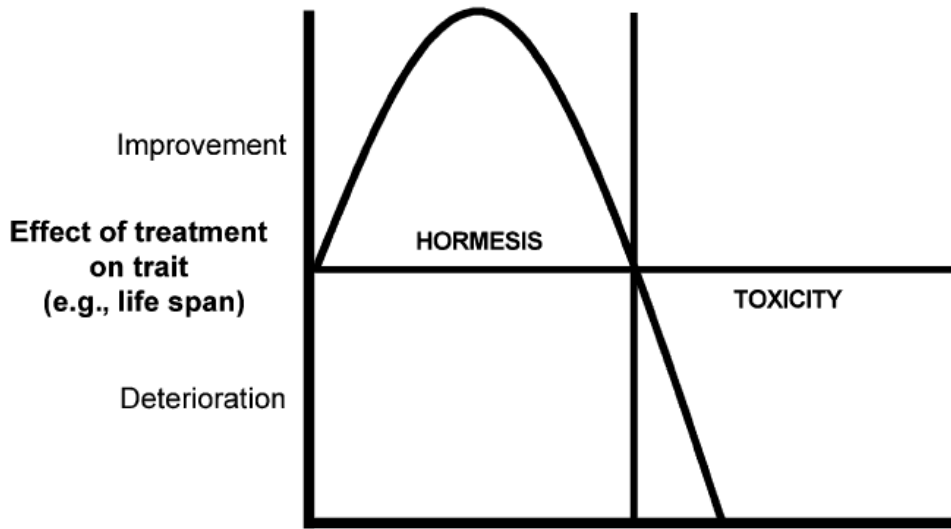


Figure 9 La théorie de l'hormesis.

Avant d'atteindre un effet toxique délétère, un composé «*hormétique*» active les mécanismes de défenses endogènes pour augmenter la capacité à se défendre face aux stress et aux agressions environnementales.

Réimprimé avec la permission de Elsevier : Cell Metabolism, D Gems, L Partridge, Stress-Response Hormesis and Aging: "That which Does Not Kill Us Makes Us Stronger", 5 (3) pp 200-203, Copyright (2008).

Ainsi, la cellule ou l'organisme est mieux préparé à faire face aux dommages associés aux stress environnementaux, et est plus apte à résister au vieillissement ou aux MCV (Sinclair 2005; Gems et al. 2008; Mattson 2008b; Mattson 2008a; Radak et al. 2008).

La hausse de RS provenant de l'exercice modéré utiliserait ce concept d'hormesis (Davies et al. 1982; Alessio et al. 1988b; Radak et al. 1999). L'exercice active en effet l'expression de défenses antioxydantes et des enzymes de réparation de l'ADN (Alessio et al. 1988a; Radak et al. 2000; Radak et al. 2001a; Radak et al. 2001b; Radak et al. 2002; Radak et al. 2003; Radak et al. 2004). De plus, l'inhibition de la production de RS par l'utilisation combinée d'un antioxydant pendant l'exercice supprime les bénéfices sur les défenses antioxydantes et la résistance à l'insuline découlant de l'exercice chez le rat (Gomez-Cabrera et al. 2005) ou l'humain (Ristow et al. 2009). La hausse transitoire de

RS pendant l'exercice serait primordiale pour conférer ses bienfaits à long terme (Fisher-Wellman et al. 2009).

Plusieurs composés chimiques «*hormétiques*» identifiés dans les aliments activent des mécanismes de défenses endogènes (Mattson 2008b): le plus connu est probablement le resvératrol, qui peut activer la Sirt-1 et le Nrf2 pour protéger l'organisme et ralentir le développement de pathologies (Baur et al. 2006; Csiszar et al. 2006b; Pearson et al. 2008; Calabrese et al. 2010; Ungvari et al. 2010a; Palsamy et al. 2011; Franco et al. 2013).

De la même façon, la restriction calorique active des mécanismes de défenses intracellulaires, ce qui augmente la résistance aux stress et confère des propriétés hormétiques (Sinclair 2005). Par exemple, des cellules en culture mises en présence de sérum provenant de rats sous restriction calorique sont plus résistantes à l'apoptose et au stress de la chaleur ou du H₂O₂ (de Cabo et al. 2003; Cohen et al. 2004).

Ainsi, les interventions qui permettent de retarder le développement du vieillissement ou des MCV permettent toutes d'activer et de mettre en place des mécanismes de protection endogènes comme les défenses antioxydantes ou les mécanismes de réparation de l'ADN, retardant la probabilité que des dommages ultérieurs affectent négativement les fonctions cellulaires (Sinclair 2005; Mattson 2008b; Radak et al. 2008). La capacité de l'exercice, de certains composés chimiques «*hormétiques*» présents dans l'alimentation et de la restriction calorique à induire un épisode de stress transitoire permettrait de stimuler ces mécanismes de défense. Ainsi, ce qui ne nous tue pas nous permet effectivement de devenir plus forts! Existerait-il une protéine ayant la capacité de réguler de tels mécanismes clés dans l'organisme? Longtemps considéré simplement comme un gène suppresseur de tumeurs, p53 semble avoir la capacité de participer à plusieurs mécanismes cellulaires.

1.4 Le p53, beaucoup plus qu'un gène suppresseur de tumeurs

En 1979, le p53 a été associé à l'antigène-T du virus simien 40 (ou SV40), un proto-oncogène retrouvé chez le macaque rhésus, ce qui à l'époque, a conféré au p53 un rôle oncogénique (DeLeo et al. 1979; Kress et al. 1979; Lane et al. 1979; Linzer et al. 1979). Les études réalisées dans les années 1980 ont renforcé l'hypothèse selon laquelle le p53 participait au développement du cancer. Par exemple, l'injection d'un anticorps contre le p53 a inhibé la synthèse d'ADN dans la lignée cellulaire de fibroblastes de souris 3T3, montrant que l'inhibition de p53 bloquait la progression du cycle cellulaire avant l'entrée en phase S (Mercer et al. 1982). De plus, la transfection de p53 a facilité l'immortalisation de cellules en culture (Jenkins et al. 1984). Ces résultats, qui paraissent contre-intuitifs en 2013, proviennent du fait que les premiers clones de p53 utilisés étaient mutés (Oren et al. 1983; Wolf et al. 1985). En 1989, il a en effet été rapporté que la capacité de p53 à promouvoir l'immortalisation des cellules provenait d'une mutation dans le gène de p53 (Hinds et al. 1989). Ainsi, rapidement des études avec le p53 non-muté (WT) ont montré sa capacité à ralentir la progression de tumeurs ou la transformation de cellules (Eliyahu et al. 1989; Finlay et al. 1989; Baker et al. 1990). Les premières études avec des souris p53^{-/-}, chez qui une mort accélérée des suites de cancers a été observée, ont ensuite confirmé le potentiel anti-tumoral de p53 (Donehower et al. 1992; Jacks et al. 1994; Purdie et al. 1994). Il est maintenant clairement établi que p53 agit pour protéger l'intégrité cellulaire en contrôlant divers mécanismes. Il agit comme un senseur de stress pour la cellule et initie différents mécanismes cellulaires selon la durée et la nature du stress présent (Lane 1992; Levine 1997; Chumakov 2007): p53 a la capacité d'initier l'apoptose (section 1.4.2.1), d'arrêter le cycle cellulaire pour permettre la réparation des dommages (section 1.4.2.2) ou d'induire la sénescence (section 1.4.2.3). Le p53 constitue le gène le plus fréquemment muté dans le cancer, et une altération dans ses voies de signalisation est aussi fréquemment observée dans les cancers (Greenblatt et al. 1994). Bien que son implication dans le cancer et dans la régulation du cycle cellulaire ait stimulé la recherche au cours des dernières décennies, plusieurs autres fonctions majeures de p53 ont été découvertes ces dernières années (section 1.4.3): p53 régule l'équilibre *rédox* cellulaire (section 1.4.3.1), participe au vieillissement (section 1.4.3.2), régule la fonction endothéliale (section 1.4.3.3) et favorise la capacité à l'exercice (section 1.4.4.1). Avant

de décrire les fonctions du gène suppresseur de tumeurs p53, il est primordial de comprendre son fonctionnement et sa régulation.

1.4.1 Un bref aperçu de la régulation de p53

Le sujet de ma thèse ne touchant pas directement les modes de régulation de p53 et puisque la régulation de p53 est infiniment complexe, cette section décrit simplement les notions les plus importantes.

Le gène suppresseur de tumeurs p53 possède 11 exons et est hautement conservé entre les espèces (Khoury et al. 2010). Le p53 est exprimé de manière constitutive. Diverses modifications post-traductionnelles augmentent sa stabilité ce qui lui permet d'interagir avec ses nombreux partenaires, et sa translocation nucléaire lui confère le rôle de facteur de transcription (son principal rôle). Une fois le p53 stabilisé, il pénètre dans le noyau et forme un homotétramère (Hupp et al. 1994). Le p53 lie son élément de réponse (el-Deiry et al. 1992) et affecte directement l'expression de ses nombreux gènes cibles (Figure 10) (Beckerman et al. 2010). Le p53 peut aussi interagir avec les éléments de la machinerie transcriptionnelle, comme le facteur de transcription TFIID qui est un élément essentiel dans la transcription génique, et avec des coactivateurs pour altérer la conformation de la chromatine autour des gènes, comme l'histone acétyltransférase CBP/p300, pour activer ou réprimer l'expression des gènes selon la situation (Zilfou et al. 2009).

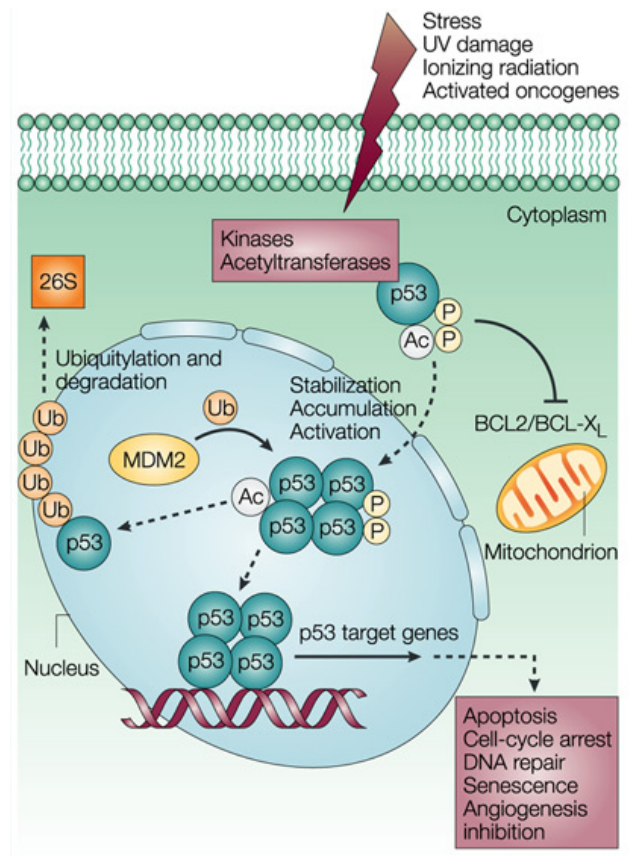


Figure 10 Le p53 est régulé par divers processus post-traductionnels

Un élément déclencheur (stress, rayons UV, radiations, oncogènes) permet la stabilisation de p53 par sa phosphorylation (P) et son acétylation (Ac). Le p53 peut altérer la mitochondrie ou entrer dans le noyau pour activer des gènes cibles et réguler les fonctions cellulaires. Le MDM2 promeut l'ubiquitination (Ub) de p53 pour l'inhiber et favoriser sa dégradation par le protéasome 26S.

Réimprimé avec la permission de Nature Publishing Group : Nature Reviews Cancer, AM Bode, Z Dong, Post-translational modification of p53 in tumorigenesis, 4 (10) pp 793-805, Copyright (2004).

Le principal acteur dans la stabilisation ou la dégradation de p53 est l'ubiquitine ligase *mouse double minute 2* (Mdm2) (Momand et al. 1992; Oliner et al. 1992). Le Mdm2 promeut la dégradation de p53 par l'ajout de plusieurs molécules d'ubiquitine (ou poly-ubiquitination), ce qui constitue la marque d'une protéine devant être dirigée vers le protéasome (Figure 10) (Honda et al. 1997; Fuchs et al. 1998). Le p53 peut aussi contrôler l'expression de Mdm2 par rétroaction, pour éviter la suractivation de p53 (Wu et

al. 1993). De plus, la phosphorylation de Mdm2, par la kinase Akt, favorise la dégradation de p53 par Mdm2 (Haupt et al. 2003). L'Akt est phosphorylée et activée par la kinase PI3K suite à la présence d'oncogènes (comme Ras), la liaison de cytokines ou de mitogènes sur des récepteurs cellulaires comme le récepteur à l'insuline ou au facteur de croissance de l'épiderme (ou EGFR) (Haupt et al. 2003). Le Mdm2 est donc critique pour la régulation fine de p53, et joue un rôle clé indirect dans la survie cellulaire. Contrairement à ce qui était initialement pressenti, la délétion totale de p53 chez la souris n'est pas létale (Donehower et al. 1992). En revanche, la mort au stade embryonnaire des souris Mdm2^{-/-} semble reliée à la suractivation de p53, puisque la souris p53^{-/-}/Mdm2^{-/-} se développe normalement (Jones et al. 1995; Montes de Oca Luna et al. 1995). Ainsi, la suractivation de p53 en absence de Mdm2 semble expliquer la mortalité précoce des souris Mdm2^{-/-}.

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle majeure qui régule p53 (Figure 10). Le p53 est stabilisé et activé par la phosphorylation d'environ 20 résidus différents, la Ser15 étant l'acide aminé le plus fréquemment phosphorylé (Bode et al. 2004; Chumakov 2007). Plusieurs molécules et kinases peuvent phosphoryler la Ser15 de p53 (Bode et al. 2004). L'activation d'ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) par l'agent antibiotique néocarzinostatine (Banin et al. 1998) ou par des radiations ionisantes (Canman et al. 1998) qui créent des cassures dans l'ADN double-brin provoque la phosphorylation de la Ser15 de p53. L'AMPK peut aussi phosphoryler la Ser15 de p53 pour permettre d'arrêter le cycle cellulaire lorsque la cellule est privée de glucose (Jones et al. 2005). L'ajout d'un groupement phosphate sur la Ser15 de p53 induit un changement de conformation qui réduit *in vitro* l'ubiquitination par Mdm2 (Shieh et al. 1997), ce qui augmente la quantité de p53 disponible.

L'acétylation fait aussi partie des modifications post-traductionnelles fréquentes (Figure 10). L'histone acétyltransférase CBP/p300 en présence de rayonnement ultraviolet acétyle p53 pour le stabiliser et l'activer (Gu et al. 1997; Sakaguchi et al. 1998). À l'inverse, la Sirt-1 permet la déacétylation de p53 et son inactivation (Luo et al. 2001; Vaziri et al. 2001).

En résumé, les mécanismes cellulaires sous le contrôle de p53 ont une importance capitale pour la survie et le bon développement de la cellule, expliquant la complexité de la régulation de p53. Le Mdm2 constitue le principal frein au fonctionnement de p53, tandis que la phosphorylation ou l'acétylation réduisent l'affinité de p53 pour Mdm2. Une fois p53 stabilisé, il peut interagir avec ses nombreux partenaires et activer ou réprimer l'expression de ses nombreux gènes cibles pour permettre, entre autres, de protéger la cellule face aux stress environnants et éviter la tumorigenèse.

1.4.2 Les rôles qui ont donné la notoriété au p53

Plusieurs appellations ont été données au p53 en relation avec son rôle de gène suppresseur de tumeurs: gardien du génome (Lane 1992), le gène ange gardien (Royds et al. 2006), le gardien en chef (Jacks et al. 1996) et le «*portier*» cellulaire (Levine 1997). Ces dénominations soulignent que p53 contrôle le destin de la cellule par différents mécanismes, toujours dans le but de préserver l'intégrité cellulaire. Le p53 dirige une cellule vers la mort cellulaire ou arrête le cycle cellulaire afin d'éviter une prolifération non-contrôlée. Ainsi, p53 détermine, selon le stress environnemental et le degré de dommages cellulaires, vers quel effecteur sous-jacent et mécanisme cellulaire il est préférable de diriger la cellule (Figure 11). Pour empêcher la tumorigenèse, p53 utilise 3 mécanismes principaux: l'apoptose (section 1.4.2.1), l'arrêt du cycle cellulaire (section 1.4.2.2) ou la sénescence (section 1.4.2.3).

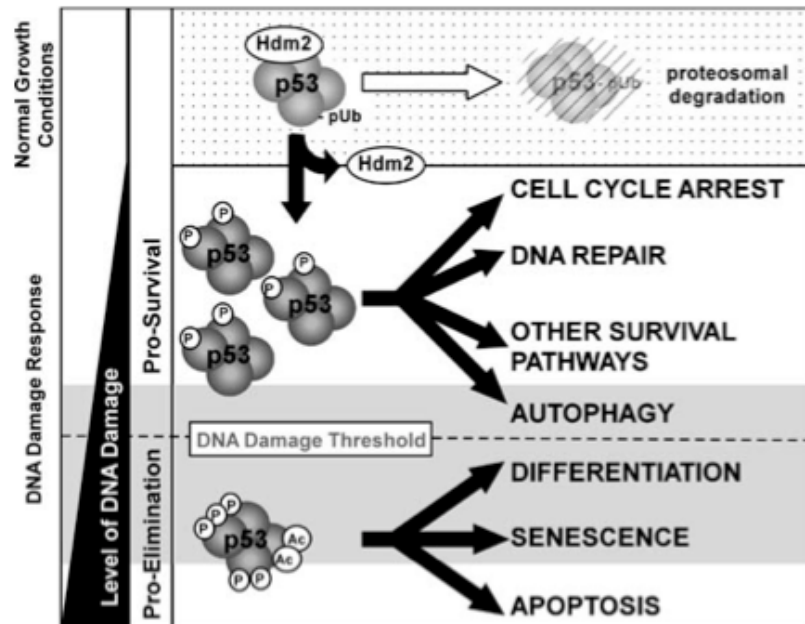


Figure 11 Le p53 contrôle la destinée cellulaire selon l'étendue des dommages et grâce à la collaboration de plusieurs partenaires.

En conditions normales p53 est dégradé par le protéasome suite à l'ubiquitination par Hdm2 (l'homologue humain de Mdm2). Selon le degré de dommages cellulaires, divers acteurs tels que l'ATM phosphoryle ou acétyle p53 afin de favoriser les différentes voies cellulaires telles que l'arrêt du cycle cellulaire, l'autophagie, la sénescence ou l'apoptose.

Réimprimé avec la permission de John Wiley and Sons : Journal of Cellular Biochemistry, ES Helton, X Chen. p53 Modulation of the DNA Damage Response, 100, pp 883-896, Copyright (2006).

1.4.1.1 L'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est initiée par 2 mécanismes: la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (ou mitochondriale). L'activation des caspases est requise dans les 2 voies, où p53 régule plusieurs joueurs importants (Figure 12).

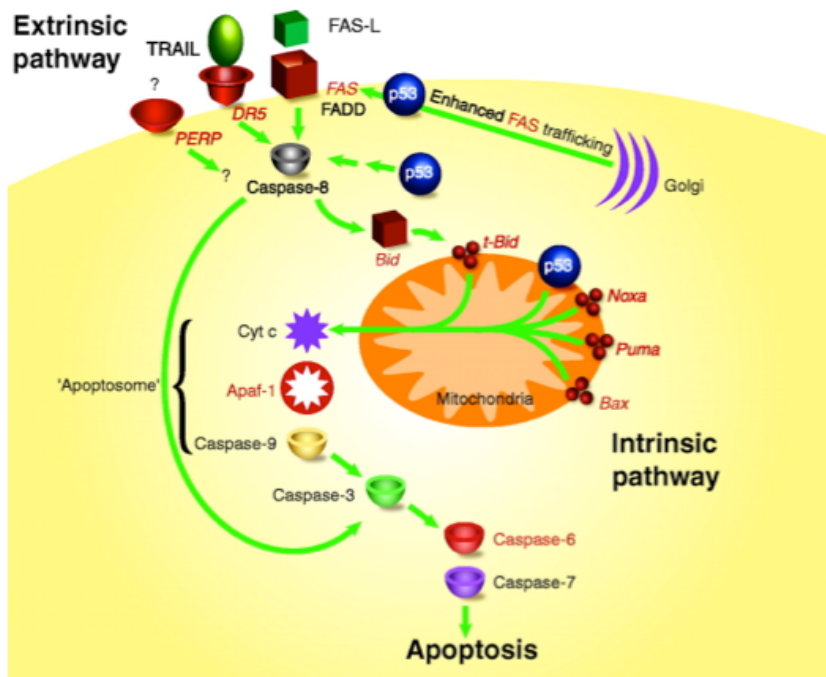


Figure 12 Le p53 contrôle l'expression génique de plusieurs médiateurs des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose.

La voie extrinsèque initie l'apoptose via les récepteurs de mort principaux DR5 et FAS. La voie intrinsèque débute lorsque p53 active l'expression des gènes pro-apoptotiques Noxa, Puma et Bax. Les 2 voies font intervenir les caspases pour provoquer l'apoptose de la cellule.

Réimprimé avec la permission de John Wiley and Sons : Journal of Cellular Biochemistry, ES Helton, X Chen. p53 Modulation of the DNA Damage Response, 100, pp 883-896, Copyright (2006).

La voie extrinsèque nécessite l'activation de récepteurs «*de mort*» (DR, *death receptors*) dont l'expression est régulée par p53, tels que Fas/CD95 (Muller et al. 1998) et DR5 (Wu et al. 1997). L'activation de ces récepteurs débute par une cascade intracellulaire qui occasionne la mort cellulaire via l'activation des caspases 3 et 8 (Haupt et al. 2003).

L'utilisation d'agent chimiothérapeutique comme la doxorubicine, qui active p53, provoque une hausse d'expression de Fas/CD95 dans différentes lignées cellulaires cancéreuses, ce qui induit l'apoptose (Muller et al. 1998). Toutefois, la hausse de Fas/CD95 et l'apoptose ne sont plus observées lorsque ces drogues sont utilisées sur

des lignées cellulaires p53^{-/-} (Muller et al. 1998). Un élément de réponse pour p53 a été découvert sur le promoteur du gène de Fas/CD95, confirmant le rôle primordial de p53 pour activer l'apoptose via Fas/CD95 (Muller et al. 1998). L'activation de Fas est provoquée par la liaison de son ligand (le «*Fas ligand*») suite aux radiations γ dans le rein et la rate chez la souris (Bouvard et al. 2000).

Le DR5 est aussi sous la régulation transcriptionnelle de p53. La doxorubicine augmente l'expression de DR5 dans les lignées cancéreuses humaines colorectales HCT116 et de carcinome pulmonaire H460 (Wu et al. 1997). Le ligand induisant l'apoptose reliée au TNF (TRAIL, *TNF related apoptosis inducing ligand*) qui lie le DR5, est aussi sous le contrôle transcriptionnel de p53 (Kuribayashi et al. 2008). L'induction de TRAIL dépendante de p53 a été observée par le traitement à la doxorubicine et au 5-fluorouracil, deux drogues anticancéreuses, dans la lignée de cellules HCT116 (Kuribayashi et al. 2008).

La voie intrinsèque, ou mitochondriale, est activée en présence de dommages à l'ADN (Figure 12) (Haupt et al. 2003). Le cytochrome c est relâché, permettant l'activation de la caspase 9, puis de la caspase 3 (Haupt et al. 2003). C'est la famille de protéines Bcl-2 qui contrôle la voie intrinsèque, comprenant des membres pro-apoptotiques comme Bax et Bak, et anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-X_L (Figure 13) (Haupt et al. 2003). Le p53 favorise l'expression de 3 gènes pro-apoptotiques en présence de stimuli qui induisent des dommages à l'ADN (*i.e.* rayons X et doxorubicine): Bax (Thornborrow et al. 2002), le modulateur de l'apoptose activé par p53 (PUMA, *p53 up-regulated modulator of apoptosis*) (Yu et al. 2003) et Noxa (qui signifie dommage en latin) (Oda et al. 2000). Le p53 peut aussi activer l'expression de la caspase 6 en présence de doxorubicine *in vitro* (MacLachlan et al. 2002), ce qui fait une cible supplémentaire de p53 pour activer les voies apoptotiques. Le p53 peut aussi agir indépendamment de son rôle de facteur de transcription. La monoubiquitination de p53 par Mdm2 donnerait le signal à la mitochondrie pour stimuler l'apoptose de manière indépendante de l'activité transcriptionnelle de p53 (Marchenko et al. 2007). Une fraction de la portion cytosolique de p53 peut en effet entrer dans la mitochondrie et initier le processus d'apoptose (Marchenko et al. 2000). Le p53 agirait en liant directement Bcl-2 et Bcl-X_L par des interactions protéine-protéine, ce qui permettrait la perméabilisation de la membrane

extérieure de la mitochondrie et favoriserait la relâche du cytochrome c (Mihara et al. 2003). Ainsi, p53 peut induire l'apoptose lorsque des dommages à l'ADN sont ressentis en stimulant l'expression génique des gènes pro-apoptotiques et en inhibant les protéines anti-apoptotiques.

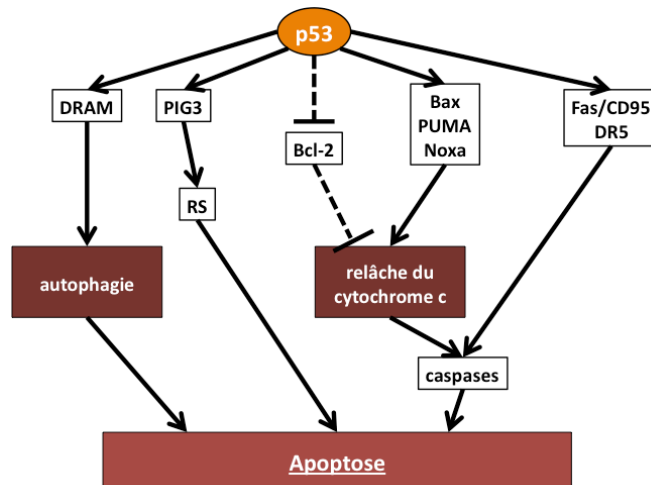


Figure 13 Le p53 agit via différents gènes pour induire l'apoptose

Le p53 active transcriptionnellement différents gènes pour induire l'apoptose. L'activation de DRAM initie l'autophagie. L'activation du gène 3 induit par p53 (PIG3) produit une hausse des RS qui mène vers l'apoptose. Le p53 peut activer l'expression des récepteurs de mort Fas/CD95 et DR5, en plus d'activer les gènes pro-apoptotiques Bax, PUMA et Noxa pour promouvoir la relâche du cytochrome c de la mitochondrie et l'activation des caspases. Le p53 inhibe le gène anti-apoptotique Bcl-2 par une interaction protéine-protéine, ce qui favorise aussi la relâche du cytochrome c de la mitochondrie. DR5 : récepteur de mort 5; DRAM : modulateur de l'autophagie régulé par les dommages; PUMA : modulateur de l'apoptose activé par p53; RS: espèces réactives.

De plus, une hausse de RS peut accélérer le processus d'apoptose. L'identification de nouveaux gènes cibles de p53 par sa transfection dans la lignée de cellules de cancer colorectal DLD-1 a permis d'identifier des gènes induits par p53 (PIG, *p53-induced genes*) qui provoquent une hausse de RS et l'apoptose (Figure 13) (Polyak et al. 1997). Le PIG3 a été identifié comme étant un élément clé de l'apoptose induite par les RS et p53 (Polyak et al. 1997). La surexpression de p53 a démontré l'activation de manière chronologique de PIG3, de la production de RS et de l'apoptose (Polyak et al. 1997). L'inhibition de la transcription génique par le 5,6-dichlorobenimidazole riboside et la cycloheximide, puis de la hausse des RS par le PDTC et le chlorure de

diphényléneiodonium-DPI a confirmé la nécessité de l'activation génique des PIG par p53 pour augmenter les RS (Polyak et al. 1997). L'inhibition de l'ouverture du PTP (par l'acide bongkréique) a bloqué l'apoptose, sans effet sur les PIG et les RS, confirmant la chronologie de l'apoptose induite par p53 et les RS via les PIG (Polyak et al. 1997).

Finalement, p53 utiliserait également l'autophagie pour induire l'apoptose (Figure 13). L'autophagie est un processus catabolique qui consiste à dégrader des composantes cellulaires défectueuses via la machinerie lysosomale (Zilfou et al. 2009). Le p53 activerait l'expression du modulateur de l'autophagie régulé par les dommages (DRAM, *damage-regulated autophagy modulator*), une protéine lysosomale qui participe à la régulation de l'autophagie (Crighton et al. 2006). L'inhibition de DRAM par siRNA bloque l'apoptose induite par la doxorubicine dans les cellules tumorales RKO et Saos-2, sans toutefois altérer l'expression de p53 et de p21 (Crighton et al. 2006). De plus, la transfection seule de DRAM ne permet pas d'induire l'apoptose contrairement à la transfection de p53 (Crighton et al. 2006). L'inhibition du gène ATG5, qui est nécessaire à l'autophagie, bloque l'apoptose induite par p53 et DRAM (Crighton et al. 2006). Ainsi, l'activation de DRAM par p53 suggère que ce dernier pourrait utiliser la voie de l'autophagie pour induire l'apoptose. L'implication de l'autophagie dans la protection contre le cancer demeure toutefois obscure (Vousden et al. 2009).

En résumé, p53 a la capacité de provoquer l'apoptose cellulaire en activant différents gènes cibles impliqués dans diverses voies moléculaires (Figure 13). Ce mécanisme permet à la cellule d'éviter une prolifération aberrante suite à des dommages. Heureusement, l'activation de p53 ne provoque pas irrémédiablement la mort de la cellule, p53 peut aussi arrêter temporairement le cycle cellulaire et permettre la réparation des dommages à l'ADN.

1.4.1.2 La régulation du cycle cellulaire

L'arrêt temporaire du cycle cellulaire permet le maintien de l'intégrité cellulaire. Lors de cette pause, des mécanismes de réparation sont mis en place pour éviter la transmission de défauts génétiques vers les cellules filles lors de la mitose (Chumakov 2007; Zilfou et al. 2009). L'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN peuvent survenir

suite à des dommages à l'ADN induit par des stress environnants (Chumakov 2007; Zilfou et al. 2009).

La brisure de l'ADN par des agents chimiothérapeutiques ou des radiations active ATM qui active à son tour p53 (par phosphorylation sur la Ser15) (Banin et al. 1998; Canman et al. 1998), Mdm2 (Maya et al. 2001) et la kinase «*checkpoint*» 2 (*chk2*, *checkpoint kinase 2*) (Wang et al. 2004). La *chk2* peut aussi phosphoryler p53 sur la Ser20 dans des fibroblastes humains et l'activer en présence de l'agent anticancéreux irofulven (Wang et al. 2004). Une fois p53 activé, il stimule l'expression de p21 pour arrêter le cycle cellulaire (el-Deiry et al. 1993). Le p21 inhibe les kinases dépendantes de la cycline (CDK, *cyclin dependent kinases*) qui phosphorylent la protéine du rétinoblastome (pRb, *retinoblastoma protein*) (Romanov et al. 2012). L'hyperphosphorylation de pRb mène à la délocalisation de l'ADN du facteur de transcription E2F qui est responsable de l'activation des gènes impliqués dans la synthèse de l'ADN (Figure 14) (Romanov et al. 2012).

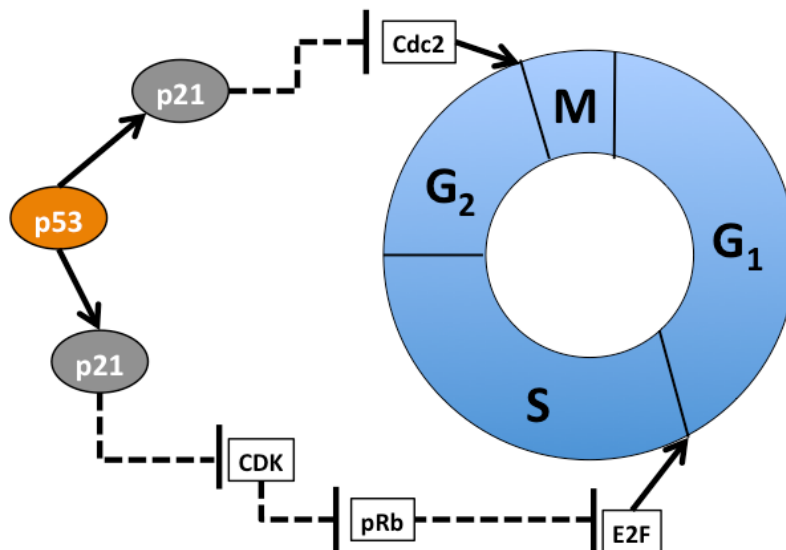


Figure 14 Le p53 peut bloquer le cycle cellulaire à 2 endroits pour éviter la transmission d'erreurs dans l'ADN.

Le p53 contrôle le cycle cellulaire à 2 endroits via l'activation du p21. Dans un premier temps, p21 inhibe CDK qui permet la phosphorylation de pRb. La phosphorylation de pRb permet la relâche du facteur de transcription E2F responsable de l'expression de plusieurs gènes régulant la phase S, où l'ADN sera répliqué. Dans un deuxième temps, p53 via p21 peut aussi inhiber Cdc2, ce qui empêche l'entrée en phase M.

De cette façon, p53 peut, via p21, arrêter le cycle cellulaire et activer des gènes qui participeront à la réparation de l'ADN, comme l'ADN polymérase η (Liu et al. 2006). Ainsi, cette pause permet d'éviter la réplication d'ADN défectueux (Chumakov 2007; Helton et al. 2007). L'inhibition du cycle cellulaire par p53 avant la synthèse de l'ADN constitue le point de contrôle (ou le «*checkpoint*») G1. Le p53 peut aussi arrêter le cycle cellulaire à la phase G2/M pour éviter la ségrégation de chromosomes endommagés (Helton et al. 2007). Le gène inhibé par p53 (via p21) pour arrêter le cycle cellulaire en G2/M est la CDK appelée Cdc2 (Smits et al. 2000). Ainsi, p53 peut arrêter le cycle cellulaire à 2 endroits pour éviter que des erreurs présentes sur l'ADN soient transférées vers les cellules filles et qu'elles progressent vers des cellules cancéreuses (Figure 14).

Lorsque les dommages cellulaires seront réparés, la cellule peut continuer son cycle cellulaire sans risque de propager des défauts géniques. Il existe en revanche une voie d'arrêt du cycle cellulaire qui est permanente et irréversible: la sénescence.

1.4.1.3 La sénescence

Le mécanisme de sénescence fait partie des mécanismes cellulaires permettant d'éviter le développement de cancers, en stoppant de manière irréversible les processus de croissance et de prolifération (Campisi 2013). La sénescence est activée par des oncogènes, l'attrition des télomères, les dommages à l'ADN, des agents chimiothérapeutiques et l'activation des gènes suppresseurs de tumeurs p53 et pRb (Campisi 2013). Deux médiateurs importants pour l'activation de la sénescence contrôlée par p53 sont le facteur de ribosylation ARF (*ADP ribosylation factor*) et le «*promyelocytic leukaemia*» (ou PML), qui respectivement, promeuvent la séquestration de Mdm2 et l'acétylation de p53 pour éviter la dégradation de ce dernier (Zuckerman et al. 2009).

Tout comme lors de l'arrêt du cycle cellulaire, p53 active p21 pour induire la sénescence (Brown et al. 1997). Comment la cellule choisit-elle entre l'arrêt du cycle cellulaire ou la sénescence? Pour l'instant, cette question ne peut que partiellement être résolue. Il semble que ce soit la durée de la réparation de l'ADN qui puisse fournir une partie de la réponse: si l'ADN n'est pas réparé rapidement et que l'arrêt du cycle cellulaire induit par p21 est maintenue, les mécanismes de sénescence se mettraient en place (Campisi et

al. 2007). Ainsi, la sénescence induite par p53 serait une réponse cellulaire rapide, tandis que la voie de pRb/p16 serait engagée lors d'une seconde vague permettant de maintenir la sénescence (Stein et al. 1999).

La protéine ARF établirait un lien entre les voies de p53/p21 et de pRb/p16 (Figure 15) (Zilfou et al. 2009). En effet, ARF induit la séquestration de Mdm2, ce qui active p53, permettant en aval d'activer pRb et d'inhiber E2F. La dérégulation de E2F par pRb mène ensuite à l'activation de ARF. Ainsi, le mécanisme de sénescence est finement régulé par 2 voies, dont l'une est contrôlée par p53. Ces 2 voies communiquent entre elles par l'intermédiaire de ARF pour favoriser l'intégrité cellulaire et diminuer le risque de tumorigenèse.

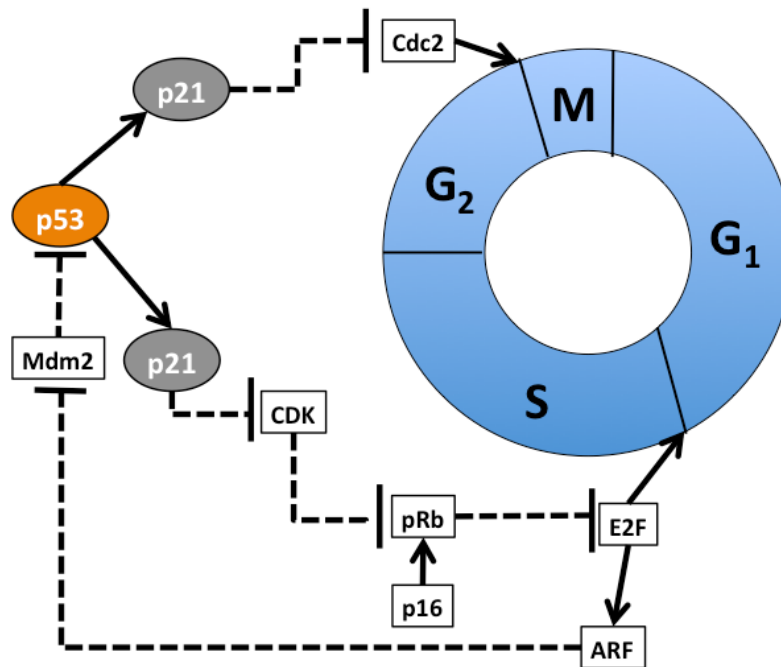


Figure 15 Le p53 active des voies similaires pour promouvoir la sénescence et l'arrêt du cycle cellulaire.

Le p53 pourrait activer la sénescence lorsque les mécanismes initialement activés pour l'arrêt du cycle cellulaire sont maintenus: p53 active p21 pour mener à l'arrêt du cycle cellulaire en G₁ via E2F ou en G₂/M via Cdc2. Le p16 peut activer pRb, et la voie de pRb serait activée après celle de p53 pour le maintien de la sénescence. ARF qui est activé lorsque E2F est dérégulé par pRb, stabilise p53 en séquestrant Mdm2, l'inhibiteur endogène de p53.

1.4.1.4 Comment choisir entre l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire?

Le p53 sélectionne quels sont les gènes à activer selon ce qui est préférable pour la cellule. La balance entre PUMA et p21 serait majeure pour décider la finalité de la cellule (Zilfou et al. 2009). Lorsque l'expression de p21 est altérée, la cellule se dirige vers l'apoptose sous le contrôle de PUMA (Yu et al. 2003). À l'inverse, si c'est l'expression de PUMA qui est déficiente, l'apoptose est prévenue (Yu et al. 2003). De cette façon, en absence de PUMA, p21 favorise l'arrêt du cycle cellulaire. Certains stimuli peuvent favoriser une voie plutôt que l'autre, comme c'est le cas pour les oncogènes Myc et Ras: l'apoptose dépendante de p53 serait favorisée par Myc et la sénescence serait activée par Ras (Zuckerman et al. 2009).

En conclusion, l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence sont en lien avec le rôle de gène suppresseur de tumeurs de p53. Plusieurs voies sont sous le contrôle de p53, lui permettant de réguler le destin de la cellule. De plus en plus d'études révèlent de nouvelles fonctions de p53, qui n'ont pas de lien direct avec la prévention du cancer. Ces nouvelles propriétés, qui bien que moins connues, ont un impact majeur sur la destinée de la cellule.

1.4.3 Les fonctions méconnues de p53

Étant donnée l'importance de p53 dans les mécanismes régulant la survie de la cellule et son implication dans le cancer, la majorité des études se sont consacrées à ces rôles. Cependant, depuis le milieu des années 2000, plusieurs études mettent en lumière d'autres fonctions cellulaires de p53, ainsi que de nouvelles interactions avec d'autres gènes parfois moins connus. P53 favorise par exemple l'homéostasie cellulaire en régulant l'équilibre *rédox* via le contrôle de l'expression de certains gènes antioxydants (section 1.4.3.1). Ainsi, étant donnés les liens entre p53, le stress oxydant et l'influence du stress oxydant sur le vieillissement (section 1.2.2) et la dysfonction endothéliale (section 1.2.3), p53 participe-t-il au processus du vieillissement (section 1.4.3.2) ou de la dysfonction endothéliale (section 1.4.3.3)? Serait-il possible que p53 soit sensible aux interventions visant à ralentir le vieillissement vasculaire (section 1.4.4)?

1.4.3.1 Le p53 contrôle l'équilibre rédox cellulaire

Comme décrit précédemment, p53 peut utiliser la production de RS pour diriger la cellule vers l'apoptose (voir section 1.4.2.1) (Polyak et al. 1997). Ainsi, p53 peut, en période de stress, promouvoir l'expression de gènes pro-oxydant comme PIG3 (Polyak et al. 1997) et p66shc (Trinei et al. 2002) afin d'éliminer, via l'apoptose, les cellules défectueuses. Toutefois, en condition basale, p53 favorise l'expression de gènes antioxydants (Sablina et al. 2005). L'étude de Sablina et *al.* a démontré que l'inhibition de p53 dans une variété de lignées cellulaires cancéreuses provoque une hausse du stress oxydant (Sablina et al. 2005). Cette hausse est associée à une diminution de l'expression des enzymes antioxydantes GPx1 et des sestrines (Sesn) 1 et 2 (Sablina et al. 2005). Bien que peu connues, les Sesn participent à la régénération des Prx et contribuent à la défense antioxydante contre le H₂O₂ dans les cellules RKO et MCF7 (Budanov et al. 2004). De plus, en utilisant des cellules H1299 déficientes en p53 dans lesquelles p53 avait été réintroduit avec un vecteur dont l'expression augmente avec le temps, les auteurs ont pu démontrer les effets directs de la quantité de p53 sur la production de RS (Sablina et al. 2005): lorsque p53 était faiblement présent, les expressions de la GPx1 et des Sesn étaient induites, tout comme celle du p21 (Sablina et al. 2005). Cependant, lorsque p53 était fortement exprimé, non seulement les expressions de la GPx-1 et des Sesn étaient fortes, mais celle de Bax et de PUMA étaient augmentées, coïncidant avec une hausse de la production des RS (Sablina et al. 2005). Cette étude a suggéré pour la première fois que p53, en condition de base dans une cellule non-stressée, agissait en activant l'expression de gènes antioxydants pour promouvoir la stabilité cellulaire (Sablina et al. 2005). Comment p53 peut-il promouvoir deux mécanismes aux antipodes aussi rapidement? Il a été proposé que l'activation des gènes antioxydants précéderait la hausse d'expression des gènes pro-oxydants (Bensaad et al. 2005).

Outre l'activation de l'expression de GPx-1 et des Sesn (Tan et al. 1999; Budanov et al. 2004; Hussain et al. 2004; Sablina et al. 2005), p53 a aussi démontré sa capacité à moduler l'expression de la catalase (O'Connor et al. 2008), de l'aldéhyde déshydrogénase 4 (ou ALDH4) (Yoon et al. 2004), de la SOD2 (Drane et al. 2001; Hussain et al. 2004; Zhao et al. 2005; Dhar et al. 2006) et de Nrf2 (Faraonio et al. 2006; Chen et al. 2009; Toledano 2009). Toutefois, le contexte cellulaire semble affecter la

relation entre p53 et certaines enzymes antioxydantes. Le p53 active la GPx-1 dans différentes lignées cancéreuses (RKO, U2-OS et Saos-2) (Tan et al. 1999; Sablina et al. 2005) et une lignée de fibroblastes immortalisés (Hussain et al. 2004) par la liaison au promoteur de la GPx-1. Les Sesn sont activées par p53 dans les cellules cancéreuses RKO, Saos-2 et MCF-7 en présence de la doxorubicine ou de l'hypoxie (Velasco-Miguel et al. 1999; Budanov et al. 2002; Budanov et al. 2004; Sablina et al. 2005). À l'inverse, la catalase n'est pas activée par p53 dans des fibroblastes immortalisés (Hussain et al. 2004), mais p53 lie le promoteur de la catalase et active son expression dans les cellules RGC-5 de rétine de rats (O'Connor et al. 2008). Finalement, l'activation de p53 par des agents pharmacologiques anticancéreux (étoposide, cisplatine et diéthylmaléate) dans les lignées de cellules cancéreuses hépatiques, de carcinomes de poumons, et d'ostéosarcomes bloque l'activation de gènes antioxydants régulés par la voie Nrf2/ARE (Faraonio et al. 2006). Toutefois, dans les cellules COS-1 et *in vivo*, il semble que p21 puisse entrer en compétition avec Keap-1 pour favoriser la stabilisation de Nrf2 et permettre l'activation de ses gènes cibles, tels que HO-1 et la NADPH quinone oxydoréductase 1 (ou NQO1) (Chen et al. 2009). Ainsi, p53 pourrait, via p21, diminuer le stress oxydant par l'activation de la voie antioxydante Nrf2/ARE (Toledano 2009). Le p53 peut donc, selon le contexte cellulaire, favoriser ou non l'expression de gènes antioxydants clés.

Le p53 favorise l'expression du gène régulateur de la glycolyse et de l'apoptose induit par p53 (TIGAR, *Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator*) (Bensaad et al. 2006) et de la glutaminase mitochondriale 2 (GLS2, *mitochondrial glutaminase 2*) (Hu et al. 2010; Suzuki et al. 2010), qui sont 2 gènes impliqués principalement dans la régulation de la phosphorylation oxydative (voir section 1.4.4.1), mais qui produisent aussi du GSH. Le GSH participe au métabolisme du H₂O₂ dans sa transformation en eau par la glutathione réductase.

Ces études soulignent deux points majeurs: 1) p53 peut favoriser l'expression de gènes codant pour des enzymes antioxydantes; 2) le contrôle par p53 de l'expression des enzymes antioxydantes est fortement dépendant du contexte cellulaire. De plus, la réponse de p53 dépend de l'état des dommages cellulaires et du stress (Figure 16).

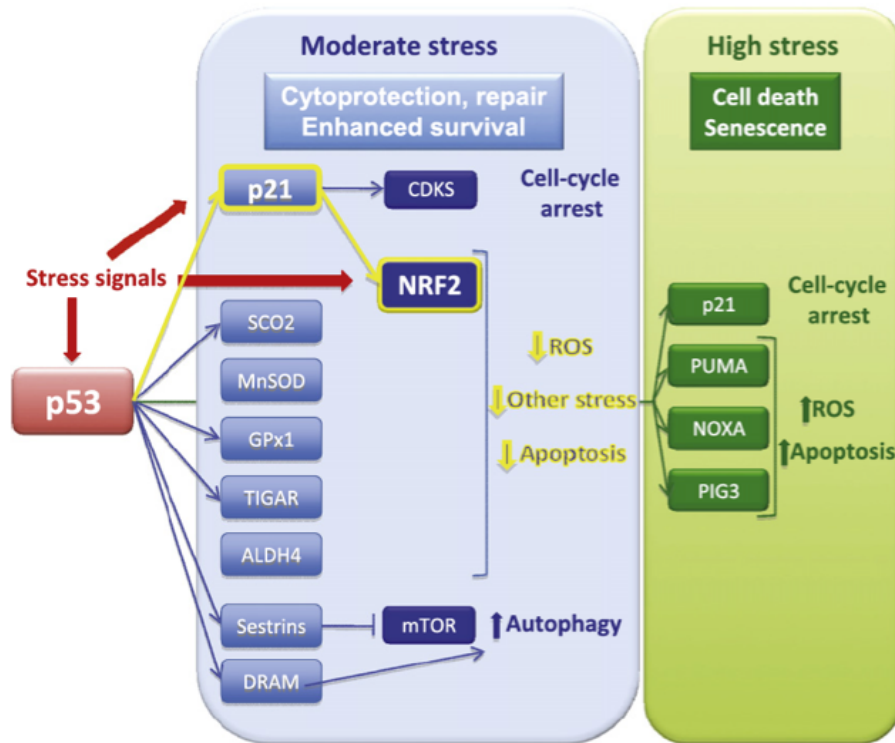


Figure 16 Le p53 régule une multitude de gènes antioxydants pour contrôler le sort de la cellule.

Les signaux de stress vont activer p21, Nrf2 ou p53. Ce dernier peut favoriser la réparation des dommages via p21 (qui contrôle les CDKS) qui stimule aussi l'expression de Nrf2. L'activation par p53 des gènes antioxydants (MnSOD, GPx1, TIGAR, ALDH4, Sestrins), favorisant l'autophagie (DRAM) ou responsable du fonctionnement de la mitochondrie via la synthèse du cytochrome c oxydase 2 (ou SCO2) en période de stress modéré favorise la survie cellulaire. Lors de stress plus sérieux, la cellule est dirigée vers la sénescence via p21 ou vers l'apoptose via la hausse d'expression de PUMA, NOXA et PIG3, tous étant sous la régulation de p53.

Réimprimé avec la permission de Elsevier Limited : Molecular Cell, MB Toledano. The Guardian Recruits Cops: The p53-p21 Axis Delegates Prosurvival Duties to the Keap1-Nrf2 Stress Pathway, 34 (6), pp 637-639, Copyright (2009).

1.4.3.2 Le rôle de p53 dans le vieillissement

Étant données les propriétés antitumorales de p53, il n'est pas surprenant que la délétion de p53 chez la souris ou la mutation de p53 chez l'humain diminuent grandement l'espérance de vie (Malkin et al. 1990; Donehower et al. 1992). Chez l'humain, le

syndrome de Li-Fraumeni est caractérisé par une incidence fortement accentuée de développer prématurément des cancers: 50% des personnes atteintes du syndrome de Li-Fraumeni développent un cancer avant l'âge de 40 ans et 90% auront un cancer avant l'âge de 70 ans (Malkin et al. 1990; Palmero et al. 2010). À ce jour, seul le gène p53 a été identifié comme responsable du développement de ce syndrome (Palmero et al. 2010). Dans la première étude publiée en 1992 utilisant une souris p53^{-/-}, il a été démontré que l'absence de p53 engendre un développement très rapide de cancers (Donehower et al. 1992): dès la 10^e semaine de vie des tumeurs sont présentes et leur progression est très rapide entre la 15^e et la 25^e semaine, si bien qu'à 6 mois 74% des souris homozygotes présentent des néoplasmes (Donehower et al. 1992). En revanche, seules 2/96 souris p53^{+/-} développent un cancer à l'âge de 9 mois (Donehower et al. 1992). Ces résultats ont été confirmés par la suite (Donehower et al. 1992; Harvey et al. 1993; Jacks et al. 1994; Purdie et al. 1994; Venkatachalam et al. 2001), démontrant sans équivoque que la perte de p53 accélère la mort par le développement prématuré de cancers (Figure 17).

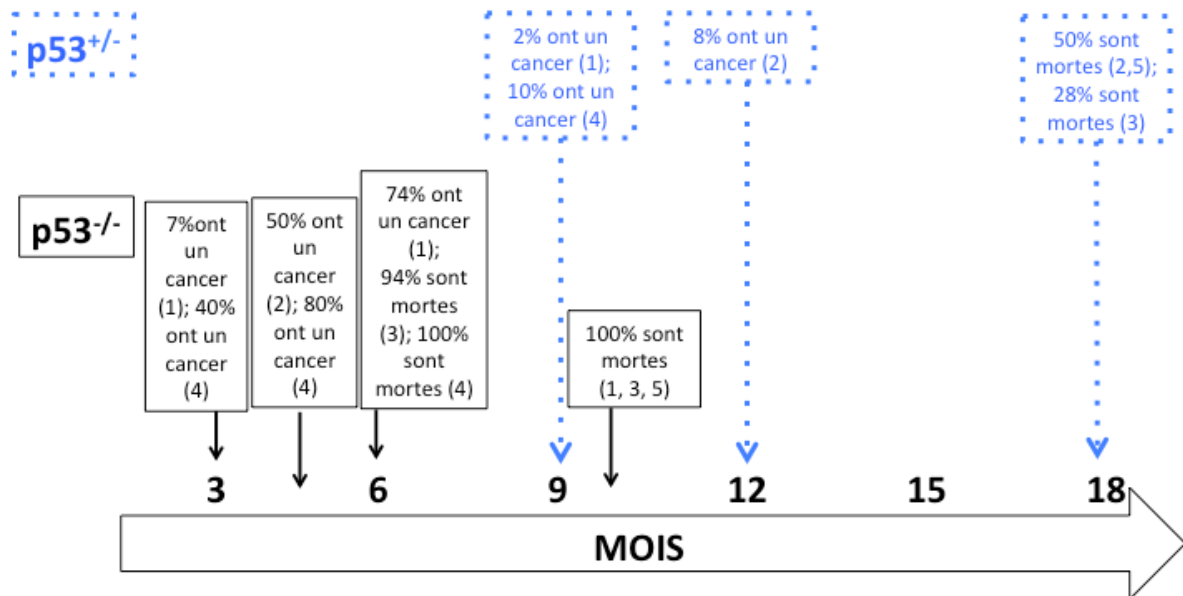


Figure 17 Les souris déficientes en p53 développent rapidement des néoplasmes et meurent prématurément.

Alors que les souris WT développent des cancers entre la 2^e et 3 année, les souris p53^{-/-} décèdent dans 100% des cas à 10 mois étant donnée la progression rapide de cancers. Les souris p53^{+/-} développent des tumeurs majoritairement entre l'âge de 1 et 2 ans. Références 1: (Donehower et al. 1992); 2: (Harvey et al. 1993); 3: (Jacks et al. 1994); 4: (Purdie et al. 1994); 5: (Venkatachalam et al. 2001).

Ainsi, si la perte de p53 favorise la progression du cancer et augmente la mortalité précocement, une plus grande activité de p53 a-t-elle l'effet inverse et prolonge-t-elle l'espérance de vie? La réponse est non! Le groupe de Lawrence Donehower au Texas, qui avait réalisé la première étude sur les souris p53^{-/-} en 1992 (Donehower et al. 1992), a montré en 2002 que les souris possédant un p53 constitutivement actif (p53^{+/*m*}) mouraient également prématurément (Tyner et al. 2002). La présence de l'allèle «*m*» augmente la stabilité de p53 et lui confère une hyperactivité chez la souris (Moore et al. 2007). Une réduction d'environ 20% dans l'espérance de vie médiane a été observée chez les souris p53^{+/*m*} comparativement aux souris WT (Tyner et al. 2002). Ces souris ont un phénotype de vieillissement accéléré comparativement aux souris WT âgées de 24 mois: ostéoporose, atrophie accélérée des muscles et des organes, plus grande perte de poids et une réparation des blessures moins efficaces (Tyner et al. 2002). De plus, plusieurs souris p53^{+/*m*} ont succombé au stress provoqué par l'anesthésiant lors du test de la réparation des blessures comparativement aux souris WT (Tyner et al. 2002). Il semble que le génotype p53^{+/*m*} favorise le vieillissement accéléré dans les tissus en ne permettant pas aux cellules dysfonctionnelles d'entrer en apoptose, étant plutôt dirigées vers la sénescence (Hinkal et al. 2009). Bien que les souris p53^{+/*m*} soient plus résistantes au développement de tumeurs, elles vieilliraient trop vite par l'accumulation de cellules sénescents (Tyner et al. 2002; Hinkal et al. 2009).

La surexpression chez la souris d'une forme tronquée de p53, le p44, provoque aussi un phénotype de vieillissement accéléré (Maier et al. 2004). Toutefois, le phénotype semble plus drastique: la fertilité des souris est affectée et l'ostéoporose s'installe dès les premiers mois de vie (Maier et al. 2004). De plus, aucune souris mâles p44 et seulement 30% des souris femelles p44 sont encore en vie à 60 semaines alors que 85% des mâles et 95% des femelles WT sont en vie (Maier et al. 2004). Il semble que ce soit l'activation continue de p53 qui provoque le vieillissement accéléré.

Chez une souris possédant plusieurs copies supplémentaires de p53, dont la régulation est normale, l'espérance de vie est comparable à celle des souris WT (Garcia-Cao et al. 2002). Chez cette «*super souris p53*», une apoptose accrue en présence d'irradiation causant des dommages à l'ADN, sans phénotype de vieillissement accéléré, est observée, contrairement à la souris p53^{+/*m*} (Garcia-Cao et al. 2002). Un autre modèle de

souris surexprimant ARF (un activateur de p53, Figure 15) et p53 (super souris ARF/p53) montre une hausse de 16% de l'espérance de vie médiane, sans toutefois augmenter l'espérance de vie maximale (Matheu et al. 2007). Les super souris ARF/p53 ont un vieillissement ralenti (déclin ralenti des fonctions neuromusculaires et capacité de la repousse des poils plus grande) qui serait attribuable à une diminution de la quantité des RS dans les splénocytes et par une diminution des dommages oxydants au niveau du foie, en lien avec une hausse d'expression des Sesn (Matheu et al. 2007). Les super souris ARF/p53 sont aussi plus résistantes face à une dose de paraquat qui induit un stress oxydant massif (Matheu et al. 2007). Ces super souris p53 (Garcia-Cao et al. 2002) et super ARF/p53 (Matheu et al. 2007) ont, contrairement aux souris p53^{+/-} (Tyner et al. 2002) et aux souris surexprimant p44 (Maier et al. 2004), une régulation normale de l'activation de p53. Il semble que les gènes activés par p53 en conditions de base (où le niveau d'activation est faible) favorisent une diminution des dommages oxydants, ralentissant du même coup le vieillissement (Matheu et al. 2007), contrairement à l'activation continue de p53 qui mène au vieillissement (Tyner et al. 2002; Maier et al. 2004).

Avec l'âge, la fonction de p53 diminue chez la souris (Feng et al. 2007b). Chez des souris âgées de plus de 20 mois soumises à des radiations- γ , l'activation de l'expression des gènes cibles de p53 (comme p21, PUMA et Bax) est moins efficace comparativement à des souris âgées de 6 mois, et ce autant dans les souches C57Bl/6, BALB/c que DBA2 (Feng et al. 2007b). Dans la souche de souris C57Bl/6 qui vivent plus longtemps que les souris DBA2, le déclin de la fonction de p53 est retardée (Feng et al. 2007b). De plus, chez les souris âgées de 20 mois et plus, p53 est moins stable ce qui mène à une diminution de l'apoptose suite à l'irradiation des souris (Feng et al. 2007b). Une diminution de l'activation d'ATM (qui permet la phosphorylation de la Ser15 de p53 en réponse aux radiations) chez les souris âgées de plus de 20 mois serait en partie responsable du déclin de la fonction de p53 (Feng et al. 2007b).

Chez l'humain, un maintien avec l'âge de la fonction de p53 a été suggéré pour expliquer la longévité de certains centenaires puisqu'un p53 fonctionnel permettrait de diminuer et de retarder le risque de cancer (Salvioli et al. 2009). Cependant, à ce jour, aucun indice clinique ne suggère un bénéfice sur le vieillissement chez l'humain d'une activité accrue

de p53. Une étude chez près de 400 centenaires (et 600 patients contrôles) ne révèle pas de différence dans la fréquence d'un polymorphisme de p53 qui diminue la capacité de p53 à induire l'apoptose (Pro/Pro sur le codon 72 (Dumont et al. 2003)) (Bonafe et al. 1999a; Bonafe et al. 1999b). Une étude chez 1226 patients âgés de 85 ans et plus a rapporté des résultats similaires à ceux observés chez les souris p53^{+/-m}: 21% des personnes porteuses de Arg/Arg sur le codon 72 (activité apoptotique supérieure (Dumont et al. 2003)) sont décédées d'un vieillissement accéléré (fatigue et fragilité accrue) par rapport à 6% des personnes porteuses de Pro/Pro (van Heemst et al. 2005). La présence et l'activation de p53 pourraient être bénéfiques et protectrices pendant la période de fertilité de l'organisme pour permettre la reproduction de l'espèce, mais deviendraient délétères à plus long terme (Ferbeyre et al. 2002; Donehower 2005). Les résultats des études décrites précédemment soulignent donc l'importance et la complexité de la relation entre p53 et le processus de vieillissement.

En résumé, la destinée cellulaire contrôlée par p53 est influencée par la capacité de réparation de la cellule, et par l'étendue des dommages. La présence, le niveau de p53 et son activité ont un impact sur la vitesse du vieillissement cellulaire et de l'organisme (Figure 18). Le niveau de p53 influe-t-il sur les cellules endothéliales qui sont susceptibles aux dommages de par leur localisation?

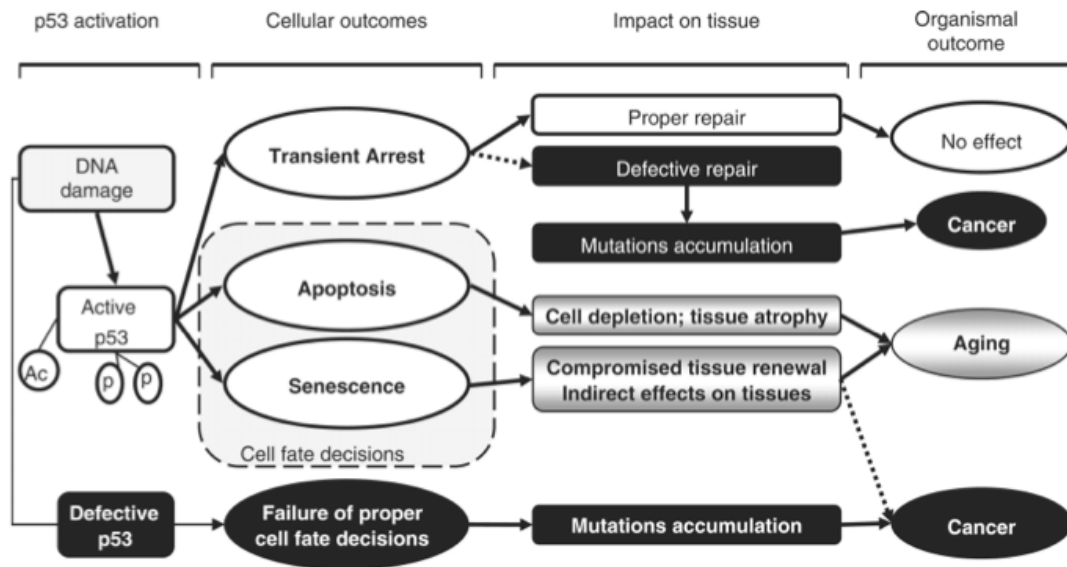


Figure 18 L'activation de p53 peut favoriser le maintien de l'intégrité cellulaire, mais peut aussi mener vers le vieillissement ou le cancer.

La réparation appropriée des dommages permet à la cellule de continuer de se développer normalement. Un accroissement de l'apoptose ou de la sénescence accélère le turnover des cellules et précipite le vieillissement cellulaire. La dysfonction de p53 et des voies qu'il contrôle est délétère pour l'organisme et dirige la cellule vers la tumorigenèse.

Réimprimé avec la permission de Oxford University Press : Nucleic Acids Research, J Rodier, J Campisi, D Bhaumik. Two faces of p53 : aging and tumor suppression. 35 (22) pp 7475-7484, Copyright (2007).

1.4.3.3 P53 et la dysfonction endothéliale

Très peu d'études se sont intéressées pour l'instant au rôle de p53 dans la fonction endothéliale. La surexpression de p53 pendant 24 heures avec un adénovirus dans les aortes de rat a provoqué une diminution de la relaxation à l'acétylcholine (Kim et al. 2008; Kumar et al. 2011), suggérant que la hausse de p53 promeut la dysfonction endothéliale. Cette dysfonction serait due à une diminution de la biodisponibilité du NO (Kim et al. 2008; Kumar et al. 2011). La surexpression de p53 a en effet provoqué une diminution de l'expression de la eNOS dans les aortes via l'inhibition transcriptionnelle de

KLF2 (Kumar et al. 2011). Le p53 empêcherait la transcription de KLF2 en activant une histone déacétylase non-identifiée qui viendrait fermer la chromatine (ce qui bloque la transcription) autour du promoteur de KLF2 (Kumar et al. 2011). Le groupe de Irani a aussi découvert que la surexpression de p53 activait l'expression de p66shc dans les cellules endothéliales en liant directement le promoteur de p66shc (Kim et al. 2008), confirmant la relation entre p53 et p66shc qui avait été rapportée dans des fibroblastes isolés de souris (Trinei et al. 2002). Kim et al. ont démontré que la hausse de p66shc induite par l'AngII était dépendante de la présence de p53 dans les cellules endothéliales humaines, et que la hausse de production de H₂O₂ par la surexpression de p53 était diminuée par un siRNA contre p66shc (Kim et al. 2008). La dysfonction endothéliale observée chez des souris WT suite à l'infusion d'AngII était absente chez des souris p66shc «*knock-down*» (siRNA dirigé contre p66shc injecté dans la souris), tout comme chez des souris WT injectées à la pifithrine- α (Kim et al. 2008), un inhibiteur de p53 (Komarov et al. 1999). Ces études ont donc montré un effet délétère de la surexpression transitoire durant 24 heures de p53 sur la relaxation dépendante de l'endothélium, et ont permis de mettre à jour un nouveau rôle vasculaire de p53 (Kim et al. 2008; Kumar et al. 2011). De plus, il semblerait que p53 participerait à l'apoptose des cellules endothéliales lorsque le flux sanguin est non-laminaire, condition qui induirait une hausse des RS qui activerait la PKC ζ (Heo et al. 2011b; Heo et al. 2013), une kinase dont l'expression est augmentée dans les lésions athérosclérotiques (Heo et al. 2011a). La PKC ζ stabiliserait p53 pour faciliter sa translocation au noyau et induire l'apoptose dans les cellules endothéliales (Heo et al. 2011b; Heo et al. 2013).

Puisque d'une part la fonction endothéliale est sensible au stress oxydant et s'altère avec l'âge et les facteurs de risque cardiovasculaire (section 1.2), et que d'autre part le p53 est impliqué dans l'équilibre *rédox* (section 1.4.3.1), le vieillissement (section 1.4.3.2) et la dysfonction endothéliale, la délétion partielle (et non complète) de p53 chez la souris amenuiserait-elle la capacité de l'endothélium à répondre face à un stress métabolique? Pour l'instant, cette question demeure sans réponse puisqu'aucune étude à ce jour ne s'y est penchée. Certaines données existent toutefois sur le rôle potentiel de p53 ou de son interaction avec les interventions (section 1.3) qui visent à ralentir le vieillissement et la dysfonction endothéliale en diminuant le stress oxydant.

1.4.4 p53 joue-il un rôle dans les interventions visant à ralentir le vieillissement vasculaire?

Les bénéfices sur l'organisme de l'exercice, des antioxydants et de la restriction calorique influencent-ils l'expression de p53? Tout comme pour les rôles méconnus de p53 (section 1.4.3), la compréhension de l'implication de p53 lors de ces interventions n'est qu'à un stade embryonnaire. Il est néanmoins envisageable que p53 participe ou utilise certains médiateurs impliqués dans les effets de l'exercice, des antioxydants et de la restriction calorique.

1.4.4.1 P53 augmente la capacité à l'exercice en stimulant la phosphorylation oxydative

Les souris p53^{-/-} ont une endurance réduite à la nage (Matoba et al. 2006), à la course forcée (Park et al. 2009) et à la course volontaire (Saleem et al. 2009). L'étude de la fonction cardiaque, de la structure et de la force musculaire a montré des résultats similaires entre les souris WT et p53^{-/-}, excluant ces paramètres comme cause possible de la moins bonne performance à l'exercice des souris p53^{-/-} (Park et al. 2009; Saleem et al. 2009). Toutefois, les souris p53^{-/-} se fatiguent plus rapidement que les souris WT lors de la contraction musculaire (Saleem et al. 2009). Cette baisse de performance à l'exercice des souris p53^{-/-} s'expliquerait par la capacité de p53 à favoriser la synthèse d'énergie via les mitochondries et la phosphorylation oxydative (Matoba et al. 2006). Le p53 régule l'expression du complexe c de la cytochrome oxydase de la mitochondrie pour la production d'énergie, en régulant l'expression de l'une des molécules clés: la synthase du cytochrome c oxydase 2 (SCO2, *synthesis of cytochrome c oxidase 2*) (Figure 19) (Matoba et al. 2006). Ainsi, en perturbant la production d'énergie par la mitochondrie, la délétion en p53 chez la souris p53^{-/-} favorise la glycolyse (plus rapide mais moins efficace que la phosphorylation oxydative) ce qui rend la souris p53^{-/-} moins endurante à l'exercice (Matoba et al. 2006). L'interaction entre p53 et SCO2 observée dans des lignées cancéreuses et des mitochondries isolées d'extraits de foie des souris (Matoba et al. 2006) n'a pas été retrouvée dans le muscle squelettique (Park et al. 2009). Il semble qu'au niveau musculaire, ce soit la régulation du facteur de transcription

mitochondrial A (TFAM, *mitochondrial transcription factor A*) par p53 qui explique cette diminution de capacité à l'exercice (Park et al. 2009).

Le p53 régule aussi l'expression de GLS2 (Hu et al. 2010; Suzuki et al. 2010), une enzyme permettant la synthèse du glutamate à partir de la glutamine (Figure 19). Le glutamate est ensuite transformé en α -cétoglutarate et entre dans le cycle de Krebs pour la production de l'ATP par la mitochondrie. L'enzyme guanidinoacétate méthyltransférase (GAMT), qui stimule l'oxydation des acides gras pour la production d'énergie, est aussi sous le contrôle transcriptionnel de p53 (Figure 19) (Ide et al. 2009). Ainsi, lorsque le niveau de glucose diminue, ou lors d'un jeûne, p53 peut fournir de l'énergie à la cellule en activant l'oxydation des acides gras via l'activation de GAMT. Le p53 peut favoriser directement la phosphorylation oxydative et améliorer la performance à l'exercice via l'activation de 4 gènes (SCO2, TFAM, GLS2, GAMT), mais il peut aussi la favoriser indirectement en inhibant la glycolyse (Figure 19). Le p53 peut inhiber dans les cellules SaOS-2 et les fibroblastes de souris l'expression des transporteurs de glucose GLUT1, GLUT3 et GLUT4 (Schwartzberg-Bar-Yoseph et al. 2004; Kawauchi et al. 2008) qui permettent l'entrée du glucose dans la cellule, le substrat de prédilection pour la glycolyse (Figure 19). Une autre cible plus directe de p53 pour inhiber la glycolyse est TIGAR (Figure 19) (Bensaad et al. 2006). L'activation de TIGAR par p53 dans les cellules U2OS et HCT116 inhibe l'enzyme phosphofructokinase 1 (Bensaad et al. 2006) qui est nécessaire à l'initiation de la glycolyse. Une autre cible permettant à p53 de ralentir la glycolyse est la protéine liant l'élément de réponse aux glucides (chREBP, *carbohydrate-responsive element-binding protein*) (Figure 19) (Tong et al. 2009). L'inhibition de chREBP par siRNA dans les cellules de cancer colorectal HCT116 a montré une diminution de la glycolyse aérobie (Tong et al. 2009), qui est la méthode privilégiée de production d'énergie pour les cellules tumorales (ou «*effet Warburg*») (Warburg 1956). De plus, l'inhibition de chREBP diminue le captage du glucose, la production de lactate, la hausse de la consommation d'oxygène, la hausse des expressions génique et protéique de p21, Mdm2 et TIGAR, tous des gènes cibles de p53 (Tong et al. 2009). Dans les cellules HCT116 déficientes en p53, l'inhibition de chREBP a peu d'effet sur le captage du glucose et les expressions de p21, Mdm2 et TIGAR, suggérant l'importance de la présence de p53 dans les effets cellulaires de chREBP (Tong et al. 2009). Cette étude suggère un autre mécanisme par lequel p53 diminue

l'entrée de glucose et la production d'énergie via la glycolyse. La promotion de la phosphorylation oxydative par p53 au détriment de la glycolyse, favorise une plus grande production d'ATP, ce qui suggère que la présence de p53 améliore la capacité à l'exercice (Figure 19).

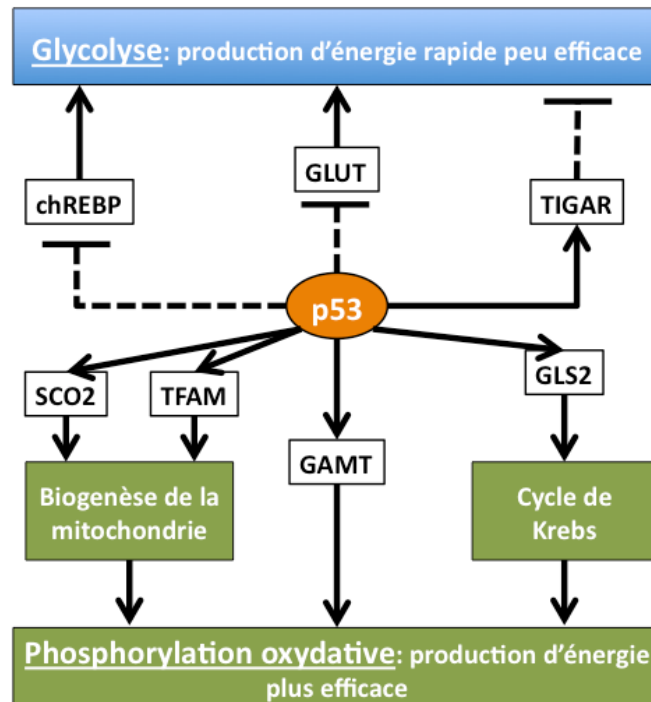


Figure 19 Le p53 active et réprime l'expression de plusieurs gènes pour favoriser la phosphorylation oxydative plutôt que la glycolyse, ce qui permet une plus grande production d'énergie et favorise les performances à l'exercice.

Le p53 favorise la phosphorylation oxydative par la mitochondrie en activant l'expression des gènes SCO2, TFAM, GAMT et GLS2. De plus, p53 vient directement inhiber le processus de glycolyse par l'inhibition de chREBP et des transporteurs de glucose GLUT, et indirectement par l'activation de TIGAR.

En résumé, p53 semble important dans le maintien de l'intégrité mitochondriale, ce qui favorise une production d'énergie accrue et augmenterait les performances à l'exercice. Un niveau insuffisant de p53 aurait un effet néfaste sur la capacité à l'exercice, comme observé chez les souris $p53^{-/-}$. Alors que le rôle de p53 dans l'exercice semble établi, celui l'impliquant dans les effets des antioxydants demeure incertain.

1.4.4.2 L'effet des antioxydants sur p53 demeure nébuleux

Depuis plusieurs années, les bienfaits des antioxydants présents dans l'alimentation sont très médiatisés. Tout comme les antioxydants sont bénéfiques dans la fonction endothéliale (voir section 1.3.2), les antioxydants pourraient participer à la prévention du cancer, maladie étroitement reliée au p53. En effet, la diète pourrait participer à raison de 30% dans la mortalité attribuable au cancer (Beliveau et al. 2007). Les constituants phytochimiques, dont font partie les antioxydants, inhiberaient le développement du cancer en réduisant les dommages à l'ADN, en induisant l'apoptose, en inhibant l'angiogenèse et en réduisant l'inflammation (Beliveau et al. 2007). Les antioxydants utilisent-ils la voie du p53? En effet, plusieurs études ont montré la capacité du resvératrol à induire des effets anticancéreux via l'activation du p53 (Huang et al. 1999; She et al. 2001; Hsieh et al. 2005; Ferraz da Costa et al. 2012). Le resvératrol augmente l'activité de p53 dans les cellules de l'épiderme de souris JB6, une lignée cellulaire non-cancéreuse (Huang et al. 1999). En accord avec cette étude, le resvératrol a provoqué une hausse dans l'expression de p21 sans changement dans l'expression génique de p53 dans la lignée cancéreuse humaine de cancer du sein MCF-7, et l'utilisation de la pifithrine- α a provoqué l'inhibition de l'apoptose induite par le resvératrol dans ces cellules MCF7 (Ferraz da Costa et al. 2012). Ainsi, le resvératrol provoquerait une modification post-traductionnelle de p53 pour favoriser sa stabilité (She et al. 2001). Dans les cellules JB6, le resvératrol favorise la phosphorylation de p53 sur la Ser15 par l'activation des MAPK (She et al. 2001). La présence de p53 semble importante pour promouvoir l'effet pro-apoptotique du resvératrol puisque l'incubation de ce dernier n'induit pas l'apoptose sur les fibroblastes isolés de souris p53^{-/-} (Huang et al. 1999). Le resvératrol utiliserait donc p53 pour induire l'apoptose et provoquer ses effets anticancéreux. À l'inverse, le resvératrol chez la levure (Howitz et al. 2003; Wood et al. 2004), la mouche à fruits (Wood et al. 2004; Bauer et al. 2009), et sur des cellules endothéliales (Gracia-Sancho et al. 2010) ainsi que la catéchine chez la souris (Gendron et al. 2012) ont démontré leur capacité à activer la Sirt-1 qui est connue pour déstabiliser le p53. Ainsi, le lien entre les antioxydants et le p53 semble complexe et le contexte cellulaire semble primordial dans le lien entre ces derniers. Alors qu'un traitement chronique de 9 mois à la catéchine chez des souris a activé l'expression de la Sirt-1 dans les aortes (Gendron et al. 2012), le dérivé de la catéchine épigallocatechine-3-gallate a

stimulé des histones déacétylases qui favorisent la stabilisation et l'activation de p53 dans des cellules cancéreuses humaines (Thakur et al. 2012). Le contexte cellulaire demeure donc critique dans les voies de signalisation activées par les antioxydants, ainsi que leurs effets directs ou indirects (par exemple via la Sirt-1) sur p53.

En résumé, le lien entre les effets des antioxydants et de p53 demeure incertain pour l'instant et fortement dépendant du contexte cellulaire. Il serait intéressant de comparer les effets de différents antioxydants sur l'expression et la fonction de p53, puisque pour l'instant la majorité des preuves proviennent d'études utilisant le resvératrol.

1.4.4.3 Le p53 et la restriction calorique utilisent des mécanismes similaires

Contrairement à l'exercice et aux antioxydants qui activent directement p53, la relation entre la restriction calorique et p53 provient plutôt du fait qu'ils activent les mêmes gènes ou des gènes similaires affectant la survie de la cellule, principalement via le processus d'autophagie (Figure 20) (Tucci 2012). Le p53 serait d'ailleurs pressenti pour être un acteur important dans la restriction calorique (Tucci 2012), bien qu'à mon sens les données ne sont pas suffisantes pour l'affirmer.

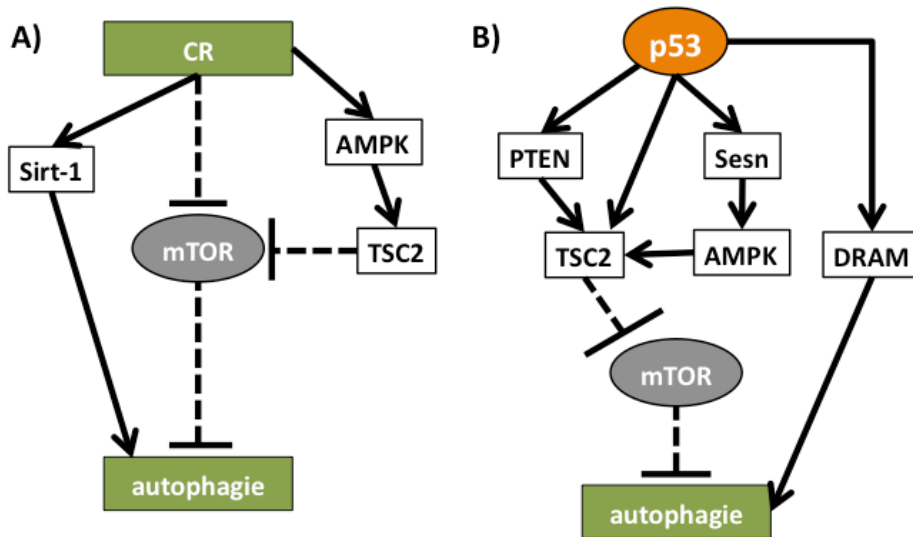


Figure 20 La restriction calorique (A) et p53 (B) favorisent de la même façon l'expression de plusieurs gènes clés dans le processus de l'autophagie.

La restriction calorique (A) et p53 (B) stimulent l'autophagie en inhibant mTOR via différents gènes qui modulent TSC2 (une des protéines du complexe de mTOR), ou en activant directement l'autophagie grâce à la Sirt-1 pour la restriction calorique ou DRAM pour le p53. AMPK: protéine kinase activée par l'AMP; CR: restriction calorique; DRAM: modulateur de l'autophagie régulé par les dommages; mTOR: cible de la rapamycine chez les mammifères; Sesn: sestrines; Sirt-1: sirtuine-1.

L'autophagie constitue un mécanisme cellulaire bénéfique permettant de dégrader les protéines dysfonctionnelles. La restriction calorique et p53 sont tous deux en mesure d'activer le processus d'autophagie (Figure 20). Le p53 peut agir directement sur la voie de l'autophagie, en contrôlant l'expression de DRAM, un des gènes clés dans le processus d'autophagie (Crighton et al. 2006). Le p53 peut aussi produire un effet inhibiteur sur la cible de la rapamycine chez les mammifères (mTOR, *mammalian target of rapamycin*), une protéine favorisant la croissance cellulaire et la synthèse protéique (Wullschlegel et al. 2006) dont l'inhibition activerait l'autophagie (Ingram et al. 2011), via l'AMPK (Feng et al. 2005) et par la régulation d'une sous-unité régulatrice qui inhibe l'activation de mTOR, le TSC2 (*tuberculosis sclerosis 2*). L'AMPK peut phosphoryler et activer TSC2 lorsque le glucose est absent pour permettre à la cellule de stopper les processus anaboliques (Inoki et al. 2003). En activant l'expression de TSC2, p53 peut ralentir la prolifération et la croissance cellulaire et favoriser l'autophagie (Feng et al.

2005). La régulation de TSC2, tout comme l'activation de l'AMPK, serait dépendante des gènes antioxydants *Sesn1* et *2* (Budanov et al. 2008). La transfection des *Sesn1* et *2* dans les cellules HEK293, qui sont sous la régulation transcriptionnelle de p53 (Velasco-Miguel et al. 1999; Budanov et al. 2002), a provoqué l'inhibition de mTOR (Budanov et al. 2008). Cette inhibition a été renversée dans les cellules *TSC2^{-/-}* et par l'inhibition de l'AMPK (par le composé C), démontrant l'importance de TSC2 et de l'AMPK pour induire l'effet des *Sesn* sur la voie de mTOR (Budanov et al. 2008). Le stress induit par l'utilisation de la camptothecin et du N-Nitrosodiéthylamine, respectivement un inhibiteur de la topoisomérase et un agent alkylant, active p53 et provoque l'inhibition de mTOR *in vivo* chez la souris *Sesn2^{+/+}*, mais pas chez la souris *Sesn2^{-/-}* (Budanov et al. 2008). Ainsi, cette étude suggère que les *Sesn* formeraient un complexe avec l'AMPK et TSC2 et recevraient l'«*input*» de p53 pour inhiber mTOR via TSC2 (Budanov et al. 2008). Le gène suppresseur de tumeur phosphatase et homologue de la tensine (ou PTEN), dont l'expression est contrôlée par p53 (Stambolic et al. 2001), peut aussi activer TSC2 et ainsi inhiber mTOR (Feng et al. 2007a). Tous ces effecteurs permettent au p53 de favoriser l'autophagie, et potentiellement de promouvoir les mêmes bénéfices que la restriction calorique (Figure 20) (Tucci 2012).

En accord avec cette hypothèse, le groupe de Helfand au Connecticut a tout d'abord démontré que la surexpression d'une forme inactive (dominante-négative) de p53 dans les neurones de la drosophile provoque une hausse de l'espérance de vie (Bauer et al. 2005). Toutefois, lorsque ces mouches sont soumises à une restriction calorique, aucun effet supplémentaire n'a été observé, suggérant que p53 et la restriction calorique empruntent le même mécanisme (Bauer et al. 2005). Puis, l'utilisation d'une approche bioinformatique a révélé que la restriction calorique et l'inactivation de p53 activaient un patron d'expression de gènes similaire dans les neurones de la mouche (Antosh et al. 2011). Ces résultats ont toutefois été contredits par la démonstration que les souris *p53^{-/-}* soumises à une restriction calorique de 40% ont une survie médiane augmentée de 16 à 25 semaines, fait attribué à un retard dans l'apparition des cancers (Hursting et al. 1994). La proposition selon laquelle p53 est l'un des médiateurs clés de la restriction calorique (Bauer et al. 2005; Tucci 2012) ne peut donc pas être généralisée pour l'instant. Il n'en demeure pas moins que p53 et la restriction calorique utilisent des médiateurs et des voies similaires pour influencer le devenir de la cellule (Figure 20).

En conclusion, que ce soit en activant la phosphorylation oxydative, l'autophagie, l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose, p53 a pour objectif ultime la survie de l'organisme. Il active plusieurs processus cellulaires qui diffèrent selon la circonstance et le niveau de stress. La découverte du rôle de p53 dans la régulation de l'équilibre *rédox* (Sablina et al. 2005), par exemple, a été majeure et a permis d'identifier une nouvelle propriété de p53 à réguler la survie cellulaire. Peu importe la voie utilisée par le gardien du génome, p53 permet de maintenir l'intégrité des cellules endothéliales.

2. OBJECTIFS DES ÉTUDES

2.1 Mise en contexte

L'endothélium est sensible à l'environnement vasculaire auquel il est exposé: les facteurs de risque cardiovasculaire (hypertension, diabète, dyslipidémie, sédentarité, tabagisme, stress mental) engendrent un stress oxydant et une inflammation qui créent un environnement délétère pour l'endothélium (Versari et al. 2009a), tandis que l'exercice physique, une nutrition saine et la restriction calorique sont bénéfiques pour le maintien de la fonction endothéliale en diminuant le stress oxydant et l'inflammation. Certains gènes impliqués dans le vieillissement comme le gène suppresseur de tumeurs p53, la Sirt-1 (Mattagajasingh et al. 2007) et p66shc (Migliaccio et al. 1999) influencent la fonction endothéliale et le stress oxydant. L'âge auquel progressent les facteurs de risque cardiovasculaire, de même que la période à laquelle les différentes interventions bénéfiques (exercice, nutrition, restriction calorique) sont initiées auront un impact différent sur la fonction endothéliale. La phase de maturation des cellules endothéliales pendant laquelle celles-ci se développent apparaît comme un moment critique: pendant cette phase de maturation, les mécanismes de défenses endothéliales (comme les enzymes antioxydantes) se mettent en place pour permettre une protection adéquate à long terme. Ainsi, un changement drastique dans l'environnement vasculaire pendant la phase de maturation pourrait avoir des conséquences importantes dans le développement des cellules endothéliales. Par exemple, l'environnement vasculaire bénéfique induit par l'exercice physique permettra-t-il une phase de maturation vasculaire optimale, avec une mise en place efficace de mécanismes de défenses? La perte du gène suppresseur de tumeurs p53, qui agit comme un senseur de stress, ralentira-t-elle le développement de ces mêmes mécanismes de défenses au niveau vasculaire, rendant l'endothélium plus sensible aux dommages?

2.2 Étude 1

La pratique régulière de l'exercice physique et la consommation d'antioxydants ont montré leur capacité à prévenir la dysfonction endothéliale associée aux facteurs de risque cardiovasculaire chez l'humain et dans les modèles animaux (voir sections 1.3.1 et 1.3.2). Inversement, l'inactivité physique accélère le développement de la dysfonction endothéliale et de l'athérosclérose chez la souris (Laufs et al. 2005), et la sédentarité altère la fonction endothéliale chez l'humain (Hamburg et al. 2007; Navasolava et al. 2010). Alors que l'exercice et l'inactivité physique semblent avoir le même impact peu importe le moment où ils sont initiés, ce ne semble pas être le cas pour la supplémentation avec des antioxydants.

Une étude précédente du laboratoire a démontré que la consommation du polyphénol catéchine entre l'âge de 3 et 12 mois a un effet différent de lorsqu'il est donné tardivement (entre 9 et 12 mois) chez les souris C57Bl/6 (Gendron et al. 2012). La catéchine consommée entre 9 et 12 mois prévient la dysfonction endothéliale observée dans les artères rénales, l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium et prévient la hausse de l'expression génique de COX2 dans les aortes qui sont observées avec l'âge (Gendron et al. 2012). En revanche, la catéchine administrée entre 3 et 12 mois a provoqué le développement d'un profil vasculaire délétère chez les souris C57Bl/6 qui seraient peu résistantes au stress (Gendron et al. 2012). En effet, la catéchine pendant la phase de maturation des cellules endothéliales n'a pas prévenu la diminution de la sensibilité à l'acétylcholine observée avec l'âge dans les artères rénales, a augmenté les expressions géniques aortiques de COX2 et de p22phox, tout en diminuant celle de SOD2 suggérant un profil *rédox* délétère (Gendron et al. 2012). Chez des souris dyslipidémiques, les effets sont diamétralement opposés: la catéchine entre 9 et 12 mois ne renverse pas les dommages vasculaires et la catéchine entre 3 et 12 mois diminue les dommages oxydants aortiques, prévient le développement de la plaque athérosclérotique et préserve la fonction endothéliale dans les artères rénales (Gendron et al. 2010). Chez ces souris dyslipidémiques qui ont un vieillissement vasculaire accéléré, la consommation tardive de catéchine ne parvient pas à récupérer les dommages irréversibles et a même tendance à les exacerber (Gendron et al. 2010).

En accord avec la théorie de l'hormesis, la présence d'une certaine quantité de RS serait bénéfique (Gomez-Cabrera et al. 2005; Fisher-Wellman et al. 2009; Ristow et al. 2009), et ce vraisemblablement pendant la phase de maturation (Thorin-Trescases et al. 2010; Gendron et al. 2012). La présence de la catéchine chez les souris WT en bas-âge semble avoir altéré la signalisation intracellulaire nécessaire au bon développement du système vasculaire, créant un profil endothélial délétère (Gendron et al. 2012). Cependant, ces dommages oxydants et cette fonction endothéliale altérée observée chez les souris C57Bl/6 sont-ils permanents? L'arrêt de la catéchine pendant la phase de maturation aurait-il pu renverser les effets délétères observés sur les cellules endothéliales (Gendron et al. 2012)? Selon le même raisonnement, les bienfaits vasculaires de l'exercice physique disparaissent-ils une fois l'exercice arrêté? La supplémentation en antioxydants et la pratique de l'exercice physique pendant la phase de maturation laisseront possiblement une empreinte différente dans les cellules endothéliales. Ces différentes empreintes laissées par l'exercice et la catéchine induiront une réponse vasculaire distincte lorsqu'un stress métabolique viendra «agresser» l'endothélium.

2.2.1 Hypothèse

Chez les souris C57Bl/6, un régime d'exercice physique pendant la phase de maturation produira des bénéfices vasculaires supérieurs par rapport à l'inactivité physique. À l'inverse, la consommation d'un antioxydant (catéchine, sans exercice) durant cette même phase de maturation ne permettra pas à l'endothélium de se développer adéquatement et aura des effets délétères. Une fois l'exercice physique arrêté, le profil vasculaire bénéfique «*imprimé*» par l'exercice permettra de préserver une fonction endothéliale adéquate face à l'introduction d'un stress métabolique induit par une diète riche en gras, contrairement aux souris inactives ayant consommées ou non l'antioxydant catéchine.

2.2.2 Objectifs spécifiques

Dans cette étude, nous avons utilisé 3 groupes de souris C57Bl/6: un groupe de souris qui a fait de l'exercice volontaire (accès à une roue dans leur cage) à partir du 1^{er} mois de leur vie jusqu'au 9^e mois, un groupe de souris inactives physiquement (sans roue) recevant ou non l'antioxydant catéchine dans l'eau de boisson pendant la même période. Au 9^e mois de vie, l'accès aux roues d'exercice a été arrêté ainsi que la supplémentation en catéchine dans l'eau de boisson. Les souris ont alors reçu une diète régulière ou une diète riche en gras à partir de 9 mois et ce jusqu'à leur sacrifice à l'âge de 12 mois. Ce design expérimental particulier visait à répondre à 3 objectifs spécifiques:

- 1) Déterminer les effets sur la fonction endothéliale de 8 mois d'exercice volontaire ou d'inactivité physique avec ou sans antioxydant;
- 2) Déterminer si les effets sur la fonction endothéliale produits par l'exercice ou l'antioxydant catéchine en bas-âge disparaissent après un arrêt de 3 mois;
- 3) Déterminer si l'exercice volontaire et la catéchine laisseront une empreinte vasculaire suffisante pour, respectivement, prévenir ou accentuer la dysfonction endothéliale engendrée par la consommation d'une diète riche en gras pendant 3 mois (en absence d'exercice et de catéchine).

2.3 Étude 2

Le p53 est requis pour éviter des dommages cellulaires irréversibles en période de stress. Au niveau vasculaire, p53 a-t-il le même rôle?

À la fin des années 1990, il a été observé que l'expression de p53 est augmentée dans la plaque de patients coronariens (Ihling et al. 1998). Le p53 y serait activé pour répondre aux dommages à l'ADN et à la hausse de stress oxydant retrouvés dans la lésion athéromateuse (Mercer et al. 2007). En effet, la présence de cytokines pro-inflammatoires qui proviennent des macrophages stimule la production de RS, ce qui induit des dommages à l'ADN et active p53 (Ihling et al. 1998). Dans les cellules endothéliales isolées de patients coronariens fumeurs, une augmentation de l'expression génique de p53 a été observée par rapport aux cellules isolées de patients coronariens

non-fumeurs (Farhat et al. 2008). Cette hausse de p53 serait associée à une hausse du stress oxydant et à une sénescence prématurée (Farhat et al. 2008). De même, dans les cellules endothéliales isolées de patients coronariens, l'expression de p53 augmente parallèlement avec la sénescence et les dommages moléculaires provenant des facteurs de risque cardiovasculaire des patients (Voghel et al. 2007). Un traitement de ces mêmes cellules avec le N-acétyl-cystéine a permis de réduire le stress et les dommages oxydants, de diminuer l'expression de p53 et de ralentir la sénescence (Voghel et al. 2008). Le p53 est donc activé au niveau vasculaire en réponse à un stress oxydant associé aux facteurs de risque cardiovasculaire.

Chez les souris p53^{-/-}, une progression plus rapide des VSMC dans la plaque athéromateuse est observée (Guevara et al. 1999; Mercer et al. 2005). Les VSMC isolées de ces souris sont aussi moins aptes à se protéger face à la hausse de stress oxydant provenant des molécules donneuses de NO (Popowich et al. 2010): les VSMC isolées de souris p53^{-/-} ont un taux plus élevé de RS et d'apoptose en présence de DETA/NO comparativement aux VSMC isolées de souris p53^{+/+} (Popowich et al. 2010). En accord avec le nouveau rôle antioxydant de p53 observée dans les cellules cancéreuses (Sablina et al. 2005), p53 permettrait la hausse de l'expression de Prdx3 et de Trx2 pour diminuer le stress oxydant et favoriser la survie des VSMC en présence de DETA/NO (Popowich et al. 2010). Cependant, le rôle antioxydant de p53 dans les cellules endothéliales n'est pas connu.

L'étude de Sablina et al. démontre que p53 doit être présent en petite quantité et non absent pour être bénéfique (Sablina et al. 2005). L'équilibre *redox* est-il régulé par p53 au niveau endothélial afin de prévenir la dysfonction endothéliale lors du vieillissement ou en présence de facteur de risque cardiovasculaire? La surexpression transitoire de p53 a montré un effet délétère sur la fonction endothéliale (Kim et al. 2008; Kumar et al. 2011). La diminution partielle de p53 chez la souris serait-elle favorable pour la fonction endothéliale ou induirait-elle une capacité amoindrie des souris p53^{+/-} à faire face aux stress occasionnés par les facteurs de risque cardiovasculaire comme la dyslipidémie?

2.3.1 Hypothèse

Le gène suppresseur de tumeurs p53 est requis pour faire face à un stress au niveau vasculaire et pour le maintien de l'homéostasie vasculaire en contrôlant l'expression de gènes clés dans la régulation de l'équilibre *rédox* et dans le contrôle de la fonction endothéliale. Une diminution partielle de p53 réduit la réponse au stress des souris p53^{+/-} face au stress induit par une diète riche en gras, rendant les cellules endothéliales plus sensibles aux effets délétère de la diète riche en gras.

2.3.2 Objectifs spécifiques

Dans cette étude, nous voulions déterminer si la diminution de l'expression de p53 chez les souris p53^{+/-} pendant la phase de maturation des cellule endothéliales:

- 1) affecte la régulation des gènes antioxydants et la fonction endothéliale;
- 2) a un effet sur la capacité des cellules endothéliales à résister à un stress induit par la diète riche en gras.

3. Articles

3.1 Article 1

Titre: Post-natal exposure to voluntary exercise but not the antioxidant catechin protects the vasculature after a switch to an atherogenic environment in middle-age mice.

Cet article a été accepté pour publication dans le journal Pflügers Archives - European Journal of Physiology le 10 décembre 2012.

3.1.1 Apport original et contributions des coauteurs

François Leblond : Conception du projet, cueillette des données, réalisation de la majorité des expériences, analyse des données, interprétation des résultats, rédaction et révision du manuscrit.

Albert Nguyen : Réalisation d'expériences (artères fémorales) et révision du manuscrit.

Virginie Bolduc : Réalisation d'expériences (artères cérébrales) et révision du manuscrit.

Jean Lambert : Analyses statistiques et révision du manuscrit.

Carol Yu : Réalisation d'expériences (dosage insuline).

Natacha Duquette : Cueillette de données (pressions artérielles).

Éric Thorin : Conception du projet, interprétation des résultats, rédaction et révision du manuscrit soumis.

3.1.2 Manuscrit

Post-natal exposure to voluntary exercise but not the antioxidant catechin protects the vasculature after a switch to an atherogenic environment in middle-age mice

Francois Leblond^{1,4}, Albert Nguyen^{1,4}, Virginie Bolduc^{1,4}, Jean Lambert², Carol Yu^{1,4}, Natacha Duquette⁴, Eric Thorin^{1,3,4}

Departments of Pharmacology¹, Social² and Preventive Medicine and Surgery³, Faculty of Medicine, Université de Montréal, and Research Centre⁴, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada

Short title: Vascular imprinting of exercise and catechin

Corresponding author: Dr. Eric Thorin, Research Centre, Montreal Heart Institute

Word counts: 6021

Word count of abstract: 241

Abstract

We aimed to evaluate the lasting functional imprinting of exercise and catechin on the vascular function of middle-age mice switched to a pro-atherogenic environment. C57Bl/6J mice (n=10-15 in each group) fed a regular diet (RD) were exposed from the age of 1 to 9 months either to exercise (EX; voluntary running; 2.7 ± 0.2 km/day), to the polyphenol catechin (CAT; 30 mg/kg/d in drinking water) or to physical inactivity (PI). At 9 months of age, EX and CAT were stopped and mice either remained on the RD or were fed a western diet (WD) for an additional 3 months. At 12 months of age, mice from all groups fed a WD had similar body mass, systolic blood pressure and plasma total cholesterol, glucose, insulin and isoprostane. Compared to the RD, the WD induced an indomethacin-sensitive aortic endothelium-dependent and independent dysfunction in PI mice ($p<0.05$) that was prevented by both EX and CAT; this benefit was associated with a higher ($p<0.05$) non-NO/non-prostacyclin endothelium-dependent relaxation. While EX, but not PI or CAT, prevented vascular dysfunction induced by the WD in cerebral arteries, it had no effect in femoral arteries. The profiles of activity of antioxidant enzymes and of pro-inflammatory gene expression in the aorta suggest a better adaptation of EX > CAT > PI mice to stress. In conclusion, our data suggest that a post-natal exposure to EX but not CAT imprints an adaptive defense capacity in the vasculature against a deleterious change in lifestyle.

Key words: physical inactivity, western diet, endothelium, antioxidant enzymes, vascular smooth muscle cells.

Introduction

Beyond genetic susceptibilities, the environment we live in is the main determinant of our health span [9]. It starts during the intrauterine environment that influences health outcome at adult age, as low birth-weight is associated with an increased risk of diseases [2]. Epidemiological studies have clearly established that a life-long healthy lifestyle, composed of moderate but regular physical exercise (EX) and a balanced diet, prolongs lifespan and reduces the odds of developing cardiovascular diseases (CVD) [10, 16, 45, 46, 59, 76]. The detrimental effects of the so-called “western diet and lifestyle” on the cardiovascular system have therefore been established by numerous studies showing the contribution of physical inactivity and poor quality / high calorie intake on the development of obesity, hypertension, diabetes and CVD [9, 37].

The primary target for stress induced by risk factors for CVD is the vascular endothelium. While not a medical condition, a chronic endothelial dysfunction is the initiating step of the atherosclerotic process [14, 73, 74]. Numerous preclinical studies have confirmed the cardiovascular benefits of EX on the endothelial function in aging mice [20], obese rats [7], and apoE^{-/-} mice fed a high fat diet [38]. In addition, the antioxidant polyphenol catechin (CAT) can prevent endothelial dysfunction in severely dyslipidemic mice if initiated early in life [19, 25]; we found, however, that a chronic treatment with CAT was not effective, and even deleterious if started in mice with established atherosclerosis [25], confirming the results of numerous clinical trials [66]. In contrast, the endothelial function of arteries from 1-year old healthy C57Bl/6 mice benefited more from CAT when initiated at the age of 9 months than when initiated at the age of 3 months [26]. Altogether, these data, in agreement with the clinical trials, suggest that i) the timing of the treatment and ii) the environment (oxidative stress, inflammation) determine the endothelial protection given by antioxidants. It is unknown, however, if a healthy lifestyle, including EX, imprints the vascular endothelium, providing a better adaptive capacity to maintain its function against a deleterious and chronic change in environment.

In this study, we used two preventive interventions, voluntary EX and CAT, in young mice to test the hypothesis that these interventions will impose a unique molecular imprint to the endothelium, leading to a differential vascular reactivity after a switch in lifestyle at mid-life. Our data demonstrate that life-long physical inactivity combined or not with CAT limits the adaptive defense capacity of the vasculature compared to EX. They suggest, in agreement with our initial paradigm, that the magnitude of the age-dependent vascular dysfunction is directly related to its ability to limit the accumulation of damage.

Methods

The procedures and protocols in our study were approved by the Montreal Heart Institute Animal Ethics Committee and performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care* and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* of the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996).

Animals. C57Bl/6J 1-month old male mice (n= 10-15 per group) were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). Animals were kept under standard conditions (24°C; 12:12 hr light/dark cycle). At 1 month of age, mice were randomly selected to perform voluntary EX, receive CAT or neither (PI) until the age of 9 months (Supplementary Fig. S1). EX mice had free access to a running wheel (Lafayette Instrument, Lafayette, IN, USA) without reward [5] and ran an average of 2.7 ± 0.2 km/day over the 8-month period of exposure. The polyphenol CAT was dissolved in the drinking water to deliver a daily dose of 30 mg/kg previously shown to lower oxidative stress [18, 25] prevent endothelial dysfunction and arterial wall remodelling [6, 19, 24, 25] and improve cognition [18]. During that period, all mice were fed a regular diet (RD, 2018; Harlan Teklad Laboratories, Madison, WI, USA). At 9 months of age, EX and CAT were stopped. Mice were either sacrificed for study, or were randomly assigned to receive a 3-month RD or western diet (WD, 88137; Harlan Teklad Laboratories, Madison, WI, USA) until the age of 12 months (Fig. S1). During the 11 months of experimentation, blood pressure was recorded every other week by tail-plethysmography (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA) as described before [6]. Values of systolic blood pressure (SBP) presented are a mean of the measures obtained during the last 3 sessions of recording prior to sacrifice. Food consumption was measured in each group one week before the age of 9 and 12 months. We observed that EX mice ate less ($p<0.05$) at 9 months than PI mice (g/day, PI= 4.0 ± 0.1 , EX=

3.4±0.2, CAT= 3.8±0.1, n= 9-10). Following the WD, EX and CAT mice ate less ($p<0.05$) than PI mice (g/day, PI= 3.9±0.1, EX= 3.3±0.1, CAT= 3.4±0.2, n= 7-10). At 9-months of age, EX mice had no access to the running wheel at least 48 hours before euthanasia to avoid an acute effect of EX. Mice were fasted overnight before their morning terminal anaesthesia (44 mg/kg ketamine and 2.2 mg/kg xylazine). Blood was collected and plasma was frozen at -80°C. Thoracic and abdominal aortas were harvested and placed in ice-cold physiological salt solution (PSS, pH 7.4, mmol/l: 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.18 KH₂PO₄, 1.17 MgSO₄, 24.9 NaHCO₃, 1.6 CaCl₂, 0.023 EDTA, and 10 glucose). Thoracic aortas were cut in 2-mm rings for vascular reactivity studies or embedded in OCT for immunostaining. Abdominal aortas were snap-frozen in liquid nitrogen and used for enzymatic activity and qPCR studies. Femoral arteries were harvested and placed in ice-cold PSS to isolate a 2-3 mm length arterial vessel for endothelial function and compliance studies. Brain was removed from its cranial cavity and placed in ice-cold PSS to isolate posterior cerebral arteries (PCA) for endothelial function and compliance studies as previously reported [5].

Plasma parameters. Cholesterol and glucose levels were measured at the Montreal Heart Institute Clinical Biochemistry Laboratory (Montreal, QC, Canada). 8-iso-prostaglandin F_{2α} (isoprostane, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) and insulin (Alpco Diagnostics, Salem, NH, USA) were quantified using commercial kits and according to the manufacturers' protocols.

Endothelial function in aortas. Rings of 2 mm isolated from the thoracic aorta were mounted on 20-μm tungsten wires in microvessel myographs (IMF, University of Vermont, Burlington, VT, USA) as previously described [70]. Vessels were stretched to obtain an optimal basal tension of 1.5 g as determined in preliminary studies; no differences in basal tension were observed between groups (data not included). The viability of the arterial rings was tested with a 40 mM KCl-PSS solution. After 2 washout periods, the vessels were equilibrated for 30-45 minutes alone, in the

presence of Nω-nitro-L-arginine (L-NNA, 100 μM, a NOS inhibitor), indomethacin (10 μM, a non-selective cyclooxygenase inhibitor) or with both L-NNA and indomethacin to study non-NO/non-prostanoid-dependent relaxations. First, a concentration-response curve with the thromboxane A₂ analog 9,11-Dideoxy-11α,9α-epoxy-methano-prostaglandin F_{2α} (U46619, 0.1 nM to 10 μM) was obtained for each group (n= 3-5, in duplicate) to measure the EC₅₀ (Table S1). In subsequent experiments (n= 3-9 per group), aorta segments were pre-constricted at the EC₅₀ and relaxation curves to acetylcholine (ACh, 0.1 nM to 30 μM) and sodium nitroprusside (SNP, 0.1 nM to 30 μM) were performed. Two consecutive concentration-response curves separated by 30-45 minutes washout periods were obtained from each aortic segment. Preliminary studies showed no effect of consecutive random concentration-response curves on the relaxation (data not included). The maximal contraction was obtained at the end of the protocol by adding 127 mM KCL-PSS.

Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Total RNA extraction was performed with RNeasy mini-kit (Qiagen Canada, Toronto, ON, Canada) following manufacturer's protocol. RT reaction (100 ng total RNA) was performed as previously [24] using the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (200 U, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). qPCR were performed with platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Primers were selected in 2 different exons spanning a large intronic sequence to avoid amplification of genomic DNA (Table S2). Annealing and elongation temperatures, cDNA template quantity and primer concentrations were optimized for each pair of primers to generate a standard curve with an efficacy of 100±10%. Cyclophilin A was used as a normalizer and relative gene expression was calculated by the ΔΔCT method [53].

Antioxidant enzyme activity in aortas. Abdominal aortas were disrupted with a mortar and pestle on dry ice and kept at -80°C . The powder was manually homogenized in either HEPES buffer (pH 7.2, mmol/L: 20 HEPES, 1 EGTA, 210 mannitol, 70 sucrose) for catalase and superoxide dismutase 2 (SOD2) assays, or Tris-HCl buffer (pH 7.5, mmol/L: 50 Tris-HCl, 5 EDTA, 1 DTT) for glutathione peroxidase (GPx) assay. Samples homogenized in the HEPES buffer were split in 2 tubes and centrifuged 5 minutes at $1500g$ (4°C) for SOD2 assay, or 15 minutes at $10\ 000g$ (4°C) for catalase activity. Samples for GPx assay were centrifuged for 15 minutes at $10\ 000g$ (4°C). An aliquot of each sample was kept to measure protein concentration (Bradford assay). Further steps were performed as recommended by the manufacturer's protocol (Cayman chemical company, Ann Arbor, MI, USA). SOD2 activity was determined in the presence of 1 mM of potassium cyanide to block copper-zinc SOD activities [62]. Activity values (Units) were adjusted with protein content.

Endothelial function in femoral arteries. Segments of the left or right *gracilis* artery were dissected in ice-cold PSS to remove surrounding fat and tissues [35]. A 2-3 mm length arterial segment was isolated, cannulated at both ends and pressurized at 80 mm Hg in non-flow condition in a pressure myograph. Internal pressure was maintained constant and real time diameter changes were monitored using a pressure servo-control and a video dimension analyzer, respectively (Living System, Burlington, Vermont, USA). All experiments were conducted on segments with an internal diameter of 175-210 μM when pressurized at 80 mm Hg. An equilibration time of 45 minutes was allowed before starting the experiment. A single cumulative concentration-response curve to Ach (1 nM to 30 μM) was obtained in vessel pre-constricted with phenylephrine (1-30 μM). L-NNA, indomethacin or a combination of both drugs was added during the equilibration period.

Endothelial function in cerebral arteries. PCA were isolated, cannulated at both ends, and pressurized as previously described [17]. Flow-mediated dilations (FMD) were induced on phenylephrine (30 μ M) pre-constricted arteries [6]. Arteries were perfused with PSS and aerated with 12%O₂/5%CO₂/83%N₂. A single cumulative curve (from 0 to 20 dynes/cm², with 2 dynes/cm² steps between 0 and 10 dynes/cm² followed by two 5 dynes/cm² steps, at constant pressure of 60 mmHg) was performed on each segment [5]. The flow rate through the lumen (Q) (ml/s) required to match a given shear stress value (τ =dyn/cm²) was calculated for each point on the curve according to $Q=\tau\pi r^3/4\eta$, where η represents the viscosity (0.009 Poise) and r is the inside radius (cm). The applied calculated shear stress was in the physiological range (\approx 0-25 dynes/cm²) [42, 50]. The data are presented as the % of maximal dilation for every shear stress value.

Compliance studies in femoral and cerebral arteries. Femoral and PCA were used for the *in vitro* assessment of the compliance, measured in passive conditions to reflect mechanical properties of the vascular wall [5, 6]. Passive pressure-diameter curves were conducted in a Ca²⁺-free PSS containing 1 mM of EGTA and 10 μ M of SNP in order to abolish myogenic tone and to solely assess the mechanical properties of the arteries. Phenylephrine (10 μ M) never induced a reduction in diameter in these conditions (data not shown). Lumen diameter and outer diameter changes were measured after each increment in the intra-luminal pressure (from 10-120 mm Hg, with a first 10 mm Hg step followed by a 20 mm Hg steps) in order to calculate mechanical parameters of the arterial wall. The circumferential wall strain (Strain, %) was calculated according to $[(D-D_{10\text{mm Hg}}) / D_{10\text{mm Hg}}]$, where D is the diameter at a given pressure and D_{10mmHg} is the initial diameter at the initial pressure. The circumferential wall stress (stress, dyn/cm²) was calculated according to $[(P \times 1,334 \times D / 2) \times \text{wall thickness}]$, where P is the given intraluminal pressure (1 mm Hg = 1,334 dyn/cm²) and wall thickness (μ M) is calculated with $[(\text{external$

diameter – lumen diameter)/2]. The stress-strain relationship was calculated by fitting the data to a nonlinear exponential curve ($\text{stress} = \text{stress}_0 e^{\beta \text{strain}}$), where stress_0 is the value when strain equals 0, and β is a constant representing Young's elastic modulus (YEM).

Statistical analyses. All groups were composed of 10 mice, except for CAT of 12 months fed RD or WD (n=15). The “n” refers to the number of animals used in each protocol. A study number of 4 animals per group of experiments has 90% power to detect a 30% absolute variation in vascular reactivity, the most variable parameter measured in this study assessed during preliminary studies. All protocols, including reactivity studies, were performed in duplicate and averaged before individual data inclusion for statistical analysis. Results are presented as mean \pm SEM. Half-maximum effective concentration (EC_{50}) and the pD_2 value, the negative log of the EC_{50} , were measured from individual concentration-response curves. Two-way ANOVA were used to test for interactions and main effects between initial treatments and age /diet of mice. When interactions were not statistically significant, marginal means were compared followed by the Bonferroni approach for multiple comparisons. When interactions were statistically significant, one-way ANOVA were used to compare cell means followed by the Bonferroni approach. For analysis of maximal relaxations (E_{max}) in aorta and femoral arteries, Dunnett approach was used instead of the Bonferroni approach. Usual assumptions such as normality and homoscedasticity of the variance were checked. When variances were unequal, usual transformations such as logarithmic, square root or inverse function were used. If unequal variances remained after transformation, covariance pattern models were used. When normality was absent even after transformations, the Kruskal-Wallis test was used followed by the Mann-Whitney pair-wise comparisons with adjusted p-values. SPSS (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) and SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA) softwares were used for the statistical analyses. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

At the end of the preventive interventions, mice from the 3 groups had a similar body mass, SBP, as well as plasma glucose, insulin and total cholesterol levels (Table 1). Glycaemia was high at 9 months of age in all groups (Table 1) compared to 3-mo mice [5]; this age-dependent increase in circulating glucose has been reported in rat [55], monkey [41] and human [3].

Effect on endothelium-dependent and independent function of EX, CAT and PI at 9 months.

Maximal relaxations to Ach and SNP in aortas and to Ach in femoral arteries were similar in all groups (Fig. 1a and 1d, Table S3 and S4), with no marked differences in sensitivity (data not included). In aortas isolated from PI and CAT mice, indomethacin (non-specific COX1/2 inhibitor) significantly enhanced the maximal relaxation to Ach (Table S3). At 20 dynes/cm², the highest shear stress imposed, FMD of cerebral arteries isolated from PI and CAT mice were lower than in arteries isolated from EX mice (Fig. 1g).

Antioxidant enzymatic activities at 9 months. Catalase activity was higher in PI mice (Fig. 2a), without change in SOD2 and GPx activities (Fig. 2d and 2g). Systemic oxidative stress was evaluated by the levels of isoprostane in the plasma, a marker of lipid peroxidation [30]. Surprisingly, CAT-treated mice expressed higher levels of isoprostane in the blood than EX mice (Fig. 2j); aortic oxidative stress measured with the fluorescent probe dihydroethidium, however, was equivalent in all groups (data not included).

Impact of the switch in life style. At 12 months of age, mouse physiological and plasma parameters remained stable when switched to physical inactivity and a RD (Table 1). In all mice switched to a WD, however, body mass, glucose, insulin and cholesterol increased (Table 1). No atherosclerotic plaques were visible in aortas.

Endothelium-dependent and independent function 3 months after the switch of lifestyle. The maximal relaxant response induced by Ach in aortas isolated from PI mice was significantly reduced by the WD compared to the RD and abolished in the presence of L-NNA (Fig. 1b and 1c, Table S3); indomethacin, however, fully restored Ach-induced maximal relaxation compared to aorta segments isolated from the 2 other groups of mice (Table S3). These results therefore suggest i) a reduction in NO production and ii) the presence of an anti-relaxant constricting prostanoid, both limiting Ach-induced endothelium-dependent relaxation. In contrast to PI mice, the relaxation of aorta segments isolated from EX and CAT mice fed a WD was maintained at 12 months of age (Fig. 1c, Table S3). Indomethacin did not alter the relaxation induced by Ach, while L-NNA reduced it by ~60% (Table S3). After combined NOS and COX1/2 inhibition, however, the relaxation induced by Ach was lower in PI mice compared to EX and CAT mice (Fig. S2a, Table S3), demonstrating that previous exposure to EX and CAT increased the contribution of a compensatory non-NO / non-prostacyclin (PGI₂) relaxant factor while likely maintaining NO production. Similarly to Ach, the relaxation induced by sodium nitroprusside was lower in the aorta isolated from 12-month old PI mice fed a WD compared to all other groups (Fig. S2b), suggesting either an impairment of VSMC to SNP-derived NO, or, more likely, that the COX1/2 derivative limits as well the endothelium-independent SNP-induced VSMC relaxation.

The relaxation of the femoral arteries was not altered at 12 months in the 3 groups (Fig. 1e and 1f, Table S4). Nonetheless, differences in the contribution of NOS and COX1/2 activities were noted: individual inhibition of NOS and COX1/2 both reduced the relaxation induced by Ach in PI mice independently of the diet (Table S4). In contrast, the combination of L-NNA and indomethacin strongly reduced the relaxation induced by Ach in femoral arteries isolated from PI mice and from CAT mice fed a WD, but not a RD (Table S4). L-NNA and indomethacin,

combined or not, did not significantly affect the relaxation of femoral arteries isolated from 12-month old EX mice (Table S4).

Cerebral arteries isolated from EX mice and pressurized at 60 mm Hg had a consistent greater FMD at 9 months (Fig. 1g), at 12 months after 3 months of RD (Fig. 1h) or of WD (Fig. 1i). CAT neither prevented the age-related decline in FMD nor the deleterious impact of the WD on FMD (Fig. 1h and 1i). The WD, however, did not magnify the decline in endothelial function associated with a life-long PI when fed a RD (Fig. 1h and 1i).

Antioxidant enzymatic activities and inflammatory genes expression 3 months after the switch of lifestyle. After 3 months of exposure to the WD, SOD2 activity was lower in EX mice only (Fig. 2f). Catalase and GPx activities did not increase with the WD compared to that measured at 9 months (Fig. 2c and 2i), but it increased in CAT mice after the RD (Fig. 2b). The isoprostane levels remained elevated in CAT-treated mice, while the WD increased isoprostane in PI and EX mice to become similar in all groups (Fig. 2l). No change in aortic oxidative stress was observed (data not included).

Finally, the expression of the inflammation-related genes COX2 and angiotensin-like 2 (*angptl2*) increased in CAT-treated mice only following the WD (Table S5).

Impact of the interventions on the femoral and cerebral artery biomechanics. The biomechanical behaviour of the wall of conductance and muscular arteries influences blood flow dynamics and can be modified by a change in endothelial function and exercise training [5, 48]. At 9 months, femoral arteries isolated from EX mice were more compliant compared with PI and CAT mice, evidenced by a rightward shift of the passive stress-strain curve (Fig. 3a) and a lower YEM (Table S6). The compliance remained greater at 12 months of age in femoral arteries isolated from EX mice compared to those of PI mice, but nonetheless stiffened 3 months after

preventing access to the exercise wheel and exposure to either diets (Fig. 3c and 3e, Table S6). In contrast, removal of CAT at 9 months led to an increase in compliance at 12 months, leading to similar level of compliance in femoral arteries isolated from CAT and EX mice with either diets (Fig. 3c and 3e, Table S6). PI, alone or combined with a WD, did not modify the compliance of the femoral artery (Fig. 3c and 3e, Table S6).

In contrast to the femoral artery, the compliance of mouse cerebral arteries is paradoxically increased by endothelial dysfunction [5, 6]. At 9 months of age, the compliance of the cerebral arteries isolated from CAT mice was greater compared to the two other groups (Fig. 3b), although the YEM was not changed significantly (Table S6), suggesting that CAT induced adverse remodelling of the cerebrovascular wall. At 12 months, the absence of CAT normalized the deleterious effect of CAT pre-treatment on the compliance of the cerebral artery (Fig. 3d and 3f, Table S6). As expected, the WD shifted to the right the passive stress-strain curve in the cerebral arteries isolated from PI mice (Fig. 3f), together with a reduction of the YEM compared to EX mice (Table S6). These data demonstrate that the WD induced a weakening and a degradation of the biomechanical properties of the wall of the cerebral arteries in PI and CAT mice, while EX mice were protected.

Discussion

Vascular imprinting. The major finding of this study is that two interventions initiated at a very early age and known to be protective of the cardiovascular system, imprints the vasculature so that it responds differentially in the face of a deleterious change of environment at middle age. In our experimental paradigm, early exposure to EX better protected the vasculature than CAT. This demonstrates that a healthy lifestyle made of voluntary exercise and a balanced diet during development and maturation has a lasting protective impact on the vascular function. More importantly, our data reveal that the animals previously treated with CAT responded poorly to the WD with more evidences of inflammation and cerebrovascular adverse remodelling, making them at risk, although differently from PI animals, when transposed to a deleterious environment.

It is not well known if the beneficial effects of a healthy lifestyle on the cardiovascular system would outlast a switch to a deleterious environment. One study reported that 3 weeks of EX was sufficient to prevent the development of obesity induced by a high-fat diet 10 weeks later [52]; yet, another reported that cessation of EX predisposed rats to hepatic steatosis [60]. By opposition, a short-term period of forced sedentary behaviour (5 to 7 days) has been shown to be sufficient to alter vascular function [31, 43]. Our study is therefore unique because it reveals that voluntary EX during the first 9 months of life, permitted the maintenance of the vascular (both endothelium-dependent and -independent) function, the optimal biomechanics of the cerebral and femoral arteries, together with a low SOD2 activity and low expression of inflammatory markers. These results suggest that EX mice were biologically *equipped* to face a metabolic stress, at least for 3 months.

EX facilitates adaptation. Exercise is known to stimulate eNOS activity and the expression of antioxidant enzymes [27, 58]. Yet, EX is also known to transiently increase oxidative stress, and the beneficial adaptive changes can be prevented by a concomitant intake of antioxidants [29, 63].

Reactive oxygen signalling is essential to regulate cellular function [28, 61] including to signal for adaptation to EX [23] and their inactivation at critical time points is deleterious [26, 29, 63]. This may explain why CAT alone, a potent antioxidant, neither fully preserved the vascular function nor the biomechanics properties compared to PI mice, and even increased the expression of inflammatory markers and isoprostane. Hence, the impact of the two preventive approaches on the cardiovascular function diverged after 3 months of exposure to physical inactivity combined with a WD despite a similar increase in plasma cholesterol, glucose, insulin and in body mass (Table 1) that are associated with increased oxidative stress (Fig. 21) and overall risk of CVD [39]. The lasting impact or *memory* of the biological molecular modeling induced by EX is therefore reflected by the over-expression of stress resistance pathways [40, 56-58], and might explain the better outcome in EX mice.

Adaptive mechanisms. We previously reported that dyslipidemia stimulated the expression of an adaptive NO-independent endothelial pathway in mouse femoral arteries [36] that had been identified as EDHF in mesenteric arteries by others [11, 78]. The impairment of the NO pathway seen in inactive aging mice [38, 65] has been shown to be prevented by EX or an antioxidant treatment [20, 79]. Interestingly, EX permitted the maintenance of a better vascular function in cerebral arteries than CAT in all conditions, demonstrating that EX is more potent at protecting the cerebral circulation than a single antioxidant intervention. Our data are the first to demonstrate that only EX leads to a lasting protection of the vasculature against a change in environment.

Role of oxidative stress. Additional mechanisms are likely to contribute to the beneficial effects of EX. Aging is associated with an increase in oxidative damages associated with a decrease in antioxidant mechanisms [28, 32] accelerated by a WD [13]. The higher SOD2 activity in PI and CAT mice compared to EX mice following the WD suggests a higher production of superoxide

anion in these two groups. Superoxide can originate from different vascular sources: NADPH oxidase, xanthine oxidase, COX1/2 and uncoupled NOS [8, 71]. Aging [14], PI [38], and dyslipidemia [19] can induce oxidative damage by the generation of superoxide anion that will impair NO and PGI₂ relaxations [71]; EX can restore endothelial function and lower NADPH oxidase activity in the aorta of very old mice [20]. We reported that CAT reduces NADPH oxidase activity in cerebral arteries from 1-year old atherosclerotic mice [19]. Excess of H₂O₂ can as well be deleterious for the vasculature and promote atherosclerosis [77]. At low levels of H₂O₂, GPx and peroxiredoxin prevent H₂O₂-related damage from normal metabolic activity; in cultured cells, however, an increase or excess of H₂O₂ inactivates GPx and peroxiredoxin, forcing catalase to compensate [44]. The higher level of catalase activity in PI mice at 9 months of age, and in CAT mice fed a RD at 12 months of age, suggests a greater load of H₂O₂ in these two groups. In CAT-treated mice, cessation of CAT at 9 months of age is likely responsible for the rise in catalase activity as an adaptive reaction to the reduction in antioxidant load. Surprisingly, however, the WD prevented this adaptive rise in catalase activity in CAT-mice. The dominant, although likely necessary, role of antioxidant enzymes is therefore uncertain. Studies showed that EX prevented the decline in antioxidant enzymes function or expression [20, 51, 54], while others have reported no direct effect on SOD, catalase or GPx activity or expression despite lower oxidative damage or increased NO bioavailability [4, 7, 22]. Similarly, antioxidant treatments are effective to prevent the decrease in antioxidant function in pro-inflammatory and pro-oxidant conditions, but cannot improve antioxidant enzyme profiles [1, 49]. In these healthy mice with no genetically augmented susceptibility to develop endothelial dysfunction and atherosclerosis, the WD neither produced a major global decline in antioxidant enzyme activity nor an increase in aortic oxidative stress: yet, PI induced a major reduction in vascular function in the aorta.

Inflammation. Low-grade inflammation is a hallmark of endothelial dysfunction [72]. The WD increased COX2 and angptl-2 expression, two markers of inflammation, in CAT mice only. We previously reported that COX2 expression correlated with the level of damage in endothelial cells isolated from coronary artery disease patients [75] while others showed that oxidative stress stimulated COX2 expression [21]. In addition, we reported that 9 months of CAT magnified 50 folds the rise in COX2 expression associated with aging in the mouse aorta [26]. Angptl-2, on the other hand, is associated with inflammation as its presence is increased in patients with rheumatoid arthritis and abdominal aortic aneurysm [47, 69], while its deletion can lower pro-inflammatory cytokines in rodents [67, 69]. Hence, our results suggest that early CAT treatment induces a pro-inflammatory environment upon the challenge of a WD: we propose that CAT has limited the development of antioxidant defense mechanisms able to counteract the stress induced by the high fat diet WD.

Endothelium-independent functions. Despite numerous studies showing no influences of cardiovascular risk factor on endothelium-independent relaxation [14, 20, 38, 51], the relaxation induced by SNP was markedly reduced in aortas isolated from PI mice fed a WD. Ageing alters both the endothelium and the VSMC [34], and endothelium-independent response can be altered in presence of hyperinsulinemia in patients with metabolic syndrome [64] or by acute hyperhomocysteinaemia in diabetic patients [12]. On the other hand, EX has been shown to increase the relaxant response to NO donors in humans and rabbits [15, 33], demonstrating that it can reverse and/or counteract the dysfunctional VSMC relaxant capacities. The mechanism involved in the impaired SNP response remains elusive; nonetheless, the equally reduced endothelium-dependent relaxation to Ach was prevented in the presence of indomethacin. Therefore, the default of relaxation is reversible and we can speculate that constricting COX1/2 derivatives may also counteract the VSMC relaxation to SNP. Altogether, our data suggests that

an efficient vascular relaxation depends on a fine balance between relaxing and constricting factors highly sensitive to the environment.

Limitations. Our study has limitations. The statistical determination of the number of animals was set to only detect significant (>30%) changes in functions between groups. This may have decreased the power to detect fine changes in functions that may be significant and could widen in later life. The design of the experiments is complex and the parameters are numerous; this study needs to be replicated to address specifically the modifications induced by an abrupt change in the environment, an approach that would increase the power to detect biological modifications, notably the role of COX1/2 derivative on the vascular relaxation. We believe, however, that this design reflects a clinical reality associated to increasing prevalence in the migration of population with the consequent changes in lifestyles, a phenomenon restricted in the past to “westernized” isolated societies [68].

In conclusion, we demonstrate that a healthy lifestyle at a young age including voluntary exercise and a balanced diet, but not a single antioxidant, is protective at middle age when challenged by an environmental stress, likely by stimulating the expression of stress-resistance pathways.

Acknowledgments

The authors would like to thank the staff of the animal facility of the Montreal Heart Institute. This study was supported by the Canadian Institutes for Health Research (E.T. MOP#14496). F. Leblond is supported by a *Banting and Best* PhD scholarship from the Canadian Institute for Health Research.

Ethical standard

The experiments comply with the current laws of Canada in which they were performed.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Abd El-Aziz TA, Mohamed RH, Pasha HF, Abdel-Aziz HR (2011) Catechin protects against oxidative stress and inflammatory-mediated cardiotoxicity in adriamycin-treated rats. *Clinical and experimental medicine*. doi:10.1007/s10238-011-0165-2
2. Barker DJ (2004) The developmental origins of adult disease. *Journal of the American College of Nutrition* 23 (6 Suppl):588S-595S
3. Basu R, Breda E, Oberg AL, Powell CC, Dalla Man C, Basu A, Vittone JL, Klee GG, Arora P, Jensen MD, Toffolo G, Cobelli C, Rizza RA (2003) Mechanisms of the age-associated deterioration in glucose tolerance: contribution of alterations in insulin secretion, action, and clearance. *Diabetes* 52 (7):1738-1748
4. Bayod S, Del Valle J, Lalanza JF, Sanchez-Roige S, de Luxan-Delgado B, Coto-Montes A, Canudas AM, Camins A, Escorihuela RM, Pallas M (2012) Long-term physical exercise induces changes in sirtuin 1 pathway and oxidative parameters in adult rat tissues. *Exp Gerontol*. doi:10.1016/j.exger.2012.08.004
5. Bolduc V, Baraghis E, Duquette N, Thorin-Trescases N, Lambert J, Lesage F, Thorin E (2012) Catechin prevents severe dyslipidemia-associated changes in wall biomechanics of cerebral arteries in LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} mice and improves cerebral blood flow. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 302 (6):H1330-1339. doi:10.1152/ajpheart.01044.2011
6. Bolduc V, Drouin A, Gillis MA, Duquette N, Thorin-Trescases N, Frayne-Robillard I, Des Rosiers C, Tardif JC, Thorin E (2011) Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 301 (5):H2081-2092. doi:10.1152/ajpheart.00706.2011
7. Bunker AK, Arce-Esquivel AA, Rector RS, Booth FW, Ibdah JA, Laughlin MH (2010) Physical activity maintains aortic endothelium-dependent relaxation in the obese type 2 diabetic OLETF rat. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 298 (6):H1889-1901. doi:10.1152/ajpheart.01252.2009
8. Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87 (10):840-844
9. Carrera-Bastos P, Fontes-Villalba M, O'Keefe JH, Lindeberg S, Cordain L (2011) The western diet and lifestyle and diseases of civilization. *Research Reports in Clinical Cardiology* 2:15-35

10. Chakravarty EF, Hubert HB, Lingala VB, Fries JF (2008) Reduced disability and mortality among aging runners: a 21-year longitudinal study. *Arch Intern Med* 168 (15):1638-1646. doi:168/15/1638 [pii] 10.1001/archinte.168.15.1638
11. Chen SJ, Wu CC, Yen MH (2001) Exercise training activates large-conductance calcium-activated K(+) channels and enhances nitric oxide production in rat mesenteric artery and thoracic aorta. *Journal of biomedical science* 8 (3):248-255. doi:54040
12. Chousos I, Perrea D, Kyriaki D, Liatis S, Katsilambros N, Makrilakis K (2010) Acute hyperhomocysteinaemia blunts endothelial dependent and endothelial independent vasodilatation in diabetic patients. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease* 7 (3):186-194. doi:10.1177/1479164110369687
13. Collins AR, Lyon CJ, Xia X, Liu JZ, Tangirala RK, Yin F, Boyadjian R, Bikineyeva A, Pratico D, Harrison DG, Hsueh WA (2009) Age-accelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes. *Circ Res* 104 (6):e42-54. doi:CIRCRESAHA.108.188771 [pii] 10.1161/CIRCRESAHA.108.188771
14. Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, Kaley G (2002) Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res* 90 (11):1159-1166
15. De Moraes R, Gioseffi G, Nobrega AC, Tibirica E (2004) Effects of exercise training on the vascular reactivity of the whole kidney circulation in rabbits. *J Appl Physiol* 97 (2):683-688. doi:10.1152/jappphysiol.00923.2003
16. Dilis V, Katsoulis M, Lagiou P, Trichopoulos D, Naska A, Trichopoulou A (2012) Mediterranean diet and CHD: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Br J Nutr* 108 (4):699-709. doi:10.1017/S0007114512001821
17. Drouin A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Belanger E, Fernandes P, Baraghis E, Lesage F, Gillis MA, Villeneuve L, Hamel E, Ferland G, Thorin E (2011) Catechin treatment improves cerebrovascular flow-mediated dilation and learning abilities in atherosclerotic mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 300 (3):H1032-1043. doi:10.1152/ajpheart.00410.2010
18. Drouin A, Farhat N, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Gillis MA, Villeneuve L, Nguyen A, Thorin E (2011) Up-regulation of thromboxane A(2) impairs cerebrovascular eNOS function in aging atherosclerotic mice. *Pflugers Arch* 462 (3):371-383. doi:10.1007/s00424-011-0973-y

19. Drouin A, Thorin E (2009) Flow-induced dilation is mediated by Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide in mouse cerebral arteries. *Stroke* 40 (5):1827-1833. doi:STROKEAHA.108.536805 [pii] 10.1161/STROKEAHA.108.536805
20. Durrant JR, Seals DR, Connell ML, Russell MJ, Lawson BR, Folian BJ, Donato AJ, Lesniewski LA (2009) Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase. *J Physiol* 587 (Pt 13):3271-3285. doi:jphysiol.2009.169771 [pii] 10.1113/jphysiol.2009.169771
21. Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB (1995) Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 95 (4):1669-1675. doi:10.1172/JCI117842
22. Filaire E, Rouveix M, Massart A, Gladine C, Davicco MJ, Durand D (2009) Lipid peroxidation and antioxidant status in rat: effect of food restriction and wheel running. *European journal of applied physiology* 107 (2):243-250. doi:10.1007/s00421-009-1121-7
23. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ (2009) Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med* 8:1. doi:10.1186/1476-5918-8-1
24. Gendron ME, Theoret JF, Mamarbachi AM, Drouin A, Nguyen A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Merhi Y, Thorin E (2010) Late chronic catechin antioxidant treatment is deleterious to the endothelial function in aging mice with established atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298 (6):H2062-2070. doi:10.1152/ajpheart.00532.2009
25. Gendron ME, Thorin E (2007) A change in the redox environment and thromboxane A2 production precede endothelial dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293 (4):H2508-2515. doi:00352.2007 [pii] 10.1152/ajpheart.00352.2007
26. Gendron ME, Thorin-Trescases N, Mamarbachi AM, Villeneuve L, Theoret JF, Mehri Y, Thorin E (2012) Time-dependent beneficial effect of chronic polyphenol treatment with catechin on endothelial dysfunction in aging mice. *Dose Response* 10 (1):108-119. doi:10.2203/dose-response.11-014.Thorin
27. Gielen S, Schuler G, Adams V (2010) Cardiovascular effects of exercise training: molecular mechanisms. *Circulation* 122 (12):1221-1238. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.939959

28. Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG (2007) Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (9):722-728. doi:10.1038/nrm2240
29. Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL, Vina J (2005) Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *The Journal of physiology* 567 (Pt 1):113-120. doi:10.1113/jphysiol.2004.080564
30. Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142 (2):231-255. doi:10.1038/sj.bjp.0705776
31. Hamburg NM, McMackin CJ, Huang AL, Shenouda SM, Widlansky ME, Schulz E, Gokce N, Ruderman NB, Keaney JF, Jr., Vita JA (2007) Physical inactivity rapidly induces insulin resistance and microvascular dysfunction in healthy volunteers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (12):2650-2656. doi:10.1161/ATVBAHA.107.153288
32. Harman D (2006) Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci* 1067:10-21. doi:1067/1/10 [pii] 10.1196/annals.1354.003
33. Haskell WL, Sims C, Myll J, Bortz WM, St Goar FG, Alderman EL (1993) Coronary artery size and dilating capacity in ultradistance runners. *Circulation* 87 (4):1076-1082
34. Ishida S, Hamasaki S, Kamekou M, Yoshitama T, Nakano F, Yoshikawa A, Kataoka T, Saihara K, Minagoe S, Tei C (2003) Advancing age is associated with diminished vascular remodeling and impaired vasodilation in resistance coronary arteries. *Coronary artery disease* 14 (6):443-449. doi:10.1097/01.mca.0000087912.54460.bf
35. Krummen S, Drouin A, Gendron ME, Falck JR, Thorin E (2006) ROS-sensitive cytochrome P450 activity maintains endothelial dilatation in ageing but is transitory in dyslipidaemic mice. *British journal of pharmacology* 147 (8):897-904. doi:10.1038/sj.bjp.0706679
36. Krummen S, Falck JR, Thorin E (2005) Two distinct pathways account for EDHF-dependent dilatation in the gracilis artery of dyslipidaemic hApoB^{+/+} mice. *British journal of pharmacology* 145 (2):264-270. doi:10.1038/sj.bjp.0706194
37. Lairon D (2007) Intervention studies on Mediterranean diet and cardiovascular risk. *Molecular nutrition & food research* 51 (10):1209-1214. doi:10.1002/mnfr.200700097
38. Laufs U, Wassmann S, Czech T, Munzel T, Eisenhauer M, Bohm M, Nickenig G (2005) Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 (4):809-814. doi:10.1161/01.ATV.0000158311.24443.af

39. Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR, Williams GR (2004) Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation* 110 (10):1245-1250. doi:10.1161/01.CIR.0000140677.20606.0E
40. Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, Barnard D, Ward WF, Qi W, Ingram DK, de Cabo R (2012) Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 489 (7415):318-321. doi:10.1038/nature11432
41. Mattson MP (2008) Hormesis and disease resistance: activation of cellular stress response pathways. *Hum Exp Toxicol* 27 (2):155-162. doi:10.1177/0960327107083417
42. Muller JM, Davis MJ, Chilian WM (1996) Integrated regulation of pressure and flow in the coronary microcirculation. *Cardiovascular research* 32 (4):668-678
43. Navasolava NM, Dignat-George F, Sabatier F, Larina IM, Demiot C, Fortrat JO, Gauquelin-Koch G, Kozlovskaya IB, Custaud MA (2010) Enforced physical inactivity increases endothelial microparticle levels in healthy volunteers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299 (2):H248-256. doi:10.1152/ajpheart.00152.2010
44. Neumann CA, Cao J, Manevich Y (2009) Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. *Cell Cycle* 8 (24):4072-4078
45. Nocon M, Hiemann T, Muller-Riemenschneider F, Thalau F, Roll S, Willich SN (2008) Association of physical activity with all-cause and cardiovascular mortality: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 15 (3):239-246. doi:10.1097/HJR.0b013e3282f55e09 00149831-200806000-00001 [pii]
46. North BJ, Sinclair DA (2012) The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circ Res* 110 (8):1097-1108. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.246876
47. O'Rourke MF, Hashimoto J (2008) Arterial stiffness: a modifiable cardiovascular risk factor? *Journal of cardiopulmonary rehabilitation and prevention* 28 (4):225-237. doi:10.1097/01.HCR.0000327179.21498.38
48. Okada T, Tsukano H, Endo M, Tabata M, Miyata K, Kadomatsu T, Miyashita K, Semba K, Nakamura E, Tsukano M, Mizuta H, Oike Y (2010) Synovial cell-derived angiopoietin-like protein 2 contributes to synovial chronic inflammation in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 176 (5):2309-2319. doi:10.2353/ajpath.2010.090865
49. Palsamy P, Subramanian S (2011) Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-

- Keap1 signaling. *Biochim Biophys Acta* 1812 (7):719-731. doi:10.1016/j.bbadis.2011.03.008
50. Papaioannou TG, Karatzis EN, Vavuranakis M, Lekakis JP, Stefanadis C (2006) Assessment of vascular wall shear stress and implications for atherosclerotic disease. *Int J Cardiol* 113 (1):12-18. doi:10.1016/j.ijcard.2006.03.035
51. Park Y, Booth FW, Lee S, Laye MJ, Zhang C (2012) Physical activity opposes coronary vascular dysfunction induced during high fat feeding in mice. *J Physiol* 590 (Pt 17):4255-4268. doi:10.1113/jphysiol.2012.234856
52. Patterson CM, Dunn-Meynell AA, Levin BE (2008) Three weeks of early-onset exercise prolongs obesity resistance in DIO rats after exercise cessation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 294 (2):R290-301. doi:10.1152/ajpregu.00661.2007
53. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29 (9):e45
54. Pierce GL, Donato AJ, LaRocca TJ, Eskurza I, Silver AE, Seals DR (2011) Habitually exercising older men do not demonstrate age-associated vascular endothelial oxidative stress. *Aging cell* 10 (6):1032-1037. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00748.x
55. Qiang W, Weiqiang K, Qing Z, Pengju Z, Yi L (2007) Aging impairs insulin-stimulated glucose uptake in rat skeletal muscle via suppressing AMPKalpha. *Experimental & molecular medicine* 39 (4):535-543
56. Radak Z, Chung HY, Goto S (2005) Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology* 6 (1):71-75. doi:10.1007/s10522-004-7386-7
57. Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S (2008) Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing research reviews* 7 (1):34-42. doi:10.1016/j.arr.2007.04.004
58. Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M (2012) Oxygen Consumption and Usage During Physical Exercise: The Balance Between Oxidative Stress and ROS-Dependent Adaptive Signaling. *Antioxidants & redox signaling*. doi:10.1089/ars.2011.4498
59. Ramsden CE, Faurot KR, Carrera-Bastos P, Cordain L, De Lorgeril M, Sperling LS (2009) Dietary fat quality and coronary heart disease prevention: a unified theory based on evolutionary, historical, global, and modern perspectives. *Current treatment options in cardiovascular medicine* 11 (4):289-301
60. Rector RS, Thyfault JP, Laye MJ, Morris RT, Borengasser SJ, Uptergrove GM, Chakravarthy MV, Booth FW, Ibdah JA (2008) Cessation of daily exercise dramatically alters

- precursors of hepatic steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *J Physiol* 586 (Pt 17):4241-4249. doi:10.1113/jphysiol.2008.156745
61. Rhee SG (2006) Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* 312 (5782):1882-1883. doi:10.1126/science.1130481
 62. Rippe C, Lesniewski L, Connell M, LaRocca T, Donato A, Seals D (2010) Short-term calorie restriction reverses vascular endothelial dysfunction in old mice by increasing nitric oxide and reducing oxidative stress. *Aging cell* 9 (3):304-312. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00557.x
 63. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Bluher M (2009) Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (21):8665-8670. doi:0903485106 [pii] 10.1073/pnas.0903485106
 64. Schinzari F, Tesauro M, Rovella V, Galli A, Mores N, Porzio O, Lauro D, Cardillo C (2010) Generalized impairment of vasodilator reactivity during hyperinsulinemia in patients with obesity-related metabolic syndrome. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 299 (6):E947-952. doi:10.1152/ajpendo.00426.2010
 65. Seals DR, Walker AE, Pierce GL, Lesniewski LA (2009) Habitual exercise and vascular ageing. *J Physiol* 587 (Pt 23):5541-5549. doi:jphysiol.2009.178822 [pii] 10.1113/jphysiol.2009.178822
 66. Steinberg D, Witztum JL (2002) Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 105 (17):2107-2111
 67. Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T, Shimabukuro M, Sakaguchi K, Ito T, Nakagata N, Yamada T, Katagiri H, Kasuga M, Ando Y, Ogawa H, Mochizuki N, Itoh H, Suda T, Oike Y (2009) Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell metabolism* 10 (3):178-188. doi:10.1016/j.cmet.2009.08.003
 68. Taylor R, Thoma K (1985) Mortality patterns in the modernized Pacific Island nation of Nauru. *American journal of public health* 75 (2):149-155
 69. Tazume H, Miyata K, Tian Z, Endo M, Horiguchi H, Takahashi O, Horio E, Tsukano H, Kadomatsu T, Nakashima Y, Kunitomo R, Kaneko Y, Moriyama S, Sakaguchi H, Okamoto K, Hara M, Yoshinaga T, Yoshimura K, Aoki H, Araki K, Hao H, Kawasuji M,

- Oike Y (2012) Macrophage-derived angiopoietin-like protein 2 accelerates development of abdominal aortic aneurysm. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32 (6):1400-1409. doi:10.1161/ATVBAHA.112.247866
70. Thorin E, Meerkin D, Bertrand OF, Paiement P, Joyal M, Bonan R (2000) Influence of postangioplasty beta-irradiation on endothelial function in porcine coronary arteries. *Circulation* 101 (12):1430-1435
71. Ullrich V, Bachschmid M (2000) Superoxide as a messenger of endothelial function. *Biochemical and biophysical research communications* 278 (1):1-8. doi:10.1006/bbrc.2000.3733
72. Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A (2010) Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65 (10):1028-1041. doi:10.1093/gerona/gdq113
73. Vanhoutte PM (2009) Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 73 (4):595-601
74. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S (2009) Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care* 32 Suppl 2:S314-321. doi:10.2337/dc09-S330
75. Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Nguyen A, Villeneuve L, Mamarbachi AM, Fortier A, Perrault LP, Carrier M, Thorin E (2007) Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Ageing Dev* 128 (11-12):662-671. doi:10.1016/j.mad.2007.09.006
76. Wen CP, Wai JP, Tsai MK, Yang YC, Cheng TY, Lee MC, Chan HT, Tsao CK, Tsai SP, Wu X (2011) Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. *Lancet* 378 (9798):1244-1253. doi:10.1016/S0140-6736(11)60749-6
77. Yang H, Roberts LJ, Shi MJ, Zhou LC, Ballard BR, Richardson A, Guo ZM (2004) Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ Res* 95 (11):1075-1081. doi:10.1161/01.RES.0000149564.49410.0d
78. Yen MH, Yang JH, Sheu JR, Lee YM, Ding YA (1995) Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation in spontaneously hypertensive rats. *Life sciences* 57 (24):2205-2213

79. Zou JG, Wang ZR, Huang YZ, Cao KJ, Wu JM (2003) Effect of red wine and wine polyphenol resveratrol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *International journal of molecular medicine* 11 (3):317-320

Figure legends

Figure 1 Main effects on vascular function of a switch from physical inactivity (PI), exercise (EX, voluntary wheel running) or catechin (CAT, 30 mg/kg/day in drinking water) with a regular diet (RD) from the age of 1 to 9 months, to physical inactivity and a western diet (WD) from the age of 9 to 12 months. Acetylcholine-(ACh) induced endothelium-dependent relaxation of the aorta (a, b, c; n=4-9) and femoral arteries (d, e, f; n=5-9) and flow-mediated endothelium-dependent dilation of cerebral arteries (g, h, i; n=6-10). Results are presented as mean±SEM. *p<0.05 compared to 12 months of age with RD (treatment matching group), ^Pp<0.05 compared to PI, ^Ep<0.05 compared to EX and ^Cp<0.05 compared to CAT.

Figure 2 Effects on antioxidant activity of a switch from physical inactivity (PI), exercise (EX, voluntary wheel running) or catechin (CAT, 30 mg/kg/day in drinking water) with a regular diet (RD) from the age of 1 to 9 months, to physical inactivity and a western diet (WD) from the age of 9 to 12 months. Oxidative stress was evaluated by quantifying in the aorta the activity of the catalase (a, b, c; n=4-5), superoxide dismutase 2 activity (SOD2) (d, e, f; n=4-5) and glutathione peroxidase (GPx) (g, h, i; n=4-6), and by measuring the circulating levels of isoprostane (j, k, l; n=3-5). Results are presented as mean±SEM. #p<0.05 compared to 9 months of age (treatment matching group); *p<0.05 compared to 12 months of age with RD (treatment matching group) ^Pp<0.05 compared to PI, ^Ep<0.05 compared to EX and ^Cp<0.05 compared to CAT.

Figure 3 Major effects on the structure/function relationship (assessed by measuring compliance) of a switch from physical inactivity (PI), exercise (EX, voluntary wheel running) or catechin (CAT, 30 mg/kg/day in drinking water) with a regular diet (RD) from the age of 1 to 9 months, to physical inactivity and a western diet (WD) from the age of 9 to 12 months. Compliance was measured in the femoral (a, c, e; n=5-9) and the cerebral arteries (b, d, f; n=6-10). Results are

presented as mean \pm SEM. [#]p<0.05 compared to 9 months of age (treatment matching group),
^pp<0.05 compared to PI, and ^cp<0.05 compared to CAT.

Tables

Table 1 Body mass, plasma glucose, insulin, total cholesterol (TC) and isoprostane, and systolic blood pressure (SBP) from physically inactive (PI), exercising (EX, voluntary wheel running) and catechin-treated (CAT, 30 mg/kg/day in drinking water) mice, from 1 to 9 months of age combined with a regular diet (9 months RD), and then maintained for 3 months in inactive conditions and fed either a RD (12 months RD) or a western diet (12 months WD).

Age / diets	9 months RD			12 months RD			12 months WD			
Treatments	PI	EX	CAT	PI	EX	CAT	PI	EX	CAT	n
Body mass (g)	30.4±1.3	32.4±1.2	31.1±1.2	33.4±1.6	35.7±1.9	31.0±0.8	44.9±1.5*	43.9±1.6*	45.5±0.9*	9-15
Glucose (mmol/L)	17.5±1.1	15.9±1.7	19.2±0.8	16.4±0.9	20.0±1.9	15.7±0.8	22.3±0.8*	19.5±2.6	20.5±1.9*	4-7
Insulin (ng/mL)	0.17±0.04	0.27±0.06	0.19±0.06	0.29±0.09	0.23±0.08	0.21±0.05	0.49±0.12*	0.57±0.18*	0.44±0.11*	8-10
TC (mmol/L)	2.4±0.1	2.8±0.1	2.8±0.1	2.6±0.1	2.6±0.3	2.9±0.1	6.9±1.1*	7.2±1.1*	5.4±0.6*	4-7
SBP (mm Hg)	141.0±6.2	142.3±2.9	148.1±2.8	143.3±5.5	140.6±3.7	149.0±1.8	134.1±8.1	145.5±4.3	138.8±3.2	4-14

Results are presented as mean±SEM. *p<0.05 compared to 12 months RD (treatment matching-group).

Figure 1

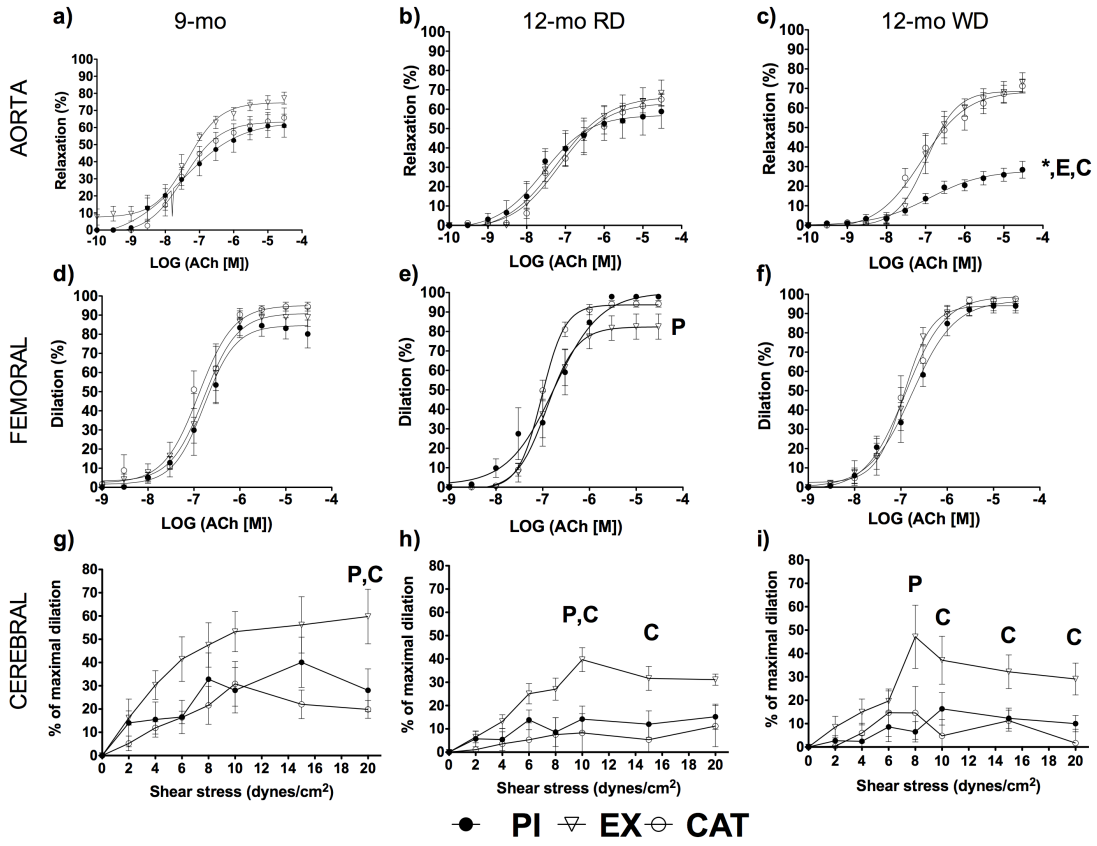


Figure 2

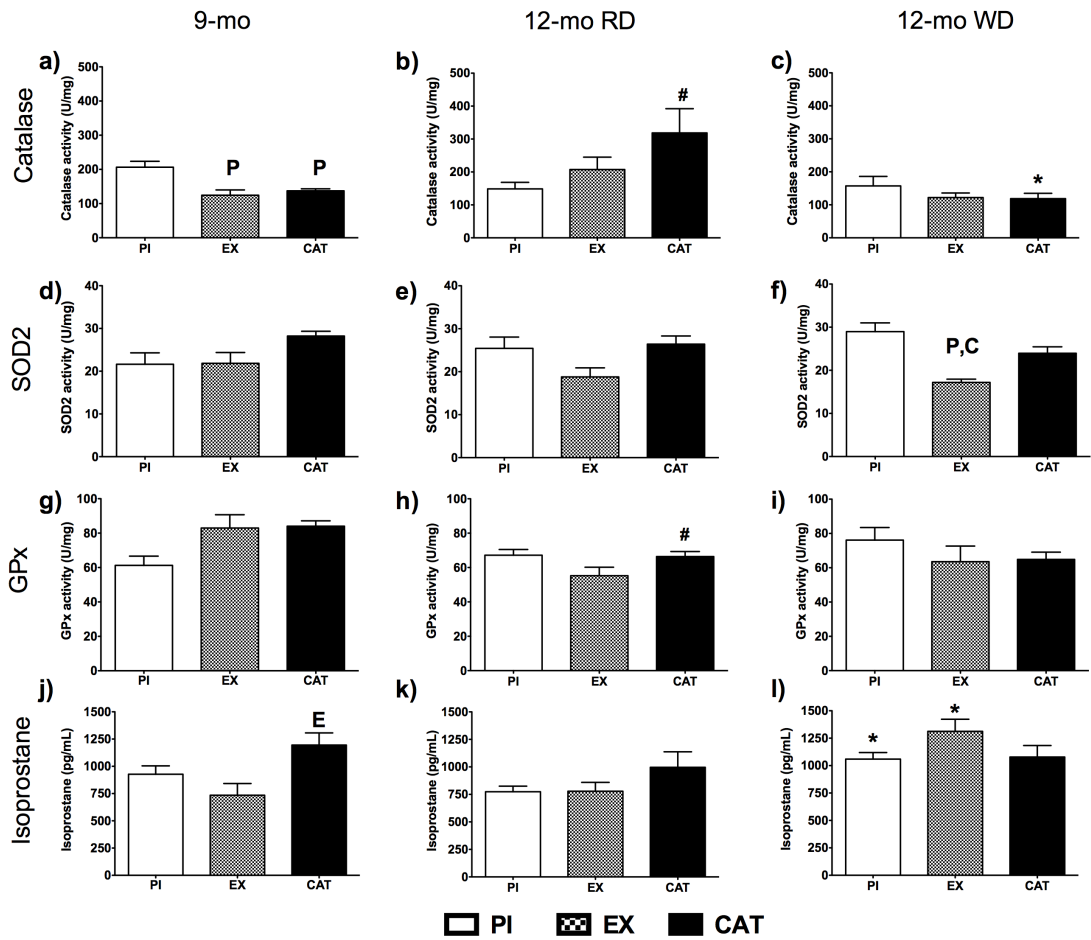
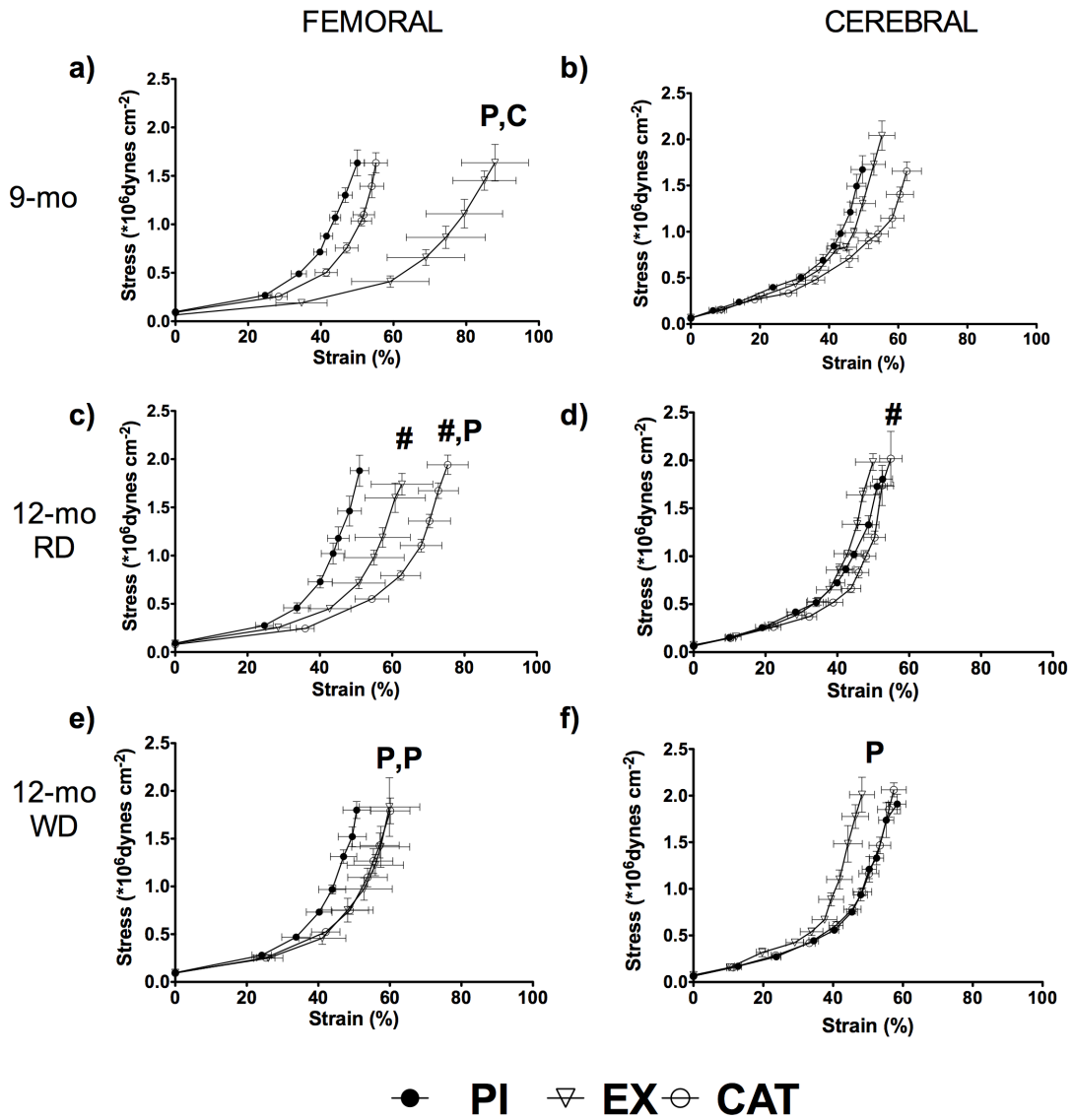


Figure 3



Online supplementary data

Post-natal exposure to voluntary exercise but not the antioxidant catechin protects the vasculature after a switch to an atherogenic environment in middle-age mice

Pflügers Archiv - European Journal of Physiology

Francois Leblond^{1,4}, Albert Nguyen^{1,4}, Virginie Bolduc^{1,4}, Jean Lambert², Carol Yu^{1,4}, Natacha Duquette⁴,
Eric Thorin^{1,3,4}

Departments of Pharmacology¹, Social² and Preventive Medicine and Surgery³, Faculty of Medicine,
Université de Montréal, and Research Centre⁴, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada

Corresponding author: Dr. Eric Thorin, Research Centre, Montreal Heart Institute

Supplementary Fig. S1 Mice (n=10-15 per group) were fed a regular diet (RD) from 1- to 9-month (9-mo) alone (physical inactivity, PI), or with access to a running wheel (EX, 2.7 ± 0.2 km/day), or a treatment with the antioxidant catechin (CAT, 30 mg/kg/day) dissolved in the drinking. At 9-mo, the running wheel was removed and CAT treatment was stopped. Mice were either sacrificed or fed for an additional 3-month with a RD or a high fat/high cholesterol western diet (WD)

Supplementary Fig. S2 Effects of a 3-month western diet on vascular relaxation. Aortic endothelial function in aortas isolated from physically inactive (PI), exercising (EX, voluntary wheel running) and catechin-treated (CAT, 30 mg/kg/day in drinking water) mice, the latter from 1 to 9 months of age combined with a regular diet, and then maintained for 3 months in physical inactive conditions and fed a western diet. a) Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine (Ach) in the presence of NOS (L-NNA, 100 μ M) and COX1/2 (indomethacin, 10 μ M) inhibitors; b) endothelium-independent relaxation to sodium nitroprusside (SNP). Means \pm SEM, n=3-9. *p<0.05 compared to 12 months RD (treatment matching-group). ^Ep<0.05 compared to EX, ^Cp<0.05 compared to CAT, ^Ap<0.05 compared to Ach, ^Lp<0.05 compared to L-NNA and ^Ip<0.05 compared to indomethacin

Supplementary Table S1 Levels of precontraction induced by the thromboxane A₂ analog 9,11-dideoxy-11 α ,9 α -epoxymethanoprostaglandin F_{2 α} (U46619, 0.1nM to 10 μ M) in aorta segments isolated from physically inactive (PI), exercising (EX, voluntary wheel running) and catechin-treated (CAT, 30 mg/kg/day in drinking water) mice, the latter from 1 to 9 months of age combined with a regular diet (9 months RD), and then maintained for 3 months in physically inactive conditions and fed either a RD (12 months RD) or a western diet (12 months WD)

Age / diets	9 months RD			12 months RD			12 months WD			
Treatments	PI	EX	CAT	PI	EX	CAT	PI	EX	CAT	n
Precontraction (%)	46.1 \pm 9.0	59.2 \pm 5.4	59.9 \pm 3.5	65.5 \pm 6.9	61.8 \pm 7.5	47.9 \pm 4.2	71.5 \pm 4.3	55.8 \pm 8.1	57.6 \pm 4.8	4-9

Means \pm SEM

Supplementary Table S2 Sequences of the primers for real-time quantitative PCR in mice

Genes	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Angptl-2	GATCCAGAGTGACCAGAATC	TCTCAGGCTTCACCAGGTAG
COX2	GAACATGGACTCACTCAGTTTGTG	CAAAGATAGCATCTGGACGAGGT
Cyclophilin A	CCGATGACGAGCCCTTG	GCCGCCAGTGCCATTATG

Supplementary Table S3 Maximal relaxations (% E_{max}) induced by acetylcholine (Ach, 30 μ M) and sodium nitroprusside (SNP, 30 μ M) of aortas isolated from physically inactive (PI), exercising (EX, voluntary wheel running) and catechin-treated (CAT, 30 mg/kg/day in drinking water) mice, the latter from 1 to 9 months of age combined with a regular diet (9 months RD), and then maintained for 3 months in physical inactive conditions and fed either a RD (12 months RD) or a western diet (12 months WD)

Age / diets	9 months RD			12 months RD			12 months WD			n
Treatments	PI	EX	CAT	PI	EX	CAT	PI	EX	CAT	
SNP	89.2 \pm 3.2	82.0 \pm 4.0	79.6 \pm 2.4	73.4 \pm 4.8	73.9 \pm 7.9	72.3 \pm 4.2	42.0 \pm 4.7*	79.9 \pm 7.8 ^P	79.8 \pm 4.5 ^P	3-8
Ach	61.1 \pm 6.8	77.2 \pm 3.5	65.7 \pm 5.7	58.8 \pm 8.7	68.4 \pm 6.7	65.1 \pm 3.2	28.4 \pm 4.3*	73.1 \pm 4.9 ^P	71.3 \pm 3.6 ^P	4-9
+L-NNA	5.8 \pm 3.0 ^A	23.0 \pm 3.1 ^{A,P}	13.2 \pm 3.7 ^A	7.8 \pm 2.6 ^A	11.5 \pm 2.6 ^A	27.9 \pm 3.7 ^{A,P,E}	7.5 \pm 4.4 ^A	28.0 \pm 4.7 ^{*,A}	32.8 \pm 5.9 ^{A,P}	4-9
+indo	85.6 \pm 3.9 ^A	66.5 \pm 5.2	80.8 \pm 4.4 ^A	70.5 \pm 2.3 ^A	66.9 \pm 6.3	71.7 \pm 4.2	74.0 \pm 2.0 ^A	80.7 \pm 3.9	76.3 \pm 4.9	5-9
+L-	39.2 \pm 7.7	34.6 \pm 10.0 ^A	33.0 \pm 7.4 ^A	26.8 \pm 7.9 ^A	28.8 \pm 6.0 ^A	49.2 \pm 5.2 ^A	33.1 \pm 6.4	63.4 \pm 2.8 ^{L,P,*}	56.1 \pm 3.8 ^{A,P}	4-9

Means \pm SEM; *p<0.05 compared to 12 months RD (treatment matching-group). ^Pp<0.05 compared to PI, ^Ep<0.05 compared to EX, ^Ap<0.05 compared to Ach, ^Lp<0.05 compared to L-NNA and ^Ip<0.05 compared to indomethacin

Supplementary Table S4 Maximal relaxation (% E_{max}) induced by acetylcholine (Ach, 30 μ M) in femoral arteries isolated from physically inactive (PI), exercising (EX, voluntary wheel running) and catechin-treated (CAT, 30 mg/kg/day in drinking water) mice, the latter from 1 to 9 months of age combined with a regular diet (9 months RD), and then maintained for 3 months in physical inactive conditions and fed either a RD (12 months RD) or a western diet (12 months WD)

Age / diets	9 months RD			12 months RD			12 months WD			n
Treatments	PI	EX	CAT	PI	EX	CAT	PI	EX	CAT	
Ach	86.7 \pm 5.1	88.9 \pm 4.8	94.4 \pm 2.3	97.9 \pm 1.1	82.5 \pm 6.5 ^P	94.1 \pm 1.8	93.4 \pm 2.5	94.0 \pm 3.7	97.7 \pm 1.0	5-9
+L-NNA	65.5 \pm 18.5	83.0 \pm 5.5	89.6 \pm 1.7	19.2 \pm 8.6 ^{#,A}	72.7 \pm 12.4 ^P	87.1 \pm 5.4 ^P	21.1 \pm 6.9 ^A	71.9 \pm 16.6 ^P	67.3 \pm 14.9 ^P	3-7
+indo	93.6 \pm 2.5	96.1 \pm 1.5	90.4 \pm 5.2	59.6 \pm 13.2 ^A	89.6 \pm 5.3 ^P	96.2 \pm 1.7 ^P	50.0 \pm 3.9 ^A	80.3 \pm 12.6 ^P	97.1 \pm 0.6 ^P	3-8
+L-	28.5 \pm 8.4 ^A	66.7 \pm 11.3	49.2 \pm 12.7 ^A	43.0 \pm 14.6 ^A	42.4 \pm 18.2	94.6 \pm 3.2 ^P	20.9 \pm 8.3 ^A	65.6 \pm 14.6	38.4 \pm 14.2 ^{*,A}	3-7

Means \pm SEM; [#]p<0.05 compared to 9-mo RD (treatment matching-group), *p<0.05 compared to 12-mo RD (treatment matching-group), ^Pp<0.05 compared to PI, ^Ap<0.05 compared to Ach

Supplementary Table S5 Gene expression in aortas isolated from physically inactive (PI), exercising (EX, voluntary wheel running) and catechin-treated (CAT, 30 mg/kg/day in drinking water) mice, the latter from 1 to 9 months of age combined with a regular diet (9 months RD), and then maintained for 3 months in physical inactive conditions and fed either a RD (12 months RD) or a western diet (12 months WD)

Age / diets	9 months RD			12 months RD			12 months WD			n
	PI	EX	CAT	PI	EX	CAT	PI	EX	CAT	
COX2	1.0±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1	1.0±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1	0.9±0.1	0.8±0.2	1.1±0.1*	4-7
Angptl-2	1.0±0.1	1.2±0.1	1.2±0.1	1.0±0.1	1.1±0.1	1.1±0.1	1.0±0.1	1.0±0.1	1.6±0.1* ^{P,E}	4-7

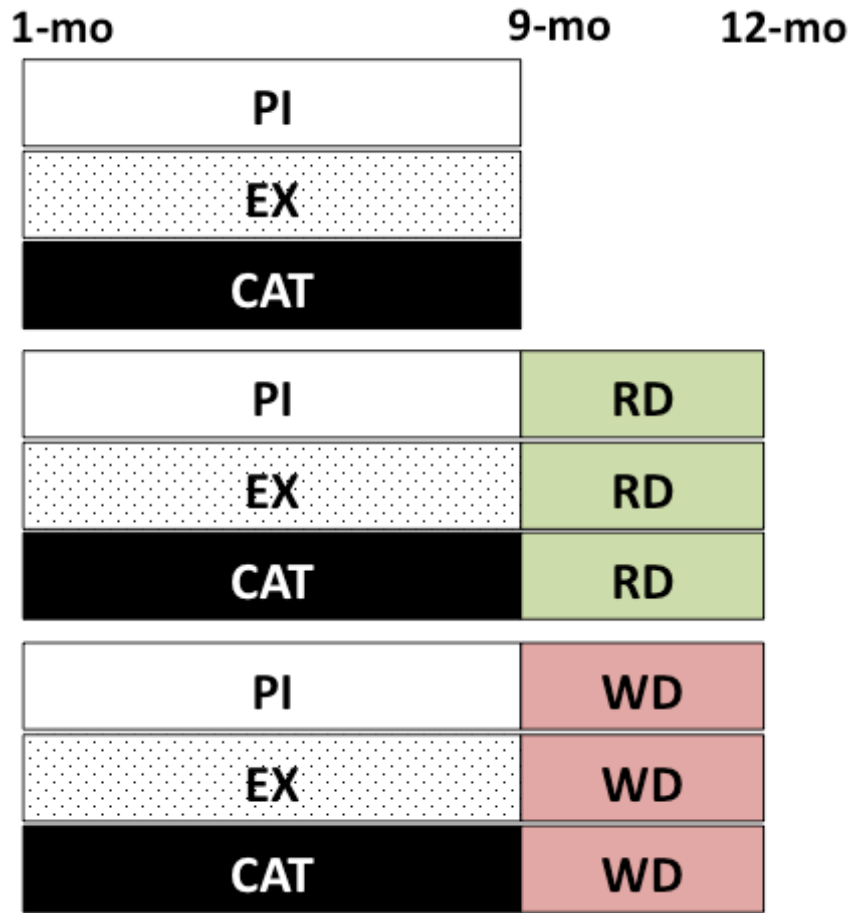
Values are expressed in arbitrary units. Means±SEM; *p<0.05 compared to 12 months RD (treatment matching-group), ^Pp<0.05 compared to PI and ^Ep<0.05 compared to EX

Supplementary Table S6 Young's elastic modulus (YEM, x 10⁻³) as a measure of compliance in femoral and cerebral arteries isolated from physically inactive (PI), exercising (EX, voluntary wheel running) and catechin-treated (CAT, 30mg/kg/day in drinking water) mice, the latter from 1 to 9 months of age combined with a regular diet (9 months RD), and then maintained for 3 months in physical inactive conditions and fed either a RD (12 months RD) or a western diet (12 months WD)

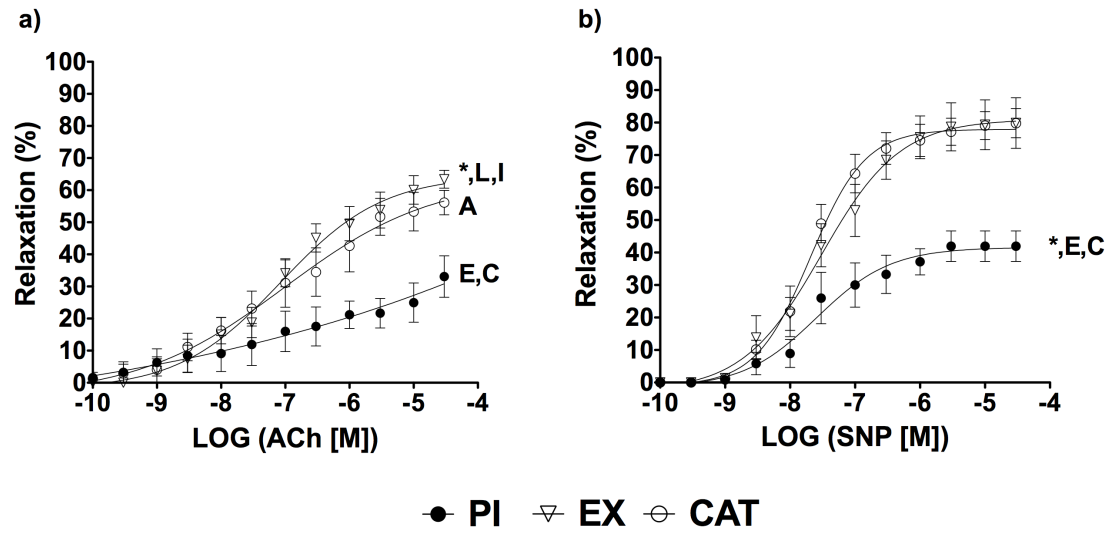
Age / diets	9 months RD			12 months RD			12 months WD			n
	PI	EX	CAT	PI	EX	CAT	PI	EX	CAT	
Femoral	73.6±3.5	47.6±2.3 ^{P,C}	84.8±5.0	80.0±4.2	70.0±5.0 [#]	65.4±4.6 ^{#,P}	80.0±4.0	67.4±3.7 ^P	68.7±2.7 ^P	5-9
Cerebral	67.7±5.6	71.9±6.3	51.1±6.5	68.0±4.0	86.7±6.7	80.1±3.5 [#]	65.7±3.4	91.1±9.4 ^P	74.6±3.0	6-10

Means±SEM; [#]p<0.05 compared to 9 months RD (treatment matching-group), ^Pp<0.05 compared to PI and ^Cp<0.05 compared to CAT

Supplementary Figure S1



Supplementary Figure S2



3.2 Article 2

Titre: The anti-hypercholesterolemic effect of low p53 expression protects vascular endothelial function in mice

Cet article a été accepté pour publication dans le journal PLoS One le 21 février 2014.

3.2.1 Apport original et contributions des coauteurs

François Leblond : Conception du projet, cueillette des données, réalisation de la majorité des expériences, analyses statistiques, interprétation des résultats, rédaction et révision du manuscrit.

Steve Poirier : Réalisation d'expériences (cellules HepG2, dosage des LDL), interprétation des résultats et révision du manuscrit.

Carol Yu : Réalisation d'expériences (dosage insuline).

Natacha Duquette : Cueillette de données (pressions artérielles).

Gaétan Mayer : Interprétation des résultats et révision du manuscrit.

Éric Thorin : Conception du projet, interprétation des résultats, rédaction et révision du manuscrit.

3.2.2 Manuscrit

The anti-hypercholesterolemic effect of low p53 expression protects vascular endothelial function in mice

Francois Leblond^{1,3,4}, Steve Poirier^{1,3,4}, Carol Yu^{1,3,4}, Natacha Duquette⁴, Gaetan Mayer^{1,3,4}, Eric Thorin^{1,2,3,4}

Departments of Pharmacology¹ and Surgery², ³Faculty of Medicine, Université de Montréal, and Research Centre⁴, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada

Corresponding author: Dr. Eric Thorin, Research Centre, Montreal Heart Institute

Abstract

Aims To demonstrate that p53 modulates endothelial function and the stress response to a high-fat western diet (WD).

Methods and Results Three-month old p53^{+/+} wild type (WT) and p53^{+/-} male mice were fed a regular or WD for 3 months. Plasma levels of total cholesterol (TC) and LDL-cholesterol were significantly elevated ($p < 0.05$) in WD-fed WT (from 2.1 ± 0.2 mmol/L to 3.1 ± 0.2 , and from 0.64 ± 0.09 mmol/L to 1.25 ± 0.11 , respectively) but not in p53^{+/-} mice. The lack of cholesterol accumulation in WD-fed p53^{+/-} mice was associated with high bile acid plasma concentrations (p53^{+/-} = 4.7 ± 0.9 vs. WT = 3.3 ± 0.2 μ mol/L, $p < 0.05$) concomitant with an increased hepatic 7-alpha-hydroxylase mRNA expression. While the WD did not affect aortic endothelial relaxant function in p53^{+/-} mice (WD = 83 ± 5 and RD = $82 \pm 4\%$ relaxation), it increased the maximal response to acetylcholine in WT mice (WD = 87 ± 2 vs. RD = $62 \pm 5\%$ relaxation, $p < 0.05$) to levels of p53^{+/-}. In WT mice, the rise in TC associated with higher ($p < 0.05$) plasma levels of pro-inflammatory keratinocyte-derived chemokine, and an over-activation ($p < 0.05$) of the relaxant non-nitric oxide/non-prostacyclin endothelial pathway. It is likely that in WT mice, activations of these pathways are adaptive and contributed to maintain endothelial function, while the WD neither promoted inflammation nor affected endothelial function in p53^{+/-} mice.

Conclusions Our data demonstrate that low endogenous p53 expression prevents the rise in circulating levels of cholesterol when fed a WD. Consequently, the endothelial stress of hypercholesterolemia is absent in young p53^{+/-} mice as evidenced by the absence of endothelial adaptive pathway over-activation to minimize stress-related damage.

Introduction

The ubiquitously-expressed tumor suppressor gene p53 is a transcription factor that is known for its capacity to regulate the cell cycle, activate DNA repair mechanisms and induce apoptosis when irreversible damage occurs [1]. Apart from its well-described roles in control of the cell cycle, repair and death, p53 has recently been linked to other key cellular functions, e.g. glucose homeostasis [2,3], aging [4], mitochondrial respiration [5] and the regulation of oxidative stress [6]. Perturbation of any of these functions could contribute to the development of cardiovascular diseases (CVD).

p53 has been shown to be activated in advanced atherosclerotic plaque, preventing aberrant growth of vascular smooth muscle cells (VSMC) and accumulation of macrophages [7]. In addition, 24-hour p53 over-expression in rat aorta has been found to induce endothelial dysfunction [8,9]. The deleterious effect of high p53 levels on endothelial function is likely due to decreased nitric oxide (NO) bioavailability, either by pro-oxidative p66shc up-regulation [8] or endothelium-protective Krüppel-like factor 2 reduction [9] that could result in *redox* disequilibrium. Indeed, low physiological p53 levels could up-regulate antioxidant gene expression, in contrast to high p53 levels [10]. Therefore, a model has been proposed in which p53 acts as “a guardian of the genome” under low physiological stress and promotes cell death when stress becomes irreversible [11]. We reported previously that p53 is elevated in senescent endothelial cells (EC) isolated from patients with severe coronary artery disease [12] and further increased in cells from active smokers characterized by high oxidative stress [13]. p53 expression can, however, be reduced by antioxidant treatment, delaying senescence [14].

It is known that the vascular endothelium is the primary target of damage associated with CVD risk factors such as hypercholesterolemia [15]. Excess lipids increase the expression of adhesion molecules and EC permeability, lower relaxant

function and promote plaque development with age [16]. The role of p53 in hypercholesterolemia-induced vascular injury is unclear.

In this study, we postulated that low p53 levels prevent the vascular stress response attributed to a high-fat/high-cholesterol Western Diet (WD) and thus protect the endothelium. To test our hypothesis, partially deficient p53 mice (p53^{+/-}) were placed on a WD for 3 months. Our data reveal that low p53 expression levels prevent blood cholesterol increment and endothelial function deterioration.

Methods

Ethics statement. The procedures and protocols in our study were approved by the Montreal Heart Institute Animal Ethics Committee and performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care* and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* of the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996).

Animals. Wild type C57Bl/6J (WT; B6/129PF2/J of the following parental strains: C57BL/6J-*A^{w-J}* and 129P3/J (formerly 129/J)) and B6.129S2-*Trp53^{tm1Tyj}/J* heterozygous (*p53^{+/-}*) [17] 3-month-old male mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). B6.129S2-*Trp53^{tm1Tyj}/J* mice were backcrossed at least five times to obtain a C57Bl/6J background. We confirmed low p53 protein expression and decreased mRNA expression of its target gene p21 (also known as cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) in the liver and aorta, our tissues of interest (Fig. 1). At age 3 months, the mice were randomly selected to receive either a regular 6% fat diet (RD, 2018, Harlan Teklad Laboratories, Madison, WI, USA) or 21% fat WD (88137, Harlan Teklad Laboratories) for 3 months. See Table 1 for the main characteristics of the diet composition. Animals were kept under standard conditions (24°C; 12:12hr light/dark cycle). During that time, blood pressure was recorded every other week using a tail-cuff device (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA). At 6 months of age, mice were fasted overnight and anesthetized (44mg/kg ketamine and 2.2mg/kg xylazine) the following morning. Blood was collected and plasma was frozen at -80°C. Livers were removed, snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C. Thoracic and abdominal aortas were harvested and placed in ice-cold physiological salt solution (PSS, pH 7.4, mmol/l: 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.18 KH₂PO₄, 1.17 MgSO₄, 24.9 NaHCO₃, 1.6 CaCl₂, 0.023

EDTA, and 10 glucose) and surrounding fat was removed. Thoracic aortas were cut in 2-mm rings for vascular reactivity studies or embedded in OCT for immunostaining. Abdominal aortas were snap-frozen in liquid nitrogen and used for western blot, enzymatic activity and qPCR studies. In order to conduct all experiments in aortas, we had to perform some of our experiments with a limited number of mice.

Plasma parameters. Glucose and keratinocyte-derived chemokine (KC) levels were measured at the Montreal Heart Institute Clinical Biochemistry Laboratory. Total and HDL-cholesterol levels were measured independently by the Clinical Biochemistry Laboratory using the Siemens Dimension® clinical chemistry system and the Flex® reagents. LDL-cholesterol levels were then calculated with the Friedewald equation. In addition, LDL-cholesterol levels were independently measured using a commercial kit (Waco Diagnostics, Richmond, VA, USA). Insulin (Alpco Diagnostics, Salem, NH, USA), bile acids (Crystal Chem, Downers Grove, IL, USA) and the thromboxane A₂ (TXA₂) metabolite 11-dehydro thromboxane B₂ (TXB₂, (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) were quantified with commercial kits according to the manufacturers' protocols.

Western blotting. Proteins isolated from the liver and abdominal aorta were loaded for SDS-gel electrophoresis and incubated overnight with p53 antibody (Leica Microsystems, Concord, ON, Canada). Livers and abdominal aortas were disrupted with a mortar and pestle on dry ice and kept at -80°C. Protein were extracted from tissue powder in a lysis buffer of the following composition (mM): Tris-HCl 50, β-glycerophosphate 20, NaF 20, EDTA 5, EGTA 10, Na₃VO₄ 1, benzamidin 10, dithiothreitol 5, PMSF 0.5, leupeptin 0.02, microcystin LR 1, and Triton X-100 1% (v/v). Thirty μg of proteins were loaded on a 10% acrylamide SDS-PAGE gel. After 45 minutes of migration at 200V, the gel was

transferred to a nitrocellulose membrane. α -actin for aortas and β -actin for livers were used as loading controls (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada).

Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Total RNA extraction was performed with RNeasy mini-kit (Qiagen Canada, Toronto, ON, Canada) following manufacturer's protocol. Reverse transcriptase reaction (100ng and 1 μ g total RNA for aortas and liver respectively) was performed as previously [18] by using the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (200 U, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Primers were selected in 2 different exons spanning a large intronic sequence, to avoid amplification of genomic DNA (see Table 2 for primer sequences). Quantitative PCR (qPCR) were performed with platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Annealing and elongation temperatures, cDNA template quantity and primer concentrations were optimized for each pair of primers to generate a standard curve with an efficacy of 100 \pm 10%. Cyclophilin A served as normalizer, and relative gene expression was calculated by the $\Delta\Delta$ CT method [19].

HepG2 cell culture experiments. HepG2 cells were seeded in 6-well plates at a density of 4 x 10⁵/ml. Twenty-four hours after plating, cells were incubated with either 0.1% DMSO or 0.5 μ g/ml doxorubicin (DOX) in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% FBS. Total RNA was extracted using RiboZol (Amresco, Solon, OH, USA) for which integrity was verified by agarose gel electrophoresis. Afterwards, cDNA was prepared from 1 μ g of total RNA using the SuperScript II Reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. qPCR was performed from 1:10 dilution of the converted cDNA mixed with PerfeCTa SYBR Green SuperMix, UNG, Low ROX (Quanta Biosciences, Gaithersburg,

MD, USA) using the MX3000p real-time thermal cycler (Agilent, Mississauga, On, Canada). For each gene of interest, dissociation curves and agarose gel electrophoresis were performed to ensure unique PCR product. Arbitrary unit was determined from PCR duplicates for each sample using the TATA box binding protein (TBP) as a normalizer. Oligonucleotides sequences used are listed in Table 2. Error bars are representative of four independent experiments analyzed in duplicate.

Myograph studies. Two-mm rings were isolated from thoracic aorta and mounted on 20- μ m tungsten wires in microvessel myographs (IMF, University of Vermont, Burlington, VT, USA), as described previously [20]. Vessels were stretched to obtain an optimal basal tension of 1.5 g and integrity of the vessels was tested with a 40mM KCl-PSS solution. After 2 washout periods, the vessels were equilibrated for 30-45 minutes alone, in presence of N^ω-nitro-L-arginine (L-NNA, 100 μ M, a NOS inhibitor), indomethacin (10 μ M, an non-selective cyclooxygenase inhibitor), furegrelate (10 μ M, thromboxane synthase inhibitor), peg-catalase (cell permeable form of catalase, 100 U/mL) or with both L-NNA and indomethacin. The thromboxane A₂ analog 9,11-Dideoxy-11 α ,9 α -epoxymethanoprostaglandin F_{2 α} (U46619) at a concentration of 100 nM was used to obtain a pre-constriction representing 50 \pm 10% of the maximal constriction. Endothelium-dependent and independent relaxation dose-response curves were performed using respectively acetylcholine (ACh, 0.1nM to 30 μ M) and sodium nitroprusside (SNP, 0.1nM to 30 μ M). Vessels were used for 2 consecutive dose-response curves separated by 3 washes period with fresh PSS and another incubation period of 30-45 minutes with drugs. Preliminary studies showed no effect of consecutive dose-response curves in aortas (data not included). The maximal contraction was obtained by adding 127mM KCl-

PSS on each vessel at the end of the protocols. Relaxation values were obtained for each doses with this equation: Relaxation (%) = 100% - contraction (%).

Superoxide dismutase 2 (SOD2) activity. SOD2 activity was assessed in abdominal aorta, as recommended in the manufacturer's protocol (Cayman Chemical Company). It was measured in the presence of 1 mM of potassium cyanide to block copper-zinc SOD activity [21]. Values (units) were adjusted with protein content.

Quantification of oxidative stress in aorta. The fluorescent oxidative probe dihydroethidium (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) was used to evaluate the impact of oxidative stress on aorta sections [22,23]. DHE is a cell permeable dye that is oxidized by O_2^- to ethidium bromide, which subsequently intercalates with DNA and is trapped within cell nuclei. DNA counterstaining was performed using To-Pro-3 (Molecular Probe, Burlington, ON, Canada). Frozen aortic segments from the thoracic aorta were cut into 14- μ m thick sections. Sections were double-stained with a mixture of 5 μ mol/L DHE and 2 μ mol/L To-Pro-3. DHE fluorescence was visualized with a confocal microscope (Zeiss LSM 510, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany; objective Plan-Apochromat, 40x/1.3, oil). DHE was excited with a HeNe laser (543nm) and emitted light was collected between 565 and 615 nm. The camera's acquisition settings were identical for all images. Computer-based analysis was performed using Image J software (National Institute of Health, USA) and calculated by the following equation: $I = \Sigma I / A$, where I is the fluorescence intensity, ΣI the summation of all nuclei intensity, A the total area of the nuclei.

Statistical analysis. n refers to the number of animals studied in each protocol. The

results are presented as means \pm SEM. Half-maximum effective concentration (EC_{50}) and pD_2 values, negative logs of EC_{50} , were measured from individual concentration-response curves. Unpaired student's t -test or 2-way analysis of variance was followed by unpaired student's t -test. $P < 0.05$ values were considered to be statistically significant.

Results

Physiological and plasma changes. Body weight increased after 3 months on WD in both p53^{+/-} and WT mice (Table 3). WD elevated glycaemia in both strains. Blood pressure remained stable during the 3-month treatment period (Table 3). Levels of triglycerides were similar following the WD in both groups and tended to decrease (Table 3). In contrast, total cholesterol (TC), HDL-cholesterol and estimated LDL-cholesterol levels remained unchanged in p53^{+/-} mice fed WD but rose in WT mice (Table 3). However, the rise in LDL-cholesterol observed in the WT mice was not confirmed when it was directly measured suggesting the importance of non-LDL-cholesterol, i.e. the VLDL-cholesterol (Table 3). Finally, plasma levels of KC, the pro-inflammatory mouse ortholog of human interleukin-8 (IL-8), increased significantly in WT mice only (Table 3). Therefore, neither cholesterol nor KC circulating levels changed in p53^{+/-} mice when fed a WD.

Expression of genes involved in hepatic cholesterol metabolism. We quantified the expression of key genes implicated in cholesterol homeostasis in the liver: mRNA levels of the rate-limiting cholesterol synthesis enzyme HMG CoA reductase (Fig. 2A), LDL receptors (LDLR) responsible for LDL uptake (Fig. 2B), apolipoprotein B (apoB), a necessary partner for LDL in receptor binding (Fig. 2C), and proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) that mediates degradation of the LDLR (Fig. 2D) were unaffected by WD in both mouse strains. Hence, the differences in circulating cholesterol levels between WT and p53^{+/-} mice on WD did not appear to originate from changes in cholesterol synthesis or liver uptake.

Bile acid metabolism. Bile acid metabolism is the main cholesterol elimination pathway. In p53^{+/-} mice, circulating bile acid levels were higher with both dietary regimens compared to WT mice (Table 3). Bile acid metabolism is tightly regulated by multiple partners (Fig. 3A), and their synthesis is mainly under the control of the enzyme 7-alpha-hydroxylase (Cyp7A1) [24]. Accordingly, p53^{+/-} mice expressed more Cyp7A1 mRNA than WT mice fed RD (Fig. 4A). As expected, WD induced a 2-fold increase in Cyp7A1 gene expression in WT mice, reaching a similar expression level as in p53^{+/-} mice (Fig. 4A). Liver X receptors (LXR), which directly regulate Cyp7A1 expression [25], were augmented in WT mice on WD, while remaining unchanged in p53^{+/-} mice (Fig. 4B). Up-regulation of Cyp7A1 expression in p53^{+/-} mice is, therefore, under the control of a partner other than LXR. It has been reported that p53 directly regulates small heterodimer partner (SHP), which inhibits Cyp7A1 expression [26,27]. SHP expression was lower in p53^{+/-} than in WT mice independently of the diet (Fig. 4C). Although SHP can be activated by farnesoid X receptors (FXR), a nuclear receptor critical in bile acid metabolism [28], FXR expression did not change significantly in either mouse strain (Fig. 4D). Altogether, these results indicate that low p53 is associated with constitutively low levels of SHP that could contribute to the up-regulation of Cyp7A1 expression and, thus, higher constitutive bile acid levels (Fig. 3B).

To validate this hypothesis, we used DOX to stimulate p53 expression in HepG2 cells, a human hepatocarcinoma cell line that expresses wild-type p53. DOX, a well-known activator of p53, has previously shown to increase p53 protein and gene expressions in HepG2 cells [26,29]. Incubation with DOX (0.5 µg/ml) for 24 hours activated genes expression of p53, p21, SHP, but not that of Cyp7A1 in HepG2 cells (Fig. 5).

Vascular endothelial function. The vascular endothelium is highly sensitive to the metabolic and *redox* environment [30], and premature decline of its function, evidenced by decreased relaxing properties, is an early event in the presence of CVD risk factors [15]. We therefore tested the hypothesis that endothelial relaxing function is protected in p53^{+/-} mice due to the absence of elevated circulating cholesterol levels on WD. At 3 months, when fed RD, no differences in maximal relaxation (Fig. 6 and Table 4) and sensitivity (data not included) were noted between p53^{+/-} and WT mice. At 6 months, however, the maximal relaxation induced by Ach was greater in p53^{+/-} than in WT mice fed RD (Fig. 6 and Table 4), owing to a limited age-related decline in endothelial function in p53^{+/-} mice in contrast to WT mice. In WT mice on RD, in the presence of the nonspecific cyclooxygenase (COX) inhibitor indomethacin or cell-permeable PEG-catalase, maximal relaxation by Ach increased to similar values as in p53^{+/-} mice (Table 4), suggesting that the age-related decline in endothelial relaxing function in WT, but not in p53^{+/-} mice, is linked with a rise in COX1/2-associated oxidative stress. It is unlikely that this phenomenon derives from augmented TXA₂ production, as reported previously in renal arteries [18], since the thromboxane synthase inhibitor furegrelate did not restore maximal relaxation in arterial segments isolated from WT mice (Table 4, Fig. 7A). Furthermore, gene expression of thromboxane synthase (Fig. 7B) and circulating levels of the TXA₂ metabolite TXB₂ were not different between the 2 mouse strains (Fig. 7C).

After 3 months on WD, maximal relaxation induced by Ach in WT mice increased to match that evoked in p53^{+/-} mice (Table 4, Fig. 6), demonstrating that the vascular endothelium of healthy mice exposed to deleterious diets can adapt, at least initially, to stressful environments. VSMC function was not affected by WD, as evidenced by the similar relaxing effect of SNP and the maximal contraction evoked by 127 mM KPSS in WT and p53^{+/-} mice (data not included). Indomethacin did not further increase the

relaxation induced by Ach in WT mice (Table 4). While no difference in relaxation were observed after blockade of the NO pathway with L-NNA alone (data not included), L-NNA and indomethacin combination revealed the presence of a more effective non-NO/non-prostacyclin (PGI₂)-relaxing pathway in WT mice fed WD compared to RD (Table 4, Fig. 8). In p53^{+/-} mice, similar endothelium-dependent relaxation was seen in the presence of L-NNA and indomethacin in mice fed either diet (Table 4, Fig. 8), indicating that this non-NO/non-PGI₂ pathway is not further activated by WD in p53^{+/-} mice.

Oxidative stress and SOD2 activity. Oxidative stress limits endothelial function [18]. We observed similar levels of global oxidative stress in aorta from all groups (Fig. 9A). Importantly, however, the WD augmented SOD2 activity in WT mice (Fig. 9B) further supporting the ability of young WT mice to up-regulate antioxidant enzyme activity in response to the stress created by the WD. In p53^{+/-} mice, although not statistically significant (p=0.08), SOD2 activity tended to increase as well following the WD (Fig 9B). Consequently, SOD2 activity was similar in WT and p53^{+/-} mice fed a WD (Figure 9B).

Discussion

The two major findings of our study are that between 3 and 6 months of age, the endothelial dilatory function was maintained in mice expressing low p53 levels, while it degraded in the control strain, suggesting that a lower p53 activity confers endothelial resistance to age-related stress. Second, the WD did not elevate circulating levels of cholesterol in p53^{+/-} mice unlike in the control strain. This effect was associated with a low-grade inflammatory response if any, a lack of change in vascular endothelial function and, thus, absent expression of adaptive and compensatory dilatory mechanisms in response to the combination of aging and metabolic stress. Our data suggest that, independently of its direct endothelial effects and by accelerating cholesterol elimination, the low activity of the p53 pathway permitted altogether the expression of a phenotype that is protective of the cardiovascular system.

Complete abrogation of p53 expression in mice (p53^{-/-}) leads to the development of carcinomas as early as age 10 weeks, causing their premature death [17,31]. In p53^{+/-} mice, however, carcinomas occur later in life, starting at 9 months of age (~2% of mice) [31,32]. There is therefore no doubt that impaired expression of p53 and its subsequently poor increase in expression in response to stress are deleterious by not regulating the cell cycle following damage, and thus, not promoting growth arrest and senescence or apoptosis [17,33,34]. The role of p53 is, however, not limited to tumour suppression. Atherosclerotic plaque progression is accelerated in p53^{-/-} mice fed a WD and in severely dyslipidemic mice [35-37], demonstrating that preventing the elimination of damaged cells elicits not only tumors but also premature atheromas, among other pathologies. We previously reported that activity of the p53/p21 pathway was heightened in EC isolated from atherosclerotic patients [12], and even more so in EC from active smokers [13], as seen in advanced atherosclerotic plaques [7]. On the other hand, constitutive p53

hyperactivity evokes premature death (23% reduction of median lifespan) in mice due to oversensitivity to damage and accelerated reparative cell turnover [38]. It has been proposed that p53 activation induces free radical-dependent irreversible damage and cell death by blunting the expression of antioxidant enzymes [39]. In contrast to the response to damage associated with augmented p53 activity, it has been suggested that low p53 levels are protective because they stimulate antioxidant defense mechanisms [10]. We observed that reduction of free radical generation with an antioxidant was essential to delay p53-associated senescence of EC isolated from arteries of atherosclerotic patients [14]. It appears that p53 and reactive oxygen species (ROS) participate in a complex crosstalk where p53 can favour either anti- or pro-oxidant pathways to control cell fate [6]. Recent data indicate that low p53, despite its probable low capacity to induce a protective DNA damage response could promote cellular protection [10], but only for a limited time [17,31].

We observed that endothelial function was better maintained with time in aorta isolated from p53^{+/-} mice than in WT mice (Table 4, Fig. 6), suggesting that the p53^{+/-} genotype is associated with a better resistance to age-related stress. In support of this suggestion, the age-dependent decline in endothelial function of arteries isolated from WT mice could be reversed by either nonspecific COX1/2 inhibition or by enhancing cellular antioxidant capacities with cell-permeable PEG-catalase (Table 4). We reported previously that a similar age-associated (from 3 to 6 months) decline in dilation of renal arteries in C57Bl/6 mice was attributed to heightened TXA₂ release and oxidative stress; the former was prevented by antioxidant treatment with the polyphenol catechin [18]. While TXA₂ does not seem to contribute to the reduction of maximal relaxation in 6-month-old WT mice (Fig. 7), COX1/2 can produce either prostanoids or ROS that have been shown to be pro-constrictors [40]. For example, PGF_{2α} mediates constriction in

aorta from hamsters [41], and COX-derived ROS constrict the aorta of spontaneously hypertensive rats [42]. In aged rats, an increase in endothelium-derived constricting factor produced by both COX isoforms is responsible for endothelial dysfunction of femoral arteries [43]. It appears therefore, that low p53 expression mimics the protective effect of catechin in WT mice [18], presumably by reducing COX-derived constricting factors.

A WD has been shown to induce atherosclerosis in aged LDLR^{-/-} mice because they were unable to up-regulate the expression of antioxidant enzymes [44]. In WT mice, however, our data demonstrate that a hypercholesterolemic WD engenders stress as evidenced by a rise in circulating pro-inflammatory KC (Table 3). KC, the IL-8 mouse ortholog in humans, is responsible for monocyte arrest in early atherosclerotic lesions [45,46], contributing to the early development of inflammation and atherosclerosis [47]. This stress is, however, counteracted by a compensatory increase of SOD2 activity (Fig. 9B) and the expression of a higher non-NO/non-PGI₂ pathway (Table 4, Fig. 8). SOD up-regulation likely contributes to maximal endothelium-dependent relaxation by Ach, as reported previously [21,48]. Although these protective compensatory adaptations to their new environment are likely temporary, they concur with previous results from our group and others [49-51]. Hyperactivity of the endothelium-derived hyperpolarizing pathway in young dyslipidemic mice [50], increased NO production in hypercholesterolemic rabbits [51] and enhanced aortic relaxation due to increased leptin in mice fed high-fat diet [49] were reported. Therefore, the rise in circulating cholesterol, known to induce inflammation, oxidative stress and atherosclerosis in humans [16,52], elicits a transitory adaptive defense response in the vascular endothelium. This adaptive response, however, may not be possible in old mice as shown by others in 12-month old LDLR^{-/-} mice [43].

In young p53^{+/-} mice, however, the WD did not evoke hypercholesterolemia, only increasing glycaemia and body weight; furthermore, circulating KC did not rise significantly and endothelial function was not altered with age. Therefore, the rise in blood glucose in the absence of hypercholesterolemia was not a significant stress stimulus in these mice. Nonetheless, SOD2 activity tended to increase and was not different from that measured in the aorta of WT mice suggesting that p53^{+/-} mice are still capable of sensing a change in the metabolic environment and adapt to this change. Therefore, while the low expression of p53 likely explains the lack of hypercholesterolemia in these mice, the role of p53 in the vascular adaptive response remains questionable.

It has been shown that lowering circulating cholesterol levels ameliorates endothelial function [53,54]; the absence of hypercholesterolemia when fed a WD could not alter endothelial function in p53^{+/-} mice. Blood glucose increased similarly in both groups of mice, while triglycerides slightly decreased as previously reported by others [55,56]. In these young mice, the rise (~ 35%) in glucose alone is therefore not sufficient to induce a significant endothelial stress. The question is why the WD did not raise cholesterol? The expression of hepatic HMG CoA reductase, LDLR, apoB and PCSK9 (Fig. 2) was not different from values measured in WT mice, suggesting similar cholesterol synthesis and LDL uptake. We found, however, that bile acids were elevated in the plasma of p53^{+/-} mice (Table 3). Bile acid metabolism is the main cholesterol clearance pathway. Resins are lipid-lowering drugs that can reduce LDL-cholesterol by approximately 20%, by binding bile acids in the intestine and leading to its excretion in the feces [57]. By sequestering bile acids and lowering their amount, resins force the liver to produce more bile acids with cholesterol as substrate, thereby lessening available cholesterol in the blood [57]. Because excess bile acids can culminate in damage [58],

their metabolism is tightly regulated (Fig. 3A). p53 has recently been implicated in the regulation of bile acid metabolism [26,27]. Together with the transcription co-activator mixed-lineage leukemia 3 (MLL3), p53 can bind the SHP promoter to stimulate its expression [26]. p53 activation with doxorubicin in p53^{-/-}, MLL3^{-/-} and SHP^{-/-} mice did not increase bile acid concentration in the serum and liver in contrast to WT mice [26,27]. In line with this finding, we noted that SHP expression was lower in the liver of p53^{+/-} mice, whereas Cyp7A1 mRNA, the enzyme responsible for bile acid production, was higher (Table 3, Fig. 2). However, despite an increase in gene expressions of p21, p53 and SHP, DOX did not lower Cyp7A1 expression in HepG2 cells (Fig. 5), contrasting with the report by Kim and colleagues [26] performed in the same experimental conditions. The reason for this discrepancy is unknown. The response to DOX of the HepG2 cells, in which p53 activity is constitutively increased, may be biased and not representative of the physiological regulatory role of p53 *in vivo*. It is a limitation of this study because cultured cells are under stress and have elevated levels of p53, which is likely accompanied by numerous intracellular adaptations that may blunt responses otherwise expected *in vivo*. Finally, we did not clearly identify the precise lipoprotein fraction responsible for the rise in plasma cholesterol in the WT mice, which was not an objective of our study. Direct measures of LDL-cholesterol, however, showed that it did not change, suggesting that non-HDL-cholesterol (possibly VLDL) may be implicated in the hypercholesterolemia observed in WT mice following the WD. This has been previously reported to occur in mice fed a high fat diet [59]. Nonetheless, and on aggregate, these data indicate that enhanced bile acid synthesis from cholesterol in p53^{+/-} mice blunted the hypercholesterolemia normally associated with a WD; this, consequently, could not stress the vascular endothelium. The latter explanation is however speculative and represents the main limitation of the study. Our study was not able to demonstrate a clear

link between the endothelial function and p53 genotype. This would have been possible if the WD had induced a similar metabolic profile in the two mouse groups, the initial purpose of the study. Nonetheless, the vascular endothelium was resistant to the deterioration of its function with aging that was observed in WT mice (Table 4).

In conclusion, our data demonstrate that low p53 activity is coupled with constitutively faster cholesterol turnover from the diet. The elevated levels of bile acids in p53^{+/-} mice, however, may contribute to heightened risk of premature carcinogenesis in later life. In addition, our data suggest that p53 regulate endothelial function and confer age-related stress resistance. However, p53 may not be involved in the adaptation to stress of the endothelium since SOD2 activity increased in both mouse strains when challenged with a WD. Furthermore, the fact that a high-fat diet did not increase cholesterol levels in the p53 mutant mice is the direct demonstration of the ubiquitous functions of p53.

Acknowledgments

The authors would like to thank the staff of the animal facility of the Montreal Heart Institute.

References

1. Chumakov PM (2007) Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms. *Biochemistry (Mosc)* 72: 1399-1421.
2. Schwartzenberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E (2004) The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* 64: 2627-2633.
3. Webster NJ, Resnik JL, Reichart DB, Strauss B, Haas M, et al. (1996) Repression of the insulin receptor promoter by the tumor suppressor gene product p53: a possible mechanism for receptor overexpression in breast cancer. *Cancer research* 56: 2781-2788.
4. Feng Z, Hu W, Teresky AK, Hernando E, Cordon-Cardo C, et al. (2007) Declining p53 function in the aging process: a possible mechanism for the increased tumor incidence in older populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16633-16638.
5. Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, et al. (2006) p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312: 1650-1653.
6. Liu B, Chen Y, St Clair DK (2008) ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic Biol Med* 44: 1529-1535.
7. Mercer J, Bennett M (2006) The role of p53 in atherosclerosis. *Cell Cycle* 5: 1907-1909.
8. Kim CS, Jung SB, Naqvi A, Hoffman TA, DeRicco J, et al. (2008) p53 impairs endothelium-dependent vasomotor function through transcriptional upregulation of p66shc. *Circ Res* 103: 1441-1450.
9. Kumar A, Kim CS, Hoffman TA, Naqvi A, Dericco J, et al. (2011) p53 impairs endothelial function by transcriptionally repressing Kruppel-Like Factor 2. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31: 133-141.
10. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, et al. (2005) The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 11: 1306-1313.
11. Bensaad K, Vousden KH (2005) Savior and slayer: the two faces of p53. *Nat Med* 11: 1278-1279.
12. Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Nguyen A, Villeneuve L, et al. (2007) Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Ageing Dev* 128: 662-671.

13. Farhat N, Thorin-Trescases N, Voghel G, Villeneuve L, Mamarbachi M, et al. (2008) Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers. *Can J Physiol Pharmacol* 86: 761-769.
14. Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Mamarbachi AM, Villeneuve L, et al. (2008) Chronic treatment with N-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mech Ageing Dev* 129: 261-270.
15. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S (2009) Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care* 32 Suppl 2: S314-321.
16. Libby P, Ridker PM, Hansson GK (2011) Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473: 317-325.
17. Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, et al. (1994) Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 4: 1-7.
18. Gendron ME, Thorin E (2007) A change in the redox environment and thromboxane A₂ production precede endothelial dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H2508-2515.
19. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29: e45.
20. Thorin E, Meerkin D, Bertrand OF, Paiement P, Joyal M, et al. (2000) Influence of postangioplasty beta-irradiation on endothelial function in porcine coronary arteries. *Circulation* 101: 1430-1435.
21. Rippe C, Lesniewski L, Connell M, LaRocca T, Donato A, et al. (2010) Short-term calorie restriction reverses vascular endothelial dysfunction in old mice by increasing nitric oxide and reducing oxidative stress. *Aging cell* 9: 304-312.
22. Drouin A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Belanger E, Fernandes P, et al. (2011) Catechin treatment improves cerebrovascular flow-mediated dilation and learning abilities in atherosclerotic mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 300: H1032-1043.
23. Drouin A, Farhat N, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Gillis MA, et al. (2011) Up-regulation of thromboxane A₂ impairs cerebrovascular eNOS function in aging atherosclerotic mice. *Pflugers Arch* 462: 371-383.

24. Chiang JY (2009) Bile acids: regulation of synthesis. *Journal of lipid research* 50: 1955-1966.
25. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383: 728-731.
26. Kim DH, Kim J, Lee JW (2011) Requirement for MLL3 in p53 regulation of hepatic expression of small heterodimer partner and bile acid homeostasis. *Molecular endocrinology* 25: 2076-2083.
27. Kim DH, Lee JW (2011) Tumor suppressor p53 regulates bile acid homeostasis via small heterodimer partner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 12266-12270.
28. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, et al. (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284: 1362-1365.
29. Maeda Y, Hwang-Verslues WW, Wei G, Fukazawa T, Durbin ML, et al. (2006) Tumour suppressor p53 down-regulates the expression of the human hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) gene. *Biochem J* 400: 303-313.
30. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y (2009) Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73: 411-418.
31. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., et al. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356: 215-221.
32. Harvey M, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, Bradley A, et al. (1993) Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat Genet* 5: 225-229.
33. Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331.
34. Vousden KH, Prives C (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137: 413-431.
35. Guevara NV, Kim HS, Antonova EI, Chan L (1999) The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nat Med* 5: 335-339.
36. Mercer J, Figg N, Stoneman V, Braganza D, Bennett MR (2005) Endogenous p53 protects vascular smooth muscle cells from apoptosis and reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Circ Res* 96: 667-674.

37. Merched AJ, Williams E, Chan L (2003) Macrophage-specific p53 expression plays a crucial role in atherosclerosis development and plaque remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1608-1614.
38. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, et al. (2002) p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415: 45-53.
39. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389: 300-305.
40. Feletou M, Huang Y, Vanhoutte PM (2011) Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *British journal of pharmacology* 164: 894-912.
41. Wong SL, Leung FP, Lau CW, Au CL, Yung LM, et al. (2009) Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin F2alpha mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging. *Circ Res* 104: 228-235.
42. Yang D, Feletou M, Boulanger CM, Wu HF, Levens N, et al. (2002) Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 136: 104-110.
43. Shi Y, Man RY, Vanhoutte PM (2008) Two isoforms of cyclooxygenase contribute to augmented endothelium-dependent contractions in femoral arteries of 1-year-old rats. *Acta Pharmacol Sin* 29: 185-192.
44. Collins AR, Lyon CJ, Xia X, Liu JZ, Tangirala RK, et al. (2009) Age-accelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes. *Circ Res* 104: e42-54.
45. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, et al. (1999) MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398: 718-723.
46. Huo Y, Weber C, Forlow SB, Sperandio M, Thatte J, et al. (2001) The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium. *The Journal of clinical investigation* 108: 1307-1314.
47. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA (2009) Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovascular research* 84: 353-360.

48. Durrant JR, Seals DR, Connell ML, Russell MJ, Lawson BR, et al. (2009) Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase. *J Physiol* 587: 3271-3285.
49. Benkhoff S, Loot AE, Pierson I, Sturza A, Kohlstedt K, et al. (2012) Leptin potentiates endothelium-dependent relaxation by inducing endothelial expression of neuronal NO synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 1605-1612.
50. Krummen S, Falck JR, Thorin E (2005) Two distinct pathways account for EDHF-dependent dilatation in the gracilis artery of dyslipidaemic hApoB^{+/+} mice. *British journal of pharmacology* 145: 264-270.
51. Minor RL, Jr., Myers PR, Guerra R, Jr., Bates JN, Harrison DG (1990) Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J Clin Invest* 86: 2109-2116.
52. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, et al. (1998) Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 97: 1837-1847.
53. Cheng HM, Ye ZX, Chiou KR, Lin SJ, Charng MJ (2007) Vascular stiffness in familial hypercholesterolaemia is associated with C-reactive protein and cholesterol burden. *Eur J Clin Invest* 37: 197-206.
54. Grigore L, Raselli S, Garlaschelli K, Redaelli L, Norata GD, et al. (2013) Effect of treatment with pravastatin or ezetimibe on endothelial function in patients with moderate hypercholesterolemia. *Eur J Clin Pharmacol* 69: 341-346.
55. Bailey-Downs LC, Tucsek Z, Toth P, Sosnowska D, Gautam T, et al. (2013) Aging exacerbates obesity-induced oxidative stress and inflammation in perivascular adipose tissue in mice: a paracrine mechanism contributing to vascular redox dysregulation and inflammation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 68: 780-792.
56. Sansbury BE, Cummins TD, Tang Y, Hellmann J, Holden CR, et al. (2012) Overexpression of endothelial nitric oxide synthase prevents diet-induced obesity and regulates adipocyte phenotype. *Circ Res* 111: 1176-1189.
57. Insull W, Jr. (2006) Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. *Southern medical journal* 99: 257-273.
58. Perez MJ, Briz O (2009) Bile-acid-induced cell injury and protection. *World journal of gastroenterology : WJG* 15: 1677-1689.

59. Nishina PM, Lowe S, Verstuyft J, Naggert JK, Kuypers FA, et al. (1993) Effects of dietary fats from animal and plant sources on diet-induced fatty streak lesions in C57BL/6J mice. *J Lipid Res* 34: 1413-1422.

Figure legends

Figure 1. p53 protein expression and its target gene p21 mRNA expression. A) liver and B) aorta of WT and p53^{+/-} 6-month old mice. α -actin for aorta and β -actin for liver were used as internal loading controls. Data are mean \pm SEM ; n=5-9. #p<0.05.

Figure 2. Similar synthesis and uptake of cholesterol. Hepatic mRNA expression of important genes implicated in cholesterol metabolism in WT and p53^{+/-} 6-month old mice fed a regular diet (RD) or a western diet (WD). A) HMG CoA reductase, B) LDL receptor (LDLR), C) apolipoprotein B (apoB) and D) proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9). Data are mean \pm SEM ; n=5-7.

Figure 3. Key mediators of bile acids (BA) synthesis in the liver of mice. A) Transcription factors p53 and farnesoid X receptor (FXR) can activate the transcription of small heterodimer partner (SHP) which inhibits 7- α -hydroxylase (Cyp7A1), the first enzyme in the BA synthesis pathway. Liver X receptor (LXR) can activate transcriptionally Cyp7A1 to produce more BA. B) The Western diet (WD) activated transcription of LXR in WT mice in association with increased Cyp7A1 gene expression. Lower p53 expression in p53^{+/-} mice is associated with lower gene expression of SHP. While no difference is seen in FXR and LXR, Cyp7A1 gene expression and BA levels are elevated.

Figure 4. Bile acid genes expression differs between p53^{+/-} and WT mice. Hepatic mRNA expression of genes implicated in bile acid metabolism in WT and p53^{+/-} 6-month-old mice fed a regular diet (RD) or a 3-month Western diet (WD). A) 7-alpha-hydroxylase (Cyp7A1), B) liver X receptors (LXR), C) small heterodimer partner (SHP), and D) farnesoid X receptors (FXR). Data are means \pm SEM; n=5-7. *p<0.05 compared to RD with matching genotype; #p<0.05 compared to WT mice with matching diet.

Figure 5. Effect of doxorubicin (DOX) on gene expression in HepG2 cells. Gene expression of A) p53, B) p21, C) SHP and D) Cyp7A1 in human hepatic HepG2 cell lines after a 24-hour incubation with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ DOX, a known-activator of p53. Data are mean \pm SEM of four independent experiments analyzed in duplicate.

Figure 6. Age and WD affect differentially p53^{+/-} and WT mice. Aortic endothelium-dependent relaxation concentration-response curves with acetylcholine (ACh) in 3-month (3-mo) and 6-month (6-mo) WT or p53^{+/-} mice fed a regular diet (RD) or Western diet (WD). Data are means \pm SEM; n=4-14. [&]p<0.05 compared to 3-mo; *p<0.05 compared to RD; #p<0.05 compared to 6-mo WT RD mice.

Figure 7. Effect at 6-month on thromboxane A₂ pathway. Measures in WT and p53^{+/-} mice fed a regular diet (RD) of A) endothelium-dependent relaxations to acetylcholine (ACh) of aorta segments isolated from WT and p53^{+/-} mice were obtained in presence of thromboxane synthase inhibition (furegrelate, 10 μM), B) thromboxane synthase (TXS) gene expression in the aorta, C) release of the thromboxane A₂ metabolite 11-dehydro thromboxane B₂ (TXB₂) in the plasma. Data are mean \pm SEM. n=3-6 in (A), n=3 in (B) and n=4 in (C).

Figure 8. Adaptive endothelium-dependent mechanisms are not activated in p53^{+/-} mice. Effect of WD on non-NO/non-prostacyclin endothelium-dependent relaxation of aorta from WT and p53^{+/-} mice. Endothelium-dependent relaxation by acetylcholine (ACh) of aortic segments from WT and p53^{+/-} mice was assessed in the presence of NOS inhibition (L-NNA, 100 μM) and nonspecific COX1/2 inhibition (indomethacin, 10 μM). Data are means \pm SEM. n=5-10.

Figure 9. Aortic oxidative stress level and SOD2 activity. (A) Staining with dihydroethidium (DHE, red) of WT and p53^{+/-} 6-month old mice fed a regular diet (RD) or a 3-month western diet (WD). Data are mean±SEM; *n* = 3-4. (B) Effect of the WD on superoxide dismutase 2 (SOD2) activity in aortic segments from WT and p53^{+/-} mice. Data are mean±SEM; *n* = 3-8. **p*<0.05 compared to RD with matching genotype.

Tables

Table 1. General characteristics of the diets

% of energy coming from	RD	WD
Carbohydrates	58.0	42.7
Fat	18.0	42.0
Protein	24.0	15.2

RD = regular diet, WD = western diet.

Table 2. Sequences of the primers for real-time quantitative PCR

Genes	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<u>Human</u>		
Cyp7a1	AGGAACCCAGAAGCAATGAA	TCCTTAGCTGTCCGGATGTT
p21	GGAAGACCATGTGGACCTGT	TAGGGCTTCCTCTTGGAGAA
p53	CATGAGCGCTGCTCAGATAG	TGGTACAGTCAGAGCCAACCT
SHP	GCTGTCTGGAGTCCTTCTGG	ACTTCACACAGCACCCAGTG
TBP	GCTGAATATAATCCCAAGCGATT	GCAGTTGTCCGTGGCTCTCT
<u>Mouse</u>		
Apolipoprotein B	AAGCTGTTCAAGTGGCAGCAACA	AGAGAGGCTTGCAAGTTGACCA
Cyclophilin A	CCGATGACGAGCCCTTGG	GCCGCCAGTGCCATTATG
Cyp7a1	AACGATACTCTCCACCTTTG	CTGCTTTCATTGCTTCAGGG
FXR	TGGAGAACTCAAATGACTCAGG	CTTTTGTAGCACATCAAGCAGG
HMG CoA reductase	AGTACATTCTGGGTATTGCTGG	ACTCGCTCTAGAAAGGTCAATC
LDLR	GTATGAGGTTCTGTCCATC	CCTCTGTGGTCTTCTGGTAG
LXR	CGAGGTCATGCTTCTGGAG	CTCTGGAGAACTCAAAGATGGG
p21	TGTCGCTGTCTTGCCTCT	AGACCAATCTGCGCTTGGA
PCSK9	TGCAAAATCAAGGAGCATGGG	CAGGGAGCACATTGCATCC
SHP	GTCCCAAGGAGTATGCGTAC	CAGGGCTCCAAGACTTCAC
TXS	TTGGAACCTCCGAGAGCGATA	CACTGTCTGCTACCATCTTG

Table 3. Body weight, SBP and plasma profile in WT and p53^{+/-} mice fed a RD or WD

Parameters	WT RD	WT WD	p53 ^{+/-} RD	p53 ^{+/-} WD
Body weight (g)	25.8±0.5 (16)	33.0±1.6* (8)	28.1±0.8 [#] (12)	34.6±1.6* (8)
SBP (mm Hg)	162±2 (8)	161±4 (8)	157±4 (8)	158±7 (8)
Glucose (mmol/L)	14.8±1.4 (7)	20.5±2.3* (8)	14.4±2.1 (7)	20.3±3.1* (7)
Triglycerides (mmol/L)	0.53±0.07 (8)	0.33±0.04* (8)	0.50±0.08 (7)	0.39±0.08 (7)
Total cholesterol (mmol/L)	2.1±0.2 (8)	3.1±0.2* (8)	2.3±0.1 (7)	2.6±0.2 (7)
HDL (mmol/L)	1.2±0.1 (8)	1.7±0.1* (8)	1.4±0.1 (7)	1.5±0.1 (7)
LDL measured (AU)	1.00±0.06 (10)	1.13±0.09 (9)	1.10±0.12 (5)	0.96±0.10 (4)
LDL calculated (mmol/L)	0.64±0.09 (8)	1.25±0.11* (8)	0.75±0.03 (7)	0.76±0.18 [#] (7)
KC (mmol/L)	102.5±29.9 (6)	244.9±43.9* (6)	107.2±34.5 (5)	159.5±54.8 (5)
Bile acids (µmol/L)	3.0±0.5 (5)	3.3±0.2 (4)	4.2±0.7 [#] (4)	4.7±0.9 [#] (5)

Data are means±SEM. (n) mice. SBP = systolic blood pressure, RD = regular diet, WD = western diet, KC = keratinocyte-derived chemokine. *p<0.05 compared to RD with matching genotype; [#]p<0.05 compared to WT mice with matching diet.

Table 4. Efficacy (E_{max}) of Ach in aorta from 3-mo and 6-mo WT and p53^{+/-} mice fed RD or WD

	WT			p53 ^{+/-}		
	3-mo RD	6-mo RD	6-mo WD	3-mo RD	6-mo RD	6-mo WD
Ach	100.0±0 (6)	62.2±5.1 ^{&} (14)	86.8±1.8* (4)	92.6±3.2 (5)	81.5±3.5 ^{&,#} (9)	83.1±4.8 (5)
+indo	n.a.	80.8±4.2 [^] (10)	80.4±6.9 (5)	n.a.	85.0±5.7 (9)	74.8±8.1 (5)
+furegrelate	n.a.	58.5±7.8 (6)	n.a.	n.a.	82.1±4.9 (3)	n.a.
+PEG-catalase	n.a.	84.7±9.3 [^] (5)	85.9±2.9 (5)	n.a.	84.8±5.1 (4)	88.9±4.9 (5)
+L-NNA/indo	n.a.	36.1±4.9 (16)	57.2±3.5* (5)	n.a.	51.9±11.9 (6)	60.7±2.4 (5)

Data are means±SEM. (n) mice. Ach = acetylcholine, 3-mo = 3 months of age, RD = regular diet, WD = western diet, indo = indomethacin. [&]p<0.05 compared to 3-mo; *p<0.05 compared to RD with matching genotype; [#]p<0.05 compared to WT mice with matching diet; [^]p<0.05 compared to Ach in mice with matching genotype and diet. n.a.: not available.

Figure 1

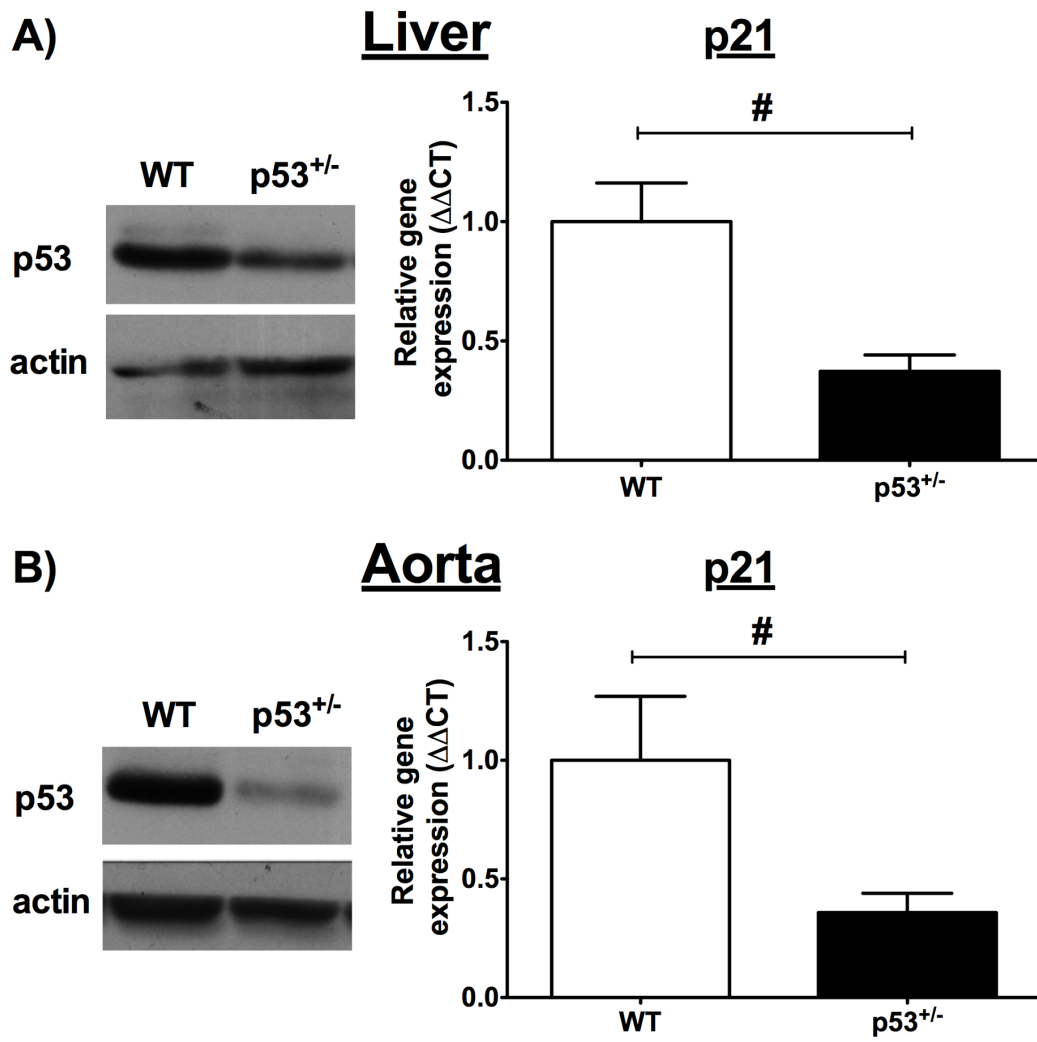


Figure 2

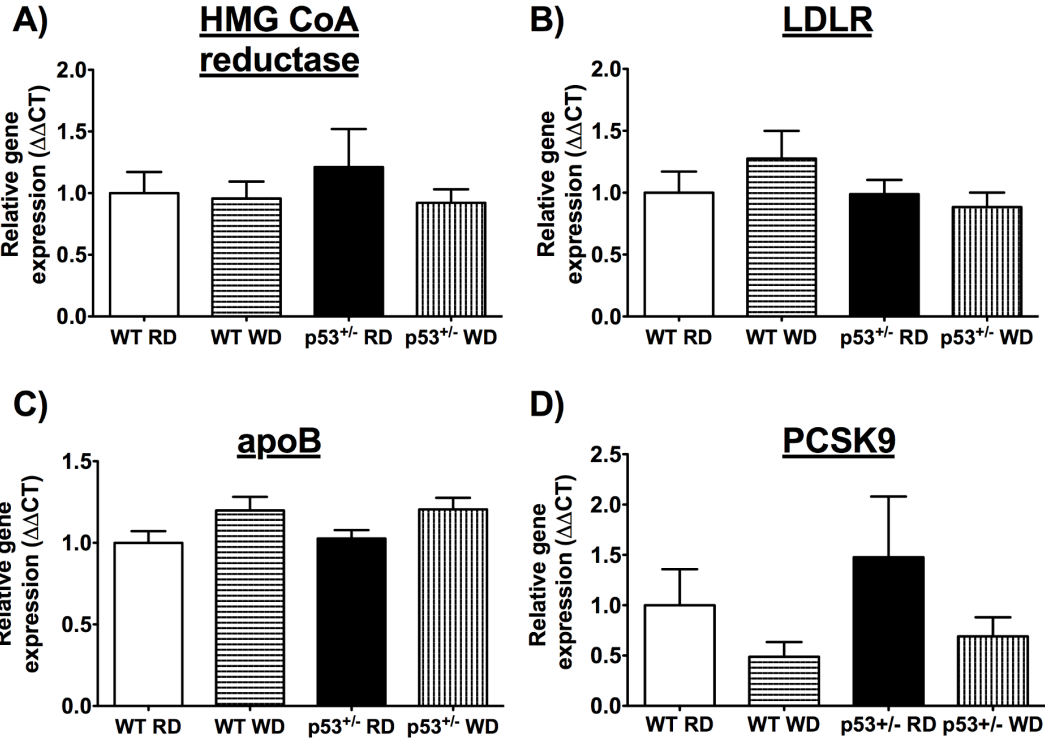


Figure 3

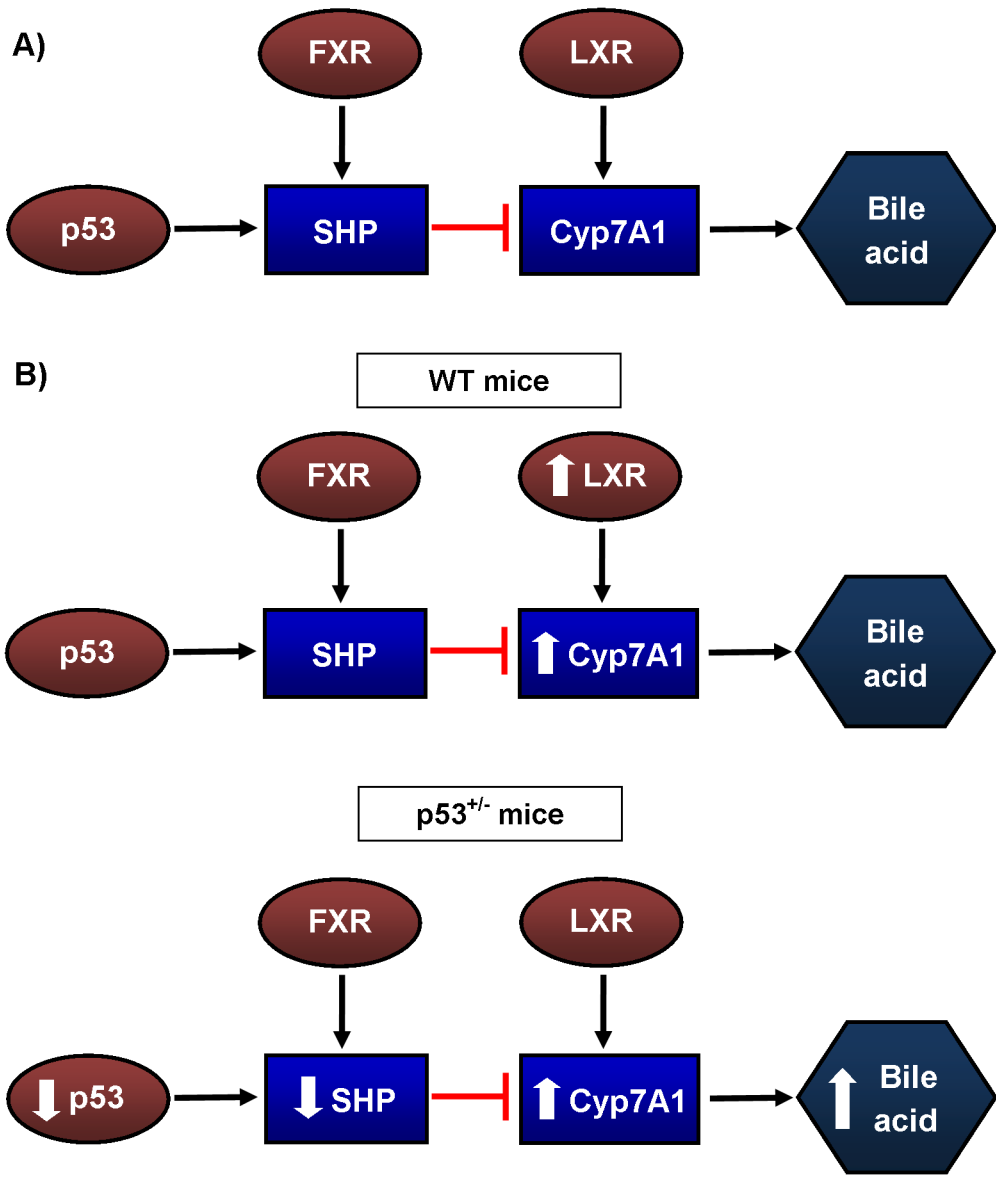


Figure 4

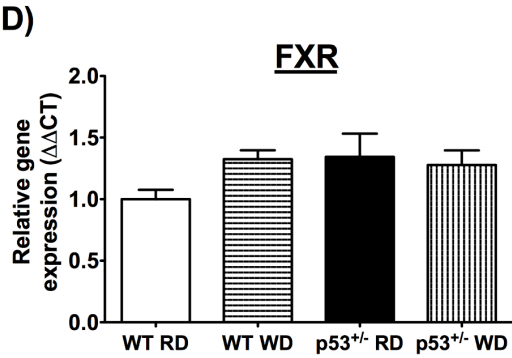
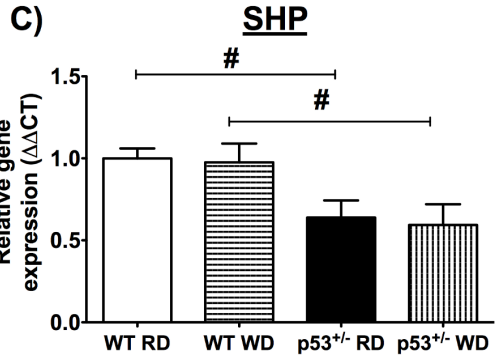
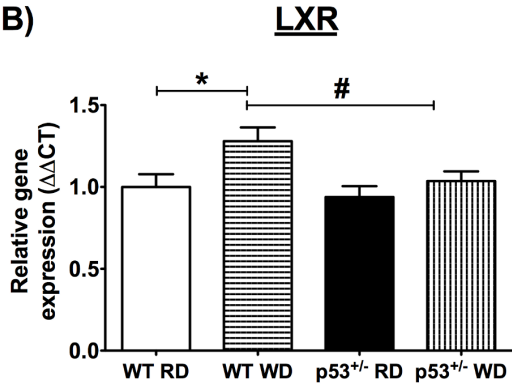
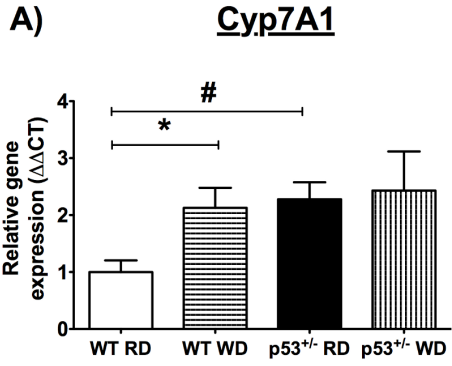


Figure 5

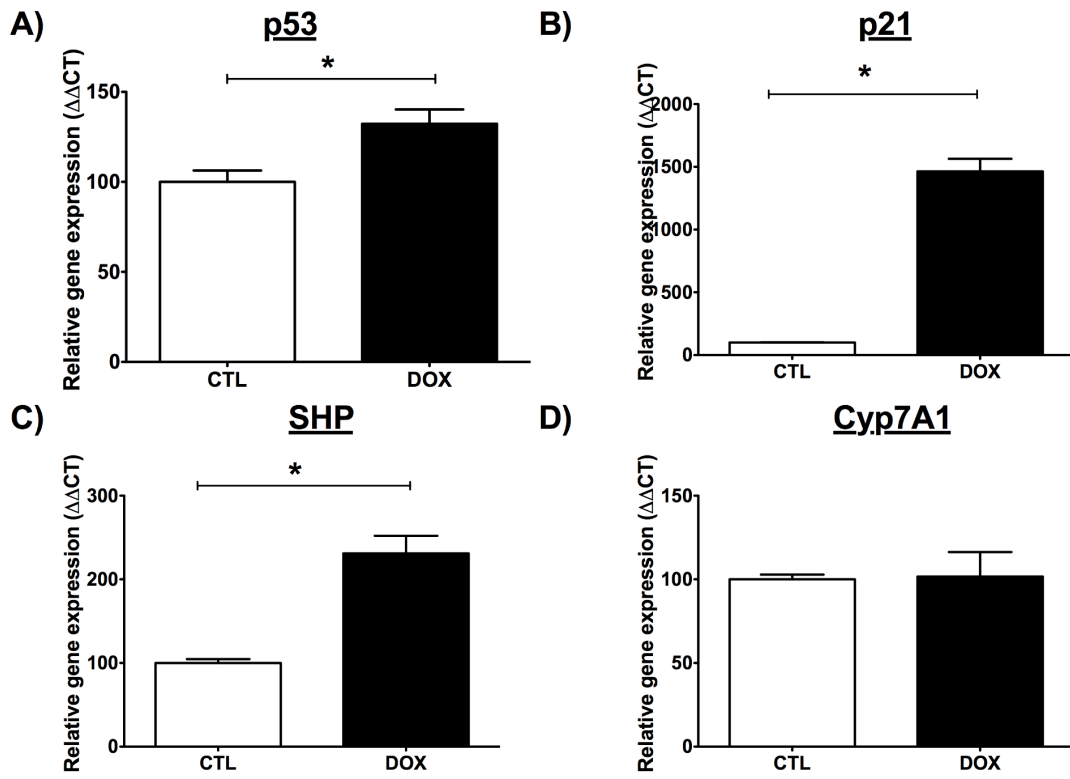


Figure 6

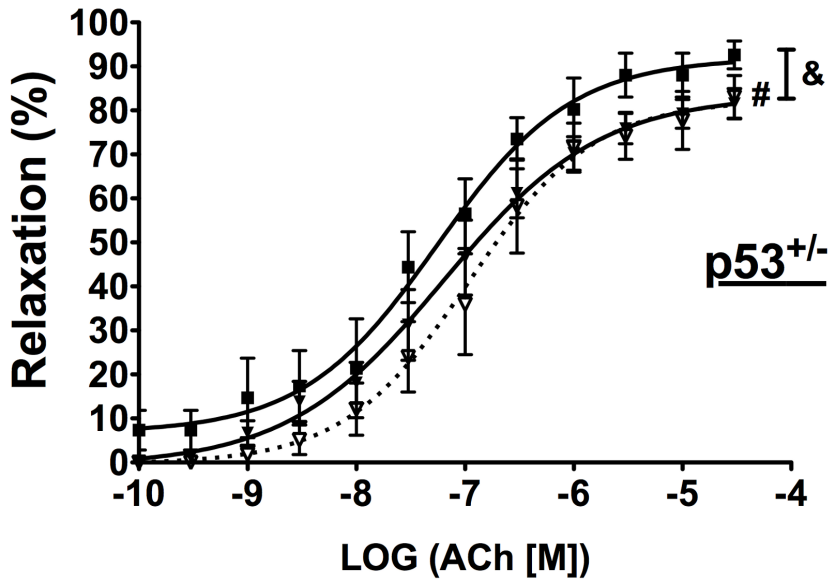
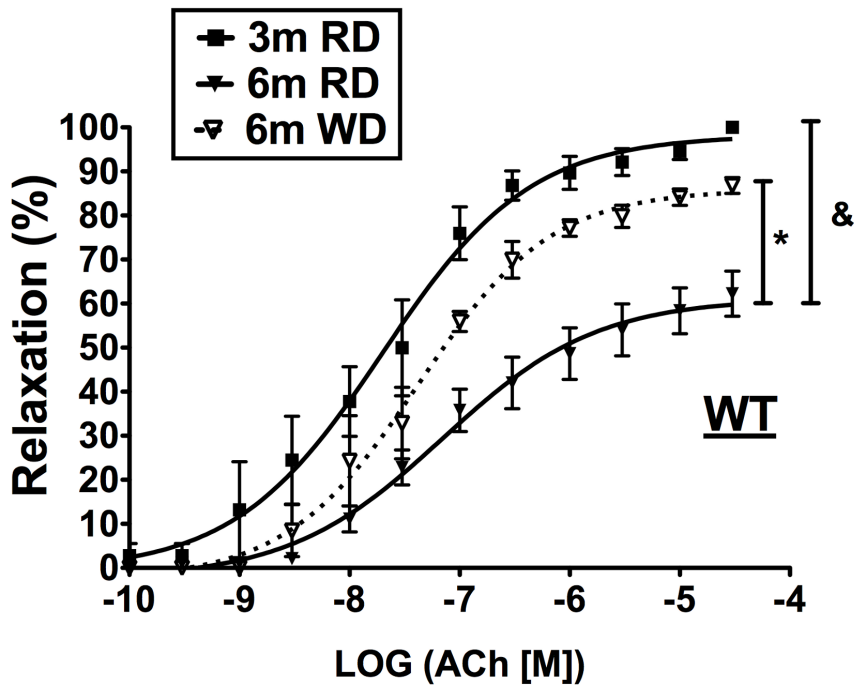


Figure 7

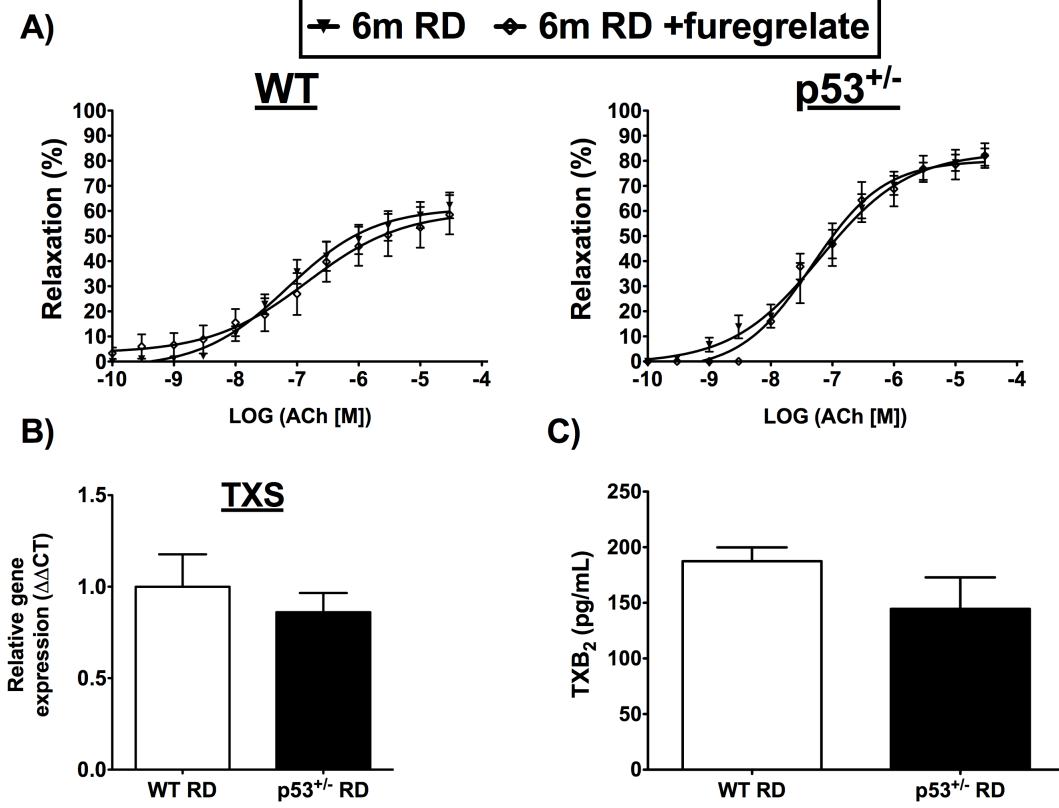


Figure 8

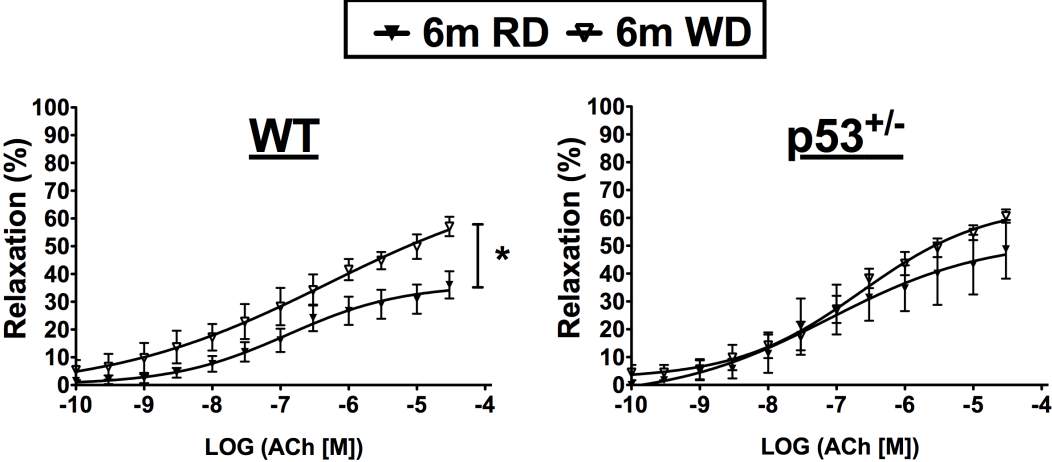
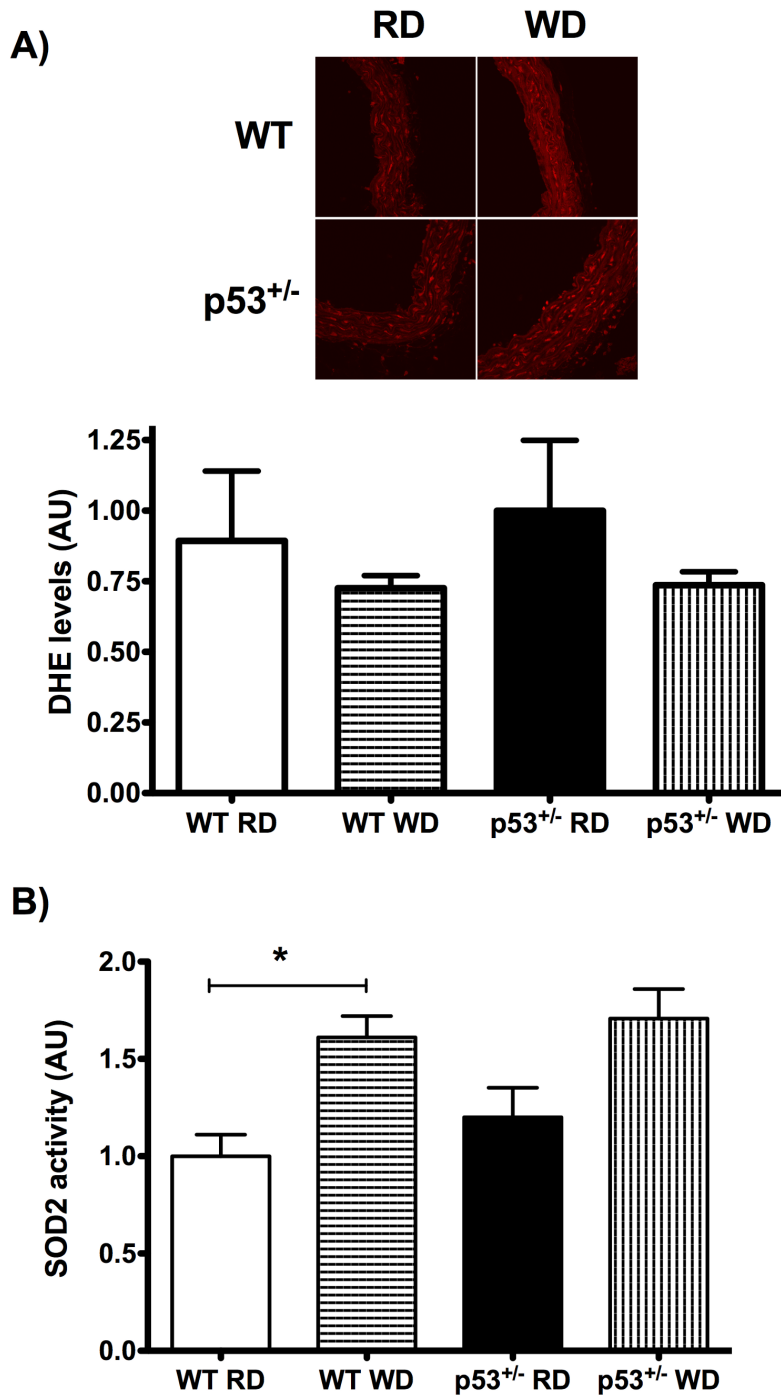


Figure 9



4. Discussion

Dans cette section, je relierai les résultats de mes études avec les connaissances actuelles décrites dans la littérature. Je situerai mes résultats dans un contexte plus global, je discuterai des limitations de mes études et je terminerai en suggérant quelques perspectives découlant de mes résultats.

Mes travaux ont souligné l'influence de l'environnement pendant la phase de maturation (ou le développement) des cellules endothéliales et ont montré que cet environnement peut influencer la réponse face à un stress métabolique engendré par une diète riche en gras (Leblond et al. 2013). Les facteurs de risque cardiovasculaire altèrent la fonction endothéliale car ils sont associés à une hausse du stress oxydant et de l'inflammation (Lakatta et al. 2003; Brandes et al. 2005; Versari et al. 2009a); certaines interventions comme l'exercice physique ont le potentiel de ralentir les dommages endothéliaux associés au vieillissement et aux MCV (Yen et al. 1995; Taddei et al. 2000; Chen et al. 2001; De Moraes et al. 2004; Laufs et al. 2005; Durrant et al. 2009; Bunker et al. 2010; Park et al. 2012; Roque et al. 2012). Nous avons rapporté que la pratique régulière de l'exercice volontaire, contrairement à la catéchine, protège à long terme la fonction endothéliale de souris C57Bl/6 face à une diète riche en gras (Leblond et al. 2013). De même, les souris $p53^{+/-}$ sont protégées de l'hypercholestérolémie induite par une diète riche en gras, ce qui protège la fonction endothéliale (Leblond et al. 2014). Quels sont les mécanismes bénéfiques pour la fonction endothéliale qui peuvent expliquer la supériorité de l'exercice par rapport à la catéchine?

Dans la première étude, nous avons tout d'abord évalué les effets vasculaires de la pratique de l'exercice volontaire et de la consommation de la catéchine lors du développement des cellules endothéliales entre l'âge de 1 et 9 mois (Leblond et al. 2013). Nous avons déterminé si l'empreinte vasculaire laissée par ces interventions était maintenue une fois l'exercice et la catéchine stoppés, en présence ou en absence d'une diète pro-athérosclérotique riche en gras, introduite entre 9 et 12 mois (Leblond et al. 2013). En présence du «*challenge*» métabolique provoqué par la diète riche en gras, les souris ayant préalablement pratiqué l'exercice physique ont maintenu leur fonction

endothéliale, les souris ayant consommé la catéchine ont montré des signes d'inflammation alors que celles ayant été inactives ont présenté une dysfonction endothéliale (Leblond et al. 2013). L'exercice physique pendant la phase de maturation des cellules endothéliales aurait donc permis de prévenir la dysfonction endothéliale et l'inflammation observées chez les souris inactives (Leblond et al. 2013). Malgré les propriétés antioxydantes de l'exercice physique et de la catéchine, pourquoi l'exercice en prévention offre-t-il plus de bénéfices vasculaires que la catéchine? Combien de temps cette protection produite par l'exercice peut-elle durer une fois l'exercice stoppé?

Dans la seconde étude, nous avons observé que la diminution endogène de p53 chez la souris est associée à un métabolisme accru des acides biliaires qui prévient l'hypercholestérolémie induite par une diète riche en gras (Leblond et al. 2014). Ainsi, les cellules endothéliales des souris p53^{+/-} n'ont pas été exposées au stress pro-athérosclérotique engendré par la diète riche en gras (Leblond et al. 2014). Cet effet protecteur hypocholestérolémiant observé chez les souris p53^{+/-} en présence de la diète riche en gras nous renseigne-t-il sur le rôle vasculaire de p53? Ou serait-ce plutôt un effet indirect qui identifie un des rôles émergents moins bien connus de p53, comme celui dans le métabolisme du cholestérol?

4.1 La maturation de l'endothélium est-elle influencée par son environnement?

Le développement des cellules endothéliales pendant la «phase de maturation» pourra influencer la capacité de l'endothélium à maintenir son intégrité tout au long de la vie: une maturation inadéquate des mécanismes de défenses endothéliales endogènes, comme par exemple les enzymes antioxydantes, résulterait en une accumulation plus rapide des dommages oxydants menant à une dysfonction endothéliale accélérée. Peut-on influencer le développement des cellules endothéliales par l'exercice, la consommation de la catéchine ou une expression endogène plus faible de p53?

4.1.1 La maturation de l'endothélium est-elle affectée par l'exercice ou la catéchine?

Nous avons constaté qu'après 8 mois d'exercice physique volontaire, les souris C57Bl/6 actives ont une fonction vasculaire supérieure par rapport aux souris inactives ou ayant consommé de la catéchine (Leblond et al. 2013): la relaxation dépendante de l'endothélium dans l'aorte n'est pas augmentée en présence d'indométacine chez les souris actives (contrairement aux souris inactives et ayant eu accès à la catéchine), suggérant une absence d'un EDCF dérivé des COX (Leblond et al. 2013). De plus, la supériorité de la relaxation induite par le flux dans les artères cérébrales et la meilleure compliance des artères fémorales chez les souris actives supportent les bienfaits de l'exercice initié en bas-âge (Leblond et al. 2013).

Chez l'humain, la capacité de l'exercice à améliorer la santé cardiovasculaire a aussi été démontrée chez de jeunes sujets. Chez près de 21 000 enfants et adolescents (âgés entre 4 et 18 ans), une corrélation entre le temps passé à pratiquer des activités physiques (intensité modérée à vigoureuse) et un profil cardiométabolique sain a été observée (Ekelund et al. 2012). Les jeunes sujets plus actifs montraient une réduction de la circonférence de la taille, de la pression systolique, des triglycérides, de l'insulinémie et une hausse des HDL (Ekelund et al. 2012). De plus, la mesure de la dilatation induite par le flux chez 74 jeunes sujets (âge moyen de 22 ans) était améliorée suite à une séance de course sur tapis-roulant (Hwang et al. 2012). Ces données démontrent que l'exercice physique est bénéfique dès le plus jeune âge en absence de facteurs de risque cardiovasculaire.

Chez les souris ayant consommé la catéchine de 1 à 9 mois, nous avons paradoxalement observé un stress oxydant plasmatique (mesuré par le niveau d'isoprostanes) supérieur par rapport aux souris actives, mais similaire à celui mesuré chez des souris inactives (Leblond et al. 2013). Cependant au niveau vasculaire, aucune différence dans les dommages oxydants mesurés avec la sonde dihydroéthidium n'a été détectée dans les aortes des souris actives, inactives ou ayant consommé la catéchine (Leblond et al. 2013). Aucune différence dans les expressions géniques de p22phox et de SOD2 dans les aortes des souris ayant consommé la catéchine entre 1 et 9 mois par

rapport aux souris inactives n'a toutefois été observée dans notre étude (données non-publiées). De plus, les activités de la SOD2 et de la GPx n'ont pas été affectées par la catéchine et l'exercice

À la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que l'exercice et la catéchine ont provoqué une maturation différente des cellules endothéliales. Les souris actives et ayant consommé de la catéchine montrent une activité de la catalase inférieure dans l'aorte par rapport aux souris inactives, suggérant une présence moindre de H_2O_2 . Les souris ayant été actives entre 1 et 9 mois démontrent une meilleure santé vasculaire que les souris ayant consommé la catéchine (absence d'EDCF dérivé des COX dans l'aorte, meilleure dilatation dans les artères cérébrales et niveau des isoprostanes plasmatiques plus bas). Le concept de l'hormesis serait en faveur d'un effet délétère possible d'une réduction de l'exposition aux RS pendant la phase de maturation (Thorin-Trescases et al. 2010).

4.1.2 L'arrêt de l'exercice ou de la catéchine affecte-t-il la fonction vasculaire à long-terme?

L'innovation majeure de cette étude consistait à arrêter la pratique de l'exercice physique volontaire ainsi que la consommation de la catéchine à l'âge de 9 mois, et de voir l'impact sur la fonction endothéliale et le profil vasculaire à l'âge de 12 mois. Les résultats les plus intéressants sont les impacts positifs sur le profil vasculaire de l'arrêt de la catéchine: l'indométacine n'inhibe plus la composante contractile de la relaxation dans les aortes et la compliance dans les artères fémorales et cérébrales est améliorée (Leblond et al. 2013). Ainsi, il semble que la production de l'EDCF induit par la catéchine à l'âge de 9 mois soit renversé, du moins en partie, par l'arrêt de sa consommation (Leblond et al. 2013). Toutefois chez ces mêmes souris, la hausse de l'activité de la catalase et la diminution de l'activité de la GPx dans les aortes suite à l'arrêt de la catéchine suggère une variation néfaste dans la quantité de H_2O_2 vasculaire présent (Leblond et al. 2013). Lorsque le niveau de H_2O_2 est faible, il est métabolisé par la GPx et la Trx (Wassmann et al. 2004; Neumann et al. 2009). En revanche, lorsque son niveau s'accroît c'est la catalase qui le dégrade (Wassmann et al. 2004; Neumann et al. 2009).

Une activation de l'expression de la catalase pourrait donc signifier que l'organisme ou le tissu fait face à une augmentation non-physiologique de H_2O_2 (Figure 21). Cette hausse de l'activité aortique de la catalase n'a pas été observée suite à l'arrêt de l'exercice (Leblond et al. 2013).

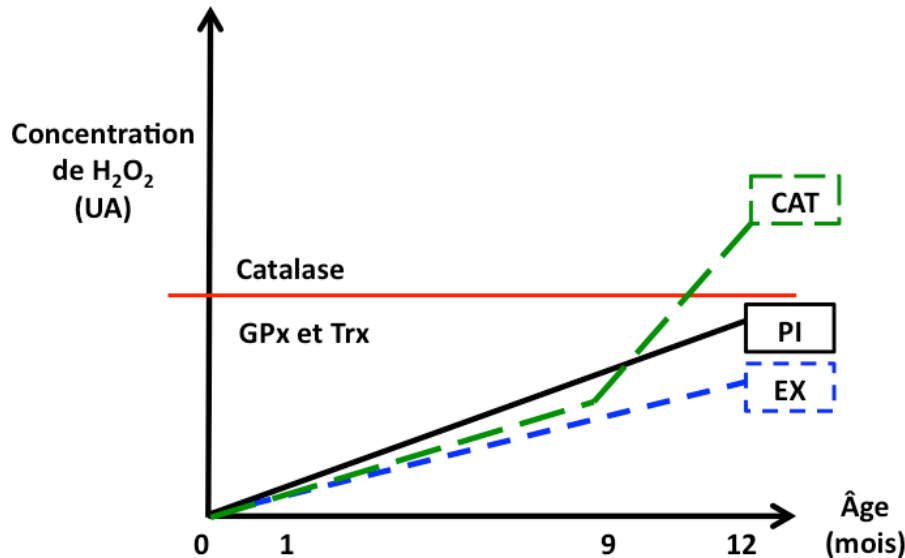


Figure 21 Le changement dans les activités des enzymes métabolisant le H_2O_2 indique une hausse de la quantité de RS vasculaires.

Lorsque la concentration de H_2O_2 intracellulaire est modeste, les enzymes glutathione peroxydase (GPx) et thiorédoxine réductase (Trx) métabolisent le H_2O_2 . Lorsque la concentration de H_2O_2 dépasse une certaine limite (représentée par la ligne rouge), c'est l'enzyme catalase qui s'active pour le métaboliser. Entre 1 et 9 mois, l'activité de la GPx était inférieure chez les souris actives (EX) et consommant la catéchine (CAT) par rapport aux souris inactives (PI). L'arrêt de l'exercice et de la catéchine à 9 mois a provoqué une diminution de l'activité de la GPx et une hausse de l'activité catalase chez les souris CAT, sans modifier les activités enzymatiques des souris EX et PI. Cette variation dans les activités des enzymes métabolisant le H_2O_2 suggère une hausse de la quantité de H_2O_2 présente dans les aortes, qui n'est plus prise en charge par la GPx et la Trx, mais par la catalase. UA: unités arbitraires.

Peu d'études ont visé à étudier l'impact de l'arrêt de l'exercice ou d'un antioxydant sur le métabolisme. Chez le rat, une période de 3 semaines de course volontaire suffit pour éviter le développement de l'obésité, de l'hyperinsulinémie et de l'hyperleptinémie provoquée par la consommation d'une diète riche en gras pendant 10 semaines (Patterson et al. 2008). En revanche, l'arrêt de la course volontaire après 16 semaines

chez le rat provoque un déséquilibre rapide dans le métabolisme des acides gras, ce qui initie le processus de la stéatose hépatique non-alcoolique après quelques jours d'arrêt (Rector et al. 2008). Aucune étude sur une consommation interrompue d'un antioxydant n'a été répertoriée à ma connaissance, laissant peu d'évidences pour mettre en contexte nos résultats (Leblond et al. 2013). Nous avons toutefois observé que l'arrêt de la catéchine a été bénéfique (Leblond et al. 2013).

Ces résultats démontrent que l'arrêt de la catéchine renverse le profil vasculaire observé après 9 mois de consommation de l'antioxydant. L'arrêt de l'exercice a eu peu d'impact, son empreinte étant présente à long terme: la supériorité de la fonction endothéliale cérébrale a été maintenue (Leblond et al. 2013).

4.1.3 La maturation de l'endothélium est-elle affectée par l'expression endogène plus faible de p53?

Dans la seconde étude, l'impact de la réduction endogène de p53 sur la fonction vasculaire a été évalué. Aucune différence n'a été observée dans la relaxation dépendante de l'endothélium aortique entre les souris WT (C57Bl/6) et p53^{+/-} à l'âge de 3 mois (Leblond et al. 2014). Une réduction de la fonction endothéliale aortique a été observée entre 3 et 6 mois chez les souris WT et p53^{+/-}; toutefois la relaxation dépendante de l'endothélium maximale des aortes des souris p53^{+/-} était supérieure à celle observée dans les aortes isolées des souris WT âgées de 6 mois (Leblond et al. 2014). La dysfonction endothéliale associée à l'âge (entre 3 et 6 mois) est donc plus faible chez les souris p53^{+/-}. L'ajout d'indométacine ou de catalase exogène a permis de renverser cette dysfonction endothéliale observée avec l'âge dans les aortes isolées des souris WT, mais pas chez les souris p53^{+/-} (Leblond et al. 2014). Une plus faible quantité d'EDCF dérivés des COX ou de stress oxydant semble donc expliquer la relaxation supérieure des aortes des souris p53^{+/-} (Leblond et al. 2014). Les isoformes COX1 et 2 peuvent produire des prostanoïdes et des RS pro-constricteurs qui altèrent la fonction endothéliale (Feletou et al. 2011). Une hausse de production de TXA₂, par exemple, diminue la fonction endothéliale dans les artères rénales isolées de souris C57Bl/6 âgées de 6 mois (Gendron et al. 2007a). Toutefois, nous n'avons pas observé de différence

dans le métabolisme du TXA₂ entre les souris C57Bl/6 et p53^{+/-}; l'EDCF à l'origine de la différence observée dans notre étude n'est donc pas identifié (Leblond et al. 2014). Un prostanoloïde différent du TXA₂ dérivé des COX pourrait être en cause. En effet, une hausse de la quantité de PGF_{2α} libérée par les aortes de hamsters et par les artères rénales humaines participerait à la dysfonction endothéliale associée avec l'âge (Wong et al. 2009). Des études supplémentaires seraient requises pour identifier le prostanoloïde responsable de la dysfonction que nous avons observée chez les souris WT à 6 mois.

Lorsque p53 est surexprimé pendant 24 heures dans les aortes de rats, la dysfonction endothéliale observée provient de l'augmentation de l'expression de p66shc (Kim et al. 2008) et de la répression transcriptionnelle de KLF2 (Kumar et al. 2011), tous deux sous le contrôle transcriptionnel de p53 (Trinei et al. 2002; Kim et al. 2008; Kumar et al. 2011). Le gène p66shc serait responsable de la production de 30% du H₂O₂ intracellulaire (Migliaccio et al. 1999) et joue un rôle important dans la dysfonction endothéliale associée à une hausse du stress oxydant (Francia et al. 2004; Yamamori et al. 2005; Camici et al. 2007). Le gène KLF2 quant à lui est bénéfique pour la fonction endothéliale en stimulant la production de NO en réponse aux forces de cisaillement (Dekker et al. 2002; SenBanerjee et al. 2004; Parmar et al. 2006). Kumar et al. ont aussi montré que p66shc réprime *in vitro* la transcription de KLF2 dans les cellules endothéliales (Kumar et al. 2009). Dans notre étude, p66shc et KLF2 n'expliqueraient pas la différence de fonction endothéliale observée à 6 mois entre les souris WT et p53^{+/-} puisque l'expression génique de p66shc et de KLF2 dans les aortes des souris C57Bl/6 et p53^{+/-} était similaire (données non-publiées).

4.2 Une diète riche en gras de 3 mois induit un stress métabolique

La phase de maturation des cellules endothéliales des souris C57Bl/6 a été affectée par une exposition précoce à l'exercice, la catéchine (Leblond et al. 2013) ou une faible expression endogène de p53 (Leblond et al. 2014). L'écrivain français Bernard Werber a

écrit: «*Il n'y a que dans l'adversité que l'on découvre la vraie valeur des êtres*». Pour mieux évaluer l'empreinte vasculaire laissée par l'exercice, la catéchine et l'expression réduite de p53 chez les souris, celles-ci ont ensuite été exposées à un stress métabolique provoqué par la consommation d'une diète riche en gras pendant 3 mois. La consommation d'une diète riche en gras, dont 17% de l'énergie fournie provient des protéines, 43% des glucides et 42% des lipides (avec 0,2% de cholestérol), a un effet pro-athérosclérotique (apparition du syndrome métabolique, hausse du stress oxydant, développement de la plaque et activation du processus d'inflammation) chez des souris LDLR^{-/-} (Collins et al. 2009). Cet environnement pro-athérosclérotique et pro-oxydant avait pour objectif d'induire un stress métabolique qui solliciterait les mécanismes de défenses endogènes vasculaires s'étant développés pendant la phase de maturation dans divers environnements (exercice ou inactivité physique, catéchine et réduction endogène de l'expression de p53).

4.2.1 Les effets vasculaires d'une diète riche en gras chez les souris inactives

Chez les souris C57Bl/6 inactives, la consommation de la diète riche en gras entre 9 et 12 mois a mené à l'obésité, l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie et l'hypercholestérolémie (Leblond et al. 2013). Une hausse du stress oxydant systémique mesurée par le niveau des isoprostanes plasmatiques a été observée, mais aucun changement dans le niveau de dommage oxydant aortique ou dans les activités des enzymes antioxydantes dans les aortes n'a été détecté (Leblond et al. 2013). Les relaxations dépendantes et indépendantes de l'endothélium ont été diminuées dans les aortes des souris inactives soumises à la diète riche en gras, toutefois aucun changement dans la fonction endothéliale des artères fémorales et cérébrales n'a été observé (Leblond et al. 2013). Ces impacts de la diète riche en gras sur le profil plasmatique et sur la dysfonction endothéliale observée dans l'aorte étaient attendus. Une diète riche en gras de 3 mois a induit l'obésité (West et al. 1992; Park et al. 2012), a triplé le niveau de cholestérol en circulation (Napoli et al. 2003), a induit un stress oxydant plasmatique (Napoli et al. 2003), a induit l'hyperglycémie (Keung et al. 2013) et l'hyperinsulinémie (Keung et al. 2013) chez la souris. La relation entre l'hypercholestérolémie (Krummen et al. 2006;

Gendron et al. 2007b; Gendron et al. 2010; Bolduc et al. 2011; Drouin et al. 2011a; Drouin et al. 2011b; Bolduc et al. 2012) ou le diabète (Wang et al. 1993; Taylor et al. 1994; Matsumoto et al. 2007a; Matsumoto et al. 2007b; Gao et al. 2008; Riad et al. 2008; Matsumoto et al. 2009c; Cheang et al. 2011; Youn et al. 2012; Sukumar et al. 2013) avec la dysfonction endothéliale a été démontrée à maintes reprises chez les rongeurs. De même, l'hypercholestérolémie (Creager et al. 1990; Leung et al. 1993; Egashira et al. 1994; Anderson et al. 1995; Stroes et al. 1995; Treasure et al. 1995; Grigore et al. 2013) et le diabète (Stehouwer et al. 1992; Hogikyan et al. 1998; Vehkavaara et al. 1999) ont des effets délétères sur la fonction endothéliale chez l'humain. Il semble donc qu'une diète riche en gras de 3 mois stimule efficacement les cellules endothéliales et met en valeur les effets préventifs de l'exercice et de la catéchine.

4.2.2 L'exercice physique ou la catéchine préviennent-ils les effets délétères vasculaires de la diète riche en gras?

Les souris qui ont couru et qui ont consommé de la catéchine de 1 à 9 mois maintiennent leur fonction endothéliale aortique en présence de la diète riche en gras de 3 mois, malgré l'arrêt de l'exercice et de la catéchine (Leblond et al. 2013). La voie des EDHF a contribué significativement au maintien de la relaxation maximale des aortes en réponse à l'acétylcholine chez les souris actives et ayant consommé la catéchine (Leblond et al. 2013). Les 3 voies des EDRF (NO, PGI₂, EDHF) peuvent compenser l'une pour l'autre lorsque l'une d'entre elles devient déficiente. Par exemple, la production d'un dérivé des COX, probablement la PGI₂, permet la relaxation dans les artères mésentériques des souris eNOS^{-/-} (Chataigneau et al. 1999) ou en présence d'une eNOS dysfonctionnelle dans les artères rénales de souris dyslipidémiques (Gendron et al. 2007b). L'EDHF pourrait agir comme mécanisme de compensation pour favoriser la relaxation dépendante de l'endothélium lorsque la biodisponibilité du NO est déficiente (Bauersachs et al. 1996; McCulloch et al. 1997). Il semble que les conditions vasculaires délétères induites par la diète riche en gras ont stimulé les aortes à produire une plus grande quantité d'EDHF, révélée lors de l'inhibition des voies du NO et de la PGI₂ (Leblond et al. 2013).

Dans les artères fémorales, la diète riche en gras n'a pas changé la réponse à l'acétylcholine entre les groupes (Leblond et al. 2013). Les souris actives et ayant consommées la catéchine montrent toutefois des meilleures propriétés élastiques que les souris inactives, comme démontré par la mesure de la compliance dans les artères fémorales (Leblond et al. 2013). Au niveau des artères cérébrales, les souris actives ont maintenu une relaxation dépendante de l'endothélium supérieure à celle mesurée chez des souris ayant consommé la catéchine et une meilleure compliance que celle des souris inactives (Leblond et al. 2013).

L'exercice et la catéchine ont prévenu certains des effets délétères induits par la diète riche en gras observés chez les souris inactives, et ce malgré la présence de l'obésité, l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie et l'hypercholestérolémie. La fonction endothéliale aortique et la compliance des artères fémorales ont été supérieurs chez les souris actives et ayant consommé la catéchine par rapport aux souris inactives. Il est intéressant de noter que le niveau des isoprostanes circulants était similaire entre les trois groupes suite à la diète riche en gras.

4.2.3 Pourquoi les antioxydants n'offrent-ils pas les mêmes bénéfices que l'exercice?

En présence d'une diète riche en gras, nous avons observé une activité de la SOD2 plus faible dans les aortes des souris actives par rapport aux souris inactives et ayant consommé de la catéchine, suggérant une quantité plus faible d'anions superoxydes aortiques chez les souris actives (Leblond et al. 2013). Une hausse de la quantité des anions superoxydes participe à la dysfonction endothéliale (Mollnau et al. 2002) et l'utilisation de l'apocynine, un inhibiteur de la Nox, renverse la dysfonction endothéliale observée avec l'âge dans les carotides des souris (Rippe et al. 2010), dans les artères cérébrales des souris dyslipidémiques (Drouin et al. 2011b) et dans les artères basilaires des rats diabétiques (Matsumoto et al. 2007b). De plus, l'utilisation d'un analogue de la SOD (tempol) permet d'améliorer la fonction endothéliale dans les artères carotides isolées de souris âgées (Durrant et al. 2009). L'activité de la SOD2 dans les artères

cérébrales (où les souris actives ont une fonction endothéliale supérieure) n'a toutefois pas été évaluée.

L'inflammation observée suite à la diète riche en gras chez les souris ayant consommé la catéchine par rapport aux souris actives est une autre raison pouvant expliquer la supériorité de l'exercice sur la catéchine (Leblond et al. 2013). En effet, nous avons observé une hausse dans les expressions géniques de COX2 et de l'angiopoïétine-like 2 (Angptl-2) dans l'aorte après la diète riche en gras seulement chez les souris ayant consommé la catéchine (Leblond et al. 2013). L'expression de COX2 qui est associée à l'inflammation peut être stimulée par les RS, particulièrement les anions superoxydes *in vitro* (Feng et al. 1995). De plus, le niveau d'expression génique de COX2 corrèle avec le niveau des dommages vasculaires dans les cellules endothéliales isolées de patients coronariens (Voghel et al. 2007). La hausse d'expression de COX2 est donc délétère. D'autre part, l'Angptl-2 est une nouvelle protéine proinflammatoire (Tabata et al. 2009; Okada et al. 2010; Tazume et al. 2012) et est associée au stress oxydant (Farhat et al. 2008) et à l'athérosclérose (Farhat et al. 2013). L'injection d'Angptl-2 chez la souris dyslipidémique accélère la progression de la plaque et stimule l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et TNF- α (Farhat et al. 2013). En revanche, la souris Angptl-2^{-/-} présente des niveaux circulants inférieurs d'IL-6 et de TNF- α par rapport aux souris Angptl-2^{+/+} (Tabata et al. 2009). La translocation au noyau de NF- κ B induite par l'Angptl-2 *in vitro* pourrait expliquer le caractère proinflammatoire de l'Angptl-2 (Tabata et al. 2009). L'expression protéique aortique et les niveaux circulants d'Angptl-2 sont aussi augmentés chez la souris avec l'âge et la présence de la dyslipidémie (Tabata et al. 2009; Farhat et al. 2013). Une hausse de NF- κ B et de certains de ses gènes cibles pro-inflammatoires (TNF- α , iNOS, Angptl-2) est associée à la dysfonction endothéliale (Arenas et al. 2006; Csiszar et al. 2007a; Donato et al. 2007; Donato et al. 2008; Rodriguez-Manas et al. 2009; Ungvari et al. 2011a; Ungvari et al. 2011b; El Assar et al. 2012; Yu et al. 2013). Ces indices d'inflammation observés chez les souris ayant consommé la catéchine suite à la diète riche en gras suggèrent le développement de la dysfonction endothéliale à long terme.

La différence vasculaire observée suite à la diète riche en gras entre les souris qui étaient actives et celles ayant consommé la catéchine ne peut s'expliquer par un effet

métabolique différent. La pratique de l'activité physique volontaire ou la consommation de la catéchine pendant les mois 1 à 9 n'a pas prévenu l'obésité, l'hyperglycémie, l'hypercholestérolémie ni l'hyperinsulinémie observée chez les souris contrôles après la diète riche en gras pendant les mois 9 à 12 (Leblond et al. 2013). Des études du laboratoire ont préalablement démontré que la pratique de l'exercice physique volontaire (Bolduc et al. 2011) et la consommation de catéchine (Bolduc et al. 2012) pendant 3 mois chez des souris dyslipidémiques âgées de 3 mois prévient la dysfonction endothéliale dans les artères cérébrales sans modifier le poids des souris, la glycémie et la cholestérolémie. Il n'est donc pas surprenant que la diète riche en gras pendant 3 mois chez les souris actives ou ayant consommées de la catéchine ait provoqué un profil métabolique similaire aux souris inactives (Leblond et al. 2013).

Bien que l'exercice et la catéchine soient reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, nos résultats démontrent que l'exercice est plus efficace que la catéchine pour améliorer la maturation des cellules endothéliales. Celles-ci présentent une meilleure fonction dilatatrice dans les artères cérébrales, une quantité d'anions superoxydes potentiellement plus basse et aucun indice d'inflammation suite à la consommation pendant 3 mois d'une diète pro-athérosclérotique. L'environnement vasculaire promu par l'exercice semble avoir stimulé une meilleure capacité d'adaptation des cellules endothéliales à faire face à un stress métabolique délétère.

4.2.4 Les effets vasculaires d'une diète riche en gras chez les souris p53^{+/-}

Dans le cadre de notre seconde étude, nous avons soumis les souris WT et p53^{+/-} à une diète riche en gras entre 3 à 6 mois (Leblond et al. 2014). Notre période d'étude s'est arrêtée à 6 mois étant donné le développement rapide des cancers chez les souris p53^{+/-} à partir de l'âge de 9 mois (Donehower et al. 1992; Harvey et al. 1993; Jacks et al. 1994; Purdie et al. 1994; Venkatachalam et al. 2001). Étonnamment, la diète riche en gras chez les souris WT a provoqué une amélioration de la réponse à l'acétylcholine dans les aortes (Leblond et al. 2014). Comment une diète délétère peut-elle favoriser la relaxation dépendante de l'endothélium dans les aortes isolées des souris WT alors que le profil

pro-athérosclérotique d'une diète riche en gras est plutôt associé à la dysfonction endothéliale (Napoli et al. 2003; Leblond et al. 2013)? Nous observons toutefois chez les souris WT âgées de 6 mois ayant consommé la diète riche en gras une composante EDHF plus développée qui permet une meilleure fonction endothéliale (Leblond et al. 2014). Plusieurs exemples démontrent que l'endothélium utilise des mécanismes compensatoires pour maintenir un fonctionnement vasculaire adéquat. La perte d'un EDRF semble pouvoir être compensée avant que la dysfonction endothéliale ne survienne. Avant d'observer une diminution dans la quantité de NO disponible suite à la dysfonction de la eNOS, l'expression de la nNOS augmente dans les artères cérébrales ce qui permet d'augmenter la production de NO afin de maintenir la fonction endothéliale (Meng et al. 1996). Une hausse de la nNOS dans l'aorte peut aussi favoriser la relaxation en conditions pro-athérosclérotiques (Benkhoff et al. 2012). En effet, la consommation d'une diète riche en gras pendant 8 mois chez des souris a provoqué l'obésité, mais a parallèlement augmenté la réponse à l'acétylcholine des aortes isolées comparativement aux souris nourries avec une diète régulière (Benkhoff et al. 2012). La hausse de leptine occasionnée par la diète riche en gras a permis l'activation de l'expression génique de la nNOS, ce qui a favorisé la relaxation des aortes des souris (Benkhoff et al. 2012). L'EDHF, comme décrit précédemment (section 4.2.2), pourrait également agir comme mécanisme de compensation afin de favoriser la relaxation dépendante de l'endothélium lorsque la biodisponibilité du NO est déficiente (Bauersachs et al. 1996; McCulloch et al. 1997; Leblond et al. 2013). Ainsi, les artères fémorales de jeunes souris dyslipidémiques âgées de 3 mois présentent une relaxation supérieure à celles isolées de souris C57Bl/6 grâce à des EDHF plus efficaces (Krummen et al. 2005). L'activation des mécanismes de relaxation alternatifs comme les EDHF chez les souris dyslipidémiques et l'expression de la nNOS en conditions délétères (dyslipidémie et obésité) souligne néanmoins l'existence de mécanismes mis en place pour surmonter un stress, du moins temporairement.

La diète riche en gras pendant 3 mois a aussi augmenté le poids corporel des souris WT, leur glycémie et leur cholestérolémie (Leblond et al. 2014). Nous avons aussi constaté une hausse de la concentration plasmatique de la chimiokine dérivée des kératinocytes (KC, *keratinocyte-derived chemokine*) chez les souris WT suite à la diète riche en gras (Leblond et al. 2014). La KC est l'orthologue murin de l'IL-8 humaine. L'IL-8 participe dans les étapes précoces du développement de l'athérosclérose qui sont associées à la

hausse de l'inflammation (Gerszten et al. 1999; Huo et al. 2001; Apostolakis et al. 2009). L'IL-8 plasmatique serait un facteur prédicteur d'évènements cardiovasculaires (Inoue et al. 2008) et de la mortalité (cardiovasculaire ou toute-cause) (Panichi et al. 2006) chez des patients coronariens stables et en défaillance rénale, respectivement. À l'inverse, les interventions bénéfiques sur la santé cardiovasculaires comme l'activité physique régulière (Troseid et al. 2004) et les statines (Rezaie-Majd et al. 2002) peuvent améliorer le profil circulant de l'IL-8. La présence plasmatique de l'IL-8 dans le sang suggère donc que le processus inflammatoire est amorcé et qu'un environnement pro-athérosclérotique s'installe (Apostolakis et al. 2009). Il est intéressant de noter qu'aucune différence dans les expressions géniques aortiques de COX2 et de l'Angptl-2 n'a été observée suite à la diète riche en gras chez les souris WT (données non-publiées). La hausse significative de l'activité de la SOD2 aortique chez les souris WT suggère une augmentation de la quantité des anions superoxydes présents au niveau vasculaire suite à la diète riche en gras (Leblond et al. 2014). Cette activation de la SOD2 permet probablement d'éviter une hausse de dommages oxydants (mesurés avec la sonde dihydroéthidium) dans les aortes suite à la diète riche en gras chez les souris WT (Leblond et al. 2014). Cette hausse d'activité de la SOD2 pourrait même favoriser la relaxation dépendante de l'endothélium observée chez les souris WT suite à la diète riche en gras (Durrant et al. 2009; Rippe et al. 2010).

Il est intéressant de noter qu'une diète riche en gras pendant 3 mois avait induit des effets différents selon l'âge où elle était initiée chez des souris LDLR^{-/-} (Collins et al. 2009). Les jeunes souris avaient une meilleure capacité à se défendre face au stress oxydant vasculaire provoqué par cette diète en activant les expressions géniques des enzymes antioxydantes (SOD2, GPx-1, catalase) alors que les souris âgées avaient plus de dommages oxydants étant donné leur incapacité à établir une défense antioxydante endogène adéquate (Collins et al. 2009). Dans nos études, suite à la diète riche en gras de 3 mois, nous avons tout d'abord observé chez les souris âgées de 6 mois l'activation de mécanismes compensatoires vasculaires (EDHF, SOD2) pour éviter la dysfonction endothéliale (Leblond et al. 2014), tandis que chez les souris âgées de 9 mois, la fonction endothéliale est fortement déclinée par la diète riche en gras (Leblond et al. 2013).

Chez les souris p53^{+/-}, aucun effet néfaste sur la fonction endothéliale n'a été observé suite à la diète riche en gras (Leblond et al. 2014). De plus, les souris p53^{+/-} n'ont pas développé d'hypercholestérolémie ni d'inflammation, protégeant les cellules endothéliales (Leblond et al. 2014). La diète riche en gras chez les souris p53^{+/-} a tout de même provoqué l'obésité et l'hyperglycémie comme observé chez les souris contrôles (Leblond et al. 2014). Suite à la diète riche en gras, l'efficacité de la voie des EDHF et le niveau d'activité aortique de la SOD2 chez les souris p53^{+/-} étaient similaires à ceux observés chez les souris contrôles en présence de la diète riche en gras (Leblond et al. 2014). L'activation de ces mécanismes compensatoires (EDHF et SOD2) suggère que l'endothélium subit un stress. Toutefois, le rôle insoupçonné de p53 dans la régulation du métabolisme du cholestérol et des acides biliaires a protégé les souris p53^{+/-} soumises à une diète riche en gras en empêchant l'hypercholestérolémie.

4.2.5 Le rôle inattendu de p53 dans le métabolisme du cholestérol et des acides biliaires

Chez les souris p53^{+/-}, les niveaux de cholestérol total et de HDL circulants n'ont pas augmenté en présence de la diète riche en gras (Leblond et al. 2014). Alors que la diète riche en gras a doublé le niveau de LDL chez les souris contrôles, le taux de LDL des souris p53^{+/-} est resté inchangé (Leblond et al. 2014). L'importance clinique d'une faible concentration plasmatique des LDL est bien établie (Wilson et al. 1980; Goldstein et al. 2001; MRC/BHF 2002; Law et al. 2003; Baigent et al. 2010). Par exemple, une méta-analyse de 26 études randomisées a montré qu'une réduction de 1 mmol/L du LDL avec une statine réduit le risque relatif d'évènements cardiovasculaires majeurs de 22% (Baigent et al. 2010).

Le métabolisme du cholestérol est finement régulé à partir de l'absorption intestinale par des transporteurs, jusqu'au transport vers le foie, et finalement pour son excrétion via les acides biliaires. L'excrétion du cholestérol passe par la conversion en acides biliaires, ou par l'élimination du cholestérol libre dans la bile. Les acides biliaires favorisent l'absorption intestinale des lipides alimentaires, de cholestérol et des vitamines liposolubles. Grâce à la circulation entérohépatique, 95% des acides biliaires produits par

le foie seront recaptés par l'intestin (Lu et al. 2010). L'enzyme 7 α -hydroxylase (Cyp7A1) constitue l'enzyme principale dans la synthèse des acides biliaires. La Cyp7A1 catalyse la première et l'étape limitante dans la conversion du cholestérol en acides biliaires (Chiang 2009). Une mutation altérant la fonction de la Cyp7A1 diminue la sécrétion des acides biliaires et augmente la concentration plasmatique et hépatique de cholestérol (Pullinger et al. 2002). Cette mutation provoque un phénotype similaire à celui observé chez des patients hypercholestérolémiques (Pullinger et al. 2002). Le récepteur nucléaire farnésoid X (FXR, *farnesoid X receptor*) est le principal facteur de transcription dans le métabolisme des acides biliaires (Chiang 2009). Cependant, la régulation de l'expression de la Cyp7A1 passe par les récepteurs nucléaires hépatique X (LXR, *liver X receptor*) et le partenaire de petits hétérodimères (SHP, *small heterodimer partner*). Le LXR (Janowski et al. 1996) stimule l'expression de la Cyp7A1 alors que le SHP bloque la synthèse des acides biliaires via l'inhibition de la Cyp7A1 (Goodwin et al. 2000). Le FXR peut toutefois indirectement réguler l'expression de la Cyp7A1 en stimulant l'expression de SHP en présence d'acides biliaires, ce qui permet de réduire la synthèse des acides biliaires (Goodwin et al. 2000). Cette fine régulation est nécessaire puisqu'une concentration de bile trop élevée peut provoquer des dommages hépatiques (Perez et al. 2009a). Un excès de bile pourrait participer dans la progression de certains cancers chez l'humain, principalement ceux du tractus gastro-intestinal (Costarelli 2009). Les acides biliaires peuvent provoquer des dommages à l'ADN par la production de RS, ce qui favoriserait la carcinogenèse (Costarelli 2009).

Pourquoi le cholestérol des souris p53^{+/-} n'augmente-t-il pas suite à une diète riche en gras? L'évaluation de l'expression génique de gènes hépatiques clés dans la synthèse du cholestérol (HMG CoA réductase) et le captage du LDL (récepteur du LDL, la proprotéine convertase subtilisin/kexine de type 9 et l'apoB) n'a révélé aucune différence entre les souris contrôles et p53^{+/-} suite à la diète riche en gras (Leblond et al. 2014). Nous avons toutefois observé une hausse de la quantité circulante des acides biliaires chez les souris p53^{+/-}, et ce indépendamment du type de diète consommée par les souris (Leblond et al. 2014). Nous avons donc évalué les expressions géniques hépatiques de gènes clés dans ce sentier métabolique. L'expression génique de Cyp7A1 est augmentée chez les souris WT avec la diète riche en gras et chez les souris p53^{+/-} soumises aux 2 diètes (Leblond et al. 2014). Nous avons observé une hausse de LXR

chez les souris contrôles nourries avec la diète riche en gras alors que les souris p53^{+/-} avaient une expression réduite de SHP (Leblond et al. 2014). L'expression réduite de SHP chez les souris p53^{+/-} était indépendante du récepteur nucléaire FXR (Leblond et al. 2014). Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que p53 régule le métabolisme des acides biliaires en contrôlant l'expression de SHP (Kim et al. 2011a; Kim et al. 2011b). L'activation de p53 par la doxorubicine stimule l'expression de SHP dans les souris WT mais non dans les souris p53^{-/-} (Kim et al. 2011b). L'interaction de p53 avec l'histone H3-lysine-4 méthyltransférase du lignage mixte de la leucémie 3 (MLL3, *histone H3-lysine-4 methyltransferase mixed-lineage leukemia 3*) lui permet de lier le promoteur de SHP pour favoriser son expression génique, ce qui favorise l'inhibition de Cyp7A1 (Kim et al. 2011a). L'activation de p53 *in vivo* par la doxorubicine diminue l'expression génique de Cyp7A1, et réduit le contenu en acides biliaires plasmatiques, hépatiques et la taille de la vésicule biliaire (Kim et al. 2011a; Kim et al. 2011b). Ces diminutions sont inexistantes en présence de la doxorubicine chez les souris p53^{-/-} (Kim et al. 2011a; Kim et al. 2011b), SHP^{-/-} (Kim et al. 2011b) ou MLL3^{-/-} (Kim et al. 2011a). Ces données sont en accord avec les résultats observés chez les souris p53^{+/-} où la hausse des acides biliaires circulants corrèle avec la hausse de l'expression de Cyp7A1 et la diminution de l'expression de SHP (Leblond et al. 2014). Bien que le cycle entérohépatique et le métabolisme des acides biliaires ne soient pas «*en vogue*» pour traiter l'hypercholestérolémie en 2013, leur rôle dans la régulation de la cholestérolémie n'est pas moins significatif: les résines, qui sont des médicaments qui inhibent la réabsorption des acides biliaires au niveau intestinal réduisent significativement la cholestérolémie de 15% à 20% (Insull 2006; Davidson et al. 2010).

L'implication de p53 au niveau du métabolisme des lipides ne s'arrête pas exclusivement aux acides biliaires. Certaines mutations dans p53 altèrent les mécanismes de régulation des gènes cholestérogéniques (Freed-Pastor et al. 2012). Une forme mutée de p53 vient lier l'élément de réponse aux stéroïdes qui permet la liaison avec la protéine de liaison à l'élément de réponse aux stéroïdes (SREBP, *sterol-response element binding protein*) (Freed-Pastor et al. 2012), un facteur de transcription qui agit comme un senseur intracellulaire des niveaux de cholestérol (Horton et al. 2002). La liaison du p53 muté à cet élément de réponse expliquerait pourquoi les expressions de 7 enzymes dans la

synthèse du cholestérol, dont la HMG CoA réductase, sont réduites dans les lignées de cancer du sein MDA-231 et MDA-468 (Freed-Pastor et al. 2012).

Les patients atteints du syndrome myélodysplasique, une maladie de la moelle osseuse, ont une expression élevée de p53 et possèdent de faibles concentrations de cholestérol total et de LDL (Ellis et al. 2012). L'étude des cellules sanguines des patients possédant ce syndrome a montré qu'elles avaient des expressions géniques de la HMG CoA réductase et du récepteur du LDL supérieures par rapport à celles des patients sains (Ellis et al. 2012). L'activation de p53 par l'adriamycine chez les souris C57Bl/6 a activé l'expression génique hépatique de la HMG CoA réductase tout en diminuant la cholestérolémie, et ce selon la dose d'adriamycine (Ellis et al. 2012). Notons que nous n'avons pas observé de modification dans les expressions géniques hépatiques de la HMG CoA réductase et du récepteur du LDL chez les souris p53^{+/-} suite à la consommation de la diète riche en gras (Leblond et al. 2014).

Le rôle de p53 dans le métabolisme des acides biliaires et donc de l'excrétion du cholestérol protège les souris p53^{+/-} face au stress induit par la diète riche en gras. En contrôlant la synthèse des acides biliaires via SHP, p53 protège les cellules hépatiques des dommages et de la carcinogenèse que peuvent induire un excès d'acides biliaires (Costarelli 2009; Perez et al. 2009a). La protection face à l'hypercholestérolémie des souris p53^{+/-} pourrait donc se faire au prix d'un risque plus élevé de cancers.

En plus de son rôle de gardien du génome en régulant le cycle cellulaire, p53 contribue à plusieurs autres voies métaboliques dont celle du cholestérol. Nous voulions tester la capacité des souris p53^{+/-} à faire face à un stress métabolique qui devait affecter la fonction endothéliale. Cependant, la capacité de p53 à réguler le métabolisme des acides biliaires leur aura permis d'éviter les stimuli pro-athérosclérotiques et souligne la polyvalence de p53. Ce phénomène semble avoir détourné l'objectif initial de vérifier le rôle protecteur de p53 au niveau vasculaire, mais nous a permis de confirmer, d'une manière différente, le paradigme de notre première étude selon lequel l'environnement vasculaire influence directement la fonction vasculaire.

4.3 Limitations des études

Dans la 1^{re} étude, nous avons choisi de tester les effets préventifs de l'exercice volontaire ou de la catéchine comparé à un groupe de souris contrôles (inactives sans catéchine). Étant donné l'ampleur du projet, nous ne pouvions pas tester un deuxième antioxydant. Bien que le resvératrol soit un antioxydant dont les vertus semblent bien connues (Howitz et al. 2003; Wood et al. 2004; Kaeberlein et al. 2005; Baur et al. 2006; Valenzano et al. 2006; Milne et al. 2007; Pearson et al. 2008; Ungvari et al. 2010a), nous avons choisi un autre polyphénol avec lequel nous possédions une bonne expérience, soit la catéchine (Gendron et al. 2007a; Gendron et al. 2010; Lebel et al. 2010; Drouin et al. 2011a; Drouin et al. 2011b; Bolduc et al. 2012; Gendron et al. 2012). L'utilisation de la restriction calorique aurait aussi été intéressante. Il a déjà été démontré que la restriction calorique induit une hausse de la capacité totale antioxydante supérieure à celle induite par l'exercice volontaire chez des rats (Filaire et al. 2009).

Dans cette première étude, nous avons identifié des mécanismes potentiellement responsables de la supériorité de l'exercice par rapport à la catéchine (quantité des anions superoxydes inférieurs, aucun indice d'inflammation) sans toutefois avoir de preuves mécanistiques (Leblond et al. 2013). L'utilisation d'un anti-inflammatoire en présence de la catéchine aurait pu démontrer plus directement le rôle bénéfique de l'inflammation réduite que nous avons observée chez les souris actives (Leblond et al. 2013).

Une autre limitation est que nous n'avons pas identifié l'EDCF dérivé des COX responsable de la diminution de la relaxation observée dans les aortes isolées des souris âgées de 9 et 12 mois (Leblond et al. 2013) et âgées de 6 mois (Leblond et al. 2014). Notre premier candidat, le TXA₂, qui avait montré son implication dans le développement de la dysfonction endothéliale dans les artères rénales (Gendron et al. 2007a) et cérébrales (Drouin et al. 2011b) ne semble pas être en cause dans les aortes isolées des souris âgées de 6 mois puisque le furegrelate (inhibiteur de la TXS) n'affecte pas la réponse endothéliale (Leblond et al. 2014). De plus, l'expression génique de la TXS et le niveau de TXB₂ circulant sont similaires entre les souris contrôles et p53^{+/-} (Leblond et al. 2014). L'amélioration de la fonction endothéliale en présence d'indométacine chez les

souris âgées de 9 et 12 mois constitue le seul indice de la présence d'un EDCF dérivé des COX (Leblond et al. 2013), bien que les expressions géniques de la TXS, PGI₂S et du récepteur TP n'ont pas été modifiées dans l'étude 1 (données non-publiées). La mesure des métabolites dérivés des COX (PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGI₂) libérés directement dans le bain des artères isolées aurait pu permettre de déterminer plus efficacement l'EDCF responsable de la diminution de la relaxation, comme déjà démontré précédemment (Gendron et al. 2007a; Wong et al. 2009).

Dans la seconde étude, l'apparition prématurée des cancers chez les souris p53^{-/-} et p53^{+/-} a imposé certains de nos paramètres expérimentaux (Donehower et al. 1992; Harvey et al. 1993; Jacks et al. 1994; Purdie et al. 1994; Venkatachalam et al. 2001). Tout d'abord, nous avons exclu les souris p53^{-/-} étant donné leur mort prématurée (Donehower et al. 1992; Harvey et al. 1993; Jacks et al. 1994; Purdie et al. 1994; Venkatachalam et al. 2001). De plus, puisque les néoplasmes apparaissent vers l'âge de 9 mois chez les souris p53^{+/-} (Donehower et al. 1992; Purdie et al. 1994), nous avons limité la période de l'étude à 6 mois pour limiter au maximum le risque d'un effet des cellules cancéreuses dans les réponses observées. Les cellules cancéreuses peuvent en effet initier une réaction inflammatoire qui peut affecter l'organisme en entier (Halliwell et al. 2007). De ce fait, notre étude s'est effectuée dans un modèle de souris possédant toujours un certain niveau de p53 (p53^{+/-}), sans cancer, ce qui avait le potentiel de favoriser l'expression de gènes antioxydants (Bensaad et al. 2005; Sablina et al. 2005).

4.4 Perspectives

La validation d'une hypothèse scientifique génère souvent plus de questions que de réponses. Les prochains paragraphes s'attardent sur quelques avenues de recherche découlant de mes recherches qui m'apparaissent pertinentes.

4.4.1 La caractérisation de la phase de maturation

La phase de maturation constitue, en théorie, la période pendant laquelle une cellule ou un tissu acquiert toutes les fonctions requises pour croître normalement et, ultimement, faire face au vieillissement. Cette période charnière est susceptible d'être modulée par l'environnement: une maturation compromise par un environnement délétère altèrera les mécanismes de défenses cellulaires et accélèrera le vieillissement. Cependant, il existe très peu de données expérimentales sur cette période, qui semble pourtant si cruciale. Au niveau vasculaire, nos données suggèrent que la présence des RS semble nécessaire pour permettre un développement optimal des cellules endothéliales entre l'âge de 1 et 9 mois, puisqu'un traitement préventif avec l'antioxydant catéchine n'a pas été aussi bénéfique que l'exercice physique (Leblond et al. 2013). Pourrait-on envisager de suivre les niveaux de RS pour définir temporellement la phase de maturation? Cette avenue semble peu prometteuse puisqu'il serait quasi impossible de déterminer si les RS permettent une signalisation cellulaire bénéfique ou occasionnent un stress oxydant. Ainsi, quels marqueurs moléculaires permettraient de délimiter dans le temps la phase de maturation? Le suivi de l'expression de gènes clés impliqués dans le vieillissement pourrait s'avérer une option intéressante. Le moment où l'expression d'un gène bénéfique atteint son expression maximale (ou lorsqu'un gène délétère commence à être exprimé) pourrait suggérer la fin de la période de maturation. Par exemple, les gènes p66shc (Migliaccio et al. 1999) et Sirt-1 (Tissenbaum et al. 2001; Rogina et al. 2004) pourraient être deux candidats potentiels étant donné leur capacité à, respectivement, réduire ou à augmenter l'espérance de vie dans les modèles animaux. Cependant, puisque l'expression génique d'un tissu n'est pas représentatif de tout l'organisme, le choix du tissu pourrait s'avérer problématique et facilement critiquable. Des marqueurs plasmatiques seraient donc à privilégier pour deux raisons principales: 1) le plasma est un reflet systémique et non spécifique d'un tissu donné, 2) une prise de sang est une procédure non-invasive qui peut être facilement répétée à divers moments. Ainsi, la mesure plasmatique du facteur de croissance 1 similaire à l'insuline (IGF-1, *insulin-like growth factor 1*), dont la présence ralentit le développement des MCV chez la souris (Csiszar et al. 2008a; Bailey-Downs et al. 2012; Bailey-Downs et al. 2013), pourrait être un marqueur potentiel pour suivre la phase de maturation. De plus, l'insuline stimule la quantité de cellules endothéliales progénitrices via l'activation du récepteur de l'IGF-1

(Humpert et al. 2008), suggérant un rôle indirect bénéfique de l'IGF-1 via les cellules endothéliales progénitrices pour la prévention du vieillissement vasculaire. Les cellules endothéliales progénitrices sont importantes dans l'homéostasie vasculaire puisqu'elles permettent de réparer et de remplacer les cellules endothéliales endommagées (Leone et al. 2009). La fonctionnalité et le nombre des cellules endothéliales progénitrices diminuant avec l'âge (Williamson et al. 2012), l'évaluation du nombre et de la capacité de ces cellules apparaît aussi comme une cible intéressante pour déterminer le «*timing*» de la phase de maturation. Finalement, la découverte de nouveaux facteurs circulants comme le facteur 11 de croissance et de différenciation (GDF11, *growth differentiation factor 11*) qui restaure certaines fonctions altérées par l'âge (hypertrophie cardiaque, structure, fonction et force musculaire, capacité à l'exercice, fonction cérébrale, neurogénèse) offre une autre possibilité de marqueur moléculaire pour mieux cerner la phase de maturation (Loffredo et al. 2013; Katsimpardi et al. 2014; Sinha et al. 2014). Le moment à partir duquel les quantités d'IGF-1 et de GDF11 plasmatiques se stabilisent, ou lorsque le nombre de cellules endothéliales progénitrices diminuent pourrait s'avérer une période à scruter plus particulièrement pour mieux définir la phase de maturation.

4.4.2 Les effets de l'exercice physique et de la catéchine sont-ils durables et spécifiques?

Les résultats obtenus lors de la première étude démontrent que les bienfaits vasculaires de l'exercice protègent contre une diète riche en gras, et ce malgré l'arrêt de la course chez les souris pendant 3 mois (Leblond et al. 2013). Pendant combien de temps les effets de l'exercice peuvent-ils durer? Certaines études suggèrent que les bienfaits préventifs demeurent de quelques semaines à plusieurs mois (Applegate et al. 1984; Shima et al. 1996; Patterson et al. 2008), tandis que d'autres ont montré que l'arrêt de l'exercice devient délétère quelques jours après l'arrêt (Applegate et al. 1984; Yasari et al. 2006; Laye et al. 2009). Dans nos conditions expérimentales, l'exercice physique pendant 8 mois a permis d'induire une protection endothéliale pendant 3 mois supplémentaires. Il pourrait être intéressant de déterminer si la durée de la protection est directement proportionnelle à la durée de la période d'entraînement, ou si le moment de l'initiation influence grandement la durée de la protection (protocole de 8 mois de course

initié à 6 versus 1 mois par exemple). L'initiation de l'exercice une fois la phase de maturation complétée permettrait-il de maintenir un effet vasculaire protecteur pendant 3 mois? À l'inverse, la catéchine semble délétère sur le profil vasculaire lorsque consommée au début de la vie (Leblond et al. 2013). Cet effet est-il spécifique à la catéchine, ou un autre antioxydant aurait le même effet? L'utilisation du resvératrol ou de la vitamine C changerait-il les résultats obtenus?

4.4.3 Une meilleure compréhension du rôle du gène suppresseur de tumeurs p53 au niveau vasculaire

Il semble que les souris p53^{+/-}, de par leur métabolisme biliaire accru, aient pu éviter le stress métabolique induit par la diète riche en gras (Leblond et al. 2014). Pour contourner ce phénomène et pour évaluer la résistance à un stress métabolique chez les souris p53^{+/-}, différentes alternatives pourraient être envisagées. Par exemple, l'injection de streptozotocine, qui détruit les cellules β du pancréas, provoquerait un diabète de type 1 avec tous les désordres métaboliques qui lui sont reliés (hyperglycémie et hausse du stress oxydant par exemple). L'implantation de mini-pompes contenant de l'AngII ou de l'Angptl-2 chez les souris p53^{+/-} serait aussi une méthode pour induire un stress afin de tester les défenses endogènes des souris p53^{+/-}. La protection contre l'hypercholestérolémie induite par la diète riche en gras observée chez les souris p53^{+/-} (Leblond et al. 2014) suggère un rôle important de p53 dans le métabolisme du cholestérol et des lipides, mais p53 participe-t-il seulement au métabolisme des acides biliaires? Bien que nous n'ayons pas observé de différence dans les expressions géniques de gènes clés du métabolisme du cholestérol dans le foie des souris p53^{+/-} (Leblond et al. 2014), une étude *in vitro* a montré un lien entre p53 le facteur de transcription SREBP2 (Freed-Pastor et al. 2012), qui constitue le senseur métabolique des niveaux de cholestérol intracellulaire (Horton et al. 2002). De plus, l'expression de NPC1L1, le transporteur principal pour l'absorption intestinale du cholestérol (Altmann et al. 2004) et la cible de l'hypocholestérolémiant ézétimibe (Garcia-Calvo et al. 2005), semble être contrôlée par p53 dans les cellules hépatiques humaines HepG2 (Goldstein et al. 2012). Il pourrait être intéressant d'étudier le métabolisme intestinal du cholestérol chez les souris p53^{+/-} pour déterminer si p53 interagit avec NPC1L1 et SREBP dans les

entérocytes. Le rôle de p53 dans le métabolisme du cholestérol n'est donc peut-être pas complètement élucidé.

4.4.4 Le rôle de l'épigénétique

L'étude de composantes épigénétiques (modifications affectant l'expression d'un gène sans en changer la séquence) pourrait aussi s'avérer utile pour expliquer les empreintes laissées par les différentes interventions précoces (exercice, catéchine et réduction endogène de l'expression de p53). En effet, les modifications épigénétiques peuvent laisser une empreinte sur le génome qui serait même transférable entre les générations (Dolinoy et al. 2007; Ng et al. 2010): les modifications épigénétiques apparaissant dans l'environnement prénatal ou très tôt dans la vie pourraient se faire sentir seulement plus tard en présence d'un stress (Gluckman et al. 2008). L'épigénétique pourrait expliquer l'hypothèse de Barker qui stipule que l'environnement pré-natal conditionne le risque de développer des MCV plus tard dans la vie (Barker 1995; Barker 2004). L'épigénétique pourrait ainsi expliquer l'impact drastique de la «*westernization*» de la population de l'île de Nauru en Polynésie, chez qui le changement d'un mode de vie traditionnel des habitants (chasseurs-cueilleurs) vers un mode de vie occidental a fait exploser la prévalence des MCV (Zimmet et al. 1978; Taylor et al. 1985). La croissance dans un environnement trop protégé aurait potentiellement mené à une moins bonne capacité d'adaptation (Gluckman et al. 2008; Gluckman et al. 2009). De façon similaire, l'effet antioxydant de la catéchine n'aurait potentiellement pas permis une bonne transition vers l'environnement pro-athérosclérotique de la diète riche en gras (Leblond et al. 2013). Dans le laboratoire, nous avons démontré que la prise précoce de catéchine a affecté le profil de méthylation du promoteur de la SOD2 dans les artères fémorales, ce qui aurait empêché la stimulation de l'expression de cette enzyme protectrice (Nguyen et al. 2011). Il est aussi intéressant de noter que le gène suppresseur de tumeurs p53 est aussi régulé par des processus épigénétiques (Levine et al. 2012; Yi et al. 2012). L'étude de la méthylation de p53, de gènes antioxydants (par exemple la SOD2, la GPx1, la catalase et certaines sous-unités de la Nox comme p22phox et gp91phox) et des gènes importants pour la relaxation (comme eNOS, PGI₂S, TXS, IP, TP, COX) dans les artères des souris p53^{+/-}, WT actives et ayant consommé la catéchine pourrait aussi nous aider à

mieux comprendre les impacts à long-terme d'un changement dans l'environnement vasculaire.

5. CONCLUSIONS

Les objectifs de nos travaux étaient de déterminer quel était l'impact préventif précoce de l'environnement promu par l'exercice, la catéchine et la réduction de l'expression endogène du gène suppresseur de tumeurs p53 sur la capacité à long-terme des souris à faire face à un stress métabolique. Pour ce faire, nous avons évalué, entre autres, la fonction endothéliale qui permet de suivre de manière précoce le développement d'une dysfonction vasculaire. Nous avons montré lors de la première étude à l'aide d'un protocole novateur que l'exercice permet une meilleure protection par rapport à la catéchine face à une diète riche en gras (Leblond et al. 2013). Dans la seconde étude, alors que nous voulions tester le rôle de p53 face à un stress métabolique, nous avons démontré un métabolisme accru des acides biliaires des souris p53^{+/-}, ce qui a protégé les souris du stress métabolique (Leblond et al. 2014). Nous avons démontré globalement un lien entre l'environnement vasculaire et la fonction endothéliale. Nous avons pu évaluer la capacité des interventions (exercice et catéchine) lors de la maturation à moduler la capacité des cellules endothéliales à faire face à un environnement pro-athérosclérotique délétère plus tard dans la vie alors que les souris p53^{+/-} ont échappé à ce «*challenge*» (Figure 22).

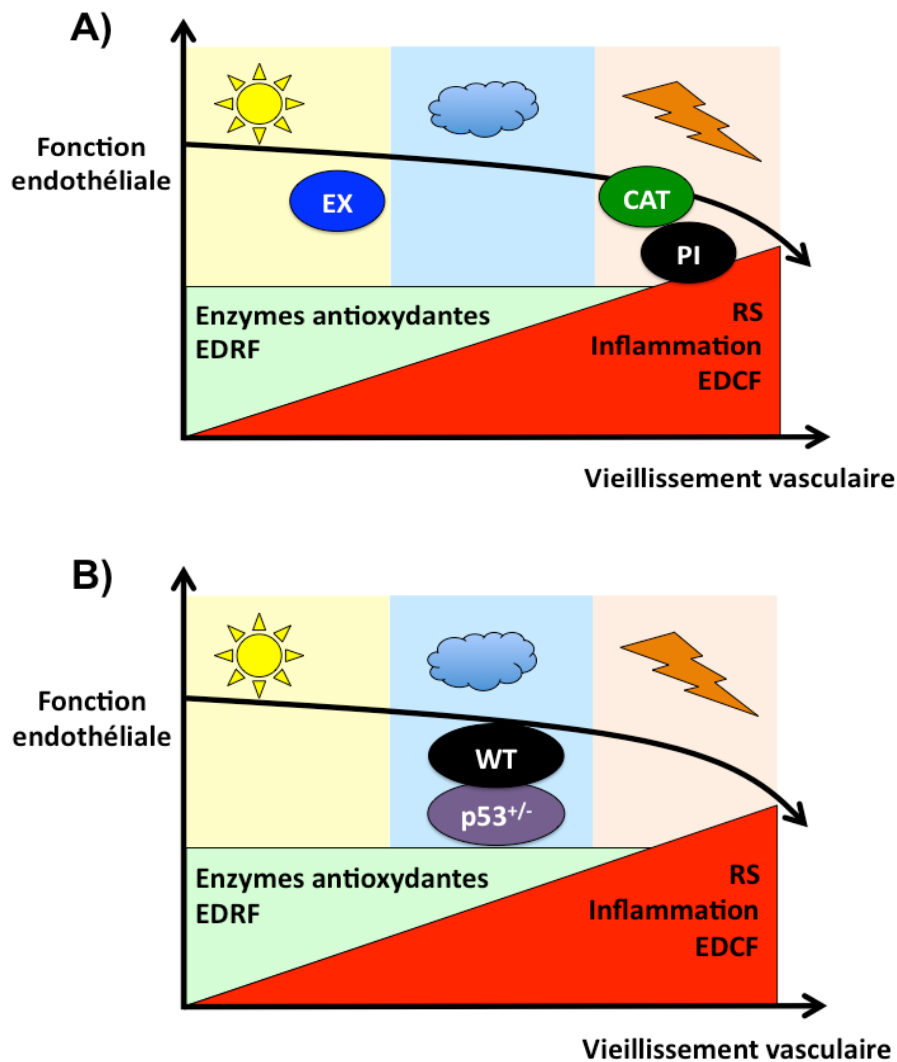


Figure 22 Impact sur la fonction endothéliale de la diète riche en gras suite à A) la pratique régulière de l'exercice volontaire (EX), de la consommation de la catéchine (CAT), de l'inactivité physique (PI) et B) de la réduction de l'expression endogène de p53 pendant le développement et la maturation des cellules endothéliales chez la souris.

La fonction endothéliale des souris est affectée par l'environnement vasculaire qui les entoure. Un environnement bénéfique (inflammation et stress oxydant faibles) pourra protéger la fonction endothéliale (☀️), tandis qu'un environnement délétère (inflammation et stress oxydant élevé) aura pour effet d'accélérer le vieillissement vasculaire et d'induire la dysfonction endothéliale (⚡️). La capacité des cellules endothéliales à maintenir leur fonction lors de changements d'environnements vasculaires (augmentation ou diminution de l'inflammation et du stress oxydant) sera dictée par leurs mécanismes de défenses endogènes (i.e. enzymes antioxydantes) qui

sont développés pendant la phase de maturation. Certains mécanismes de compensation peuvent être activés pour maintenir un bon fonctionnement vasculaire (enzymes antioxydantes, EDRF) en présence d'une hausse du stress oxydant et des EDCF (☁). Avec le vieillissement «*normal*», la fonction endothéliale diminue avec le temps, processus qui peut être accéléré par la présence de facteurs de risque cardiovasculaire (ou induit par la diète riche en gras). A) La pratique de l'exercice physique volontaire (EX) est bénéfique puisqu'elle a permis de maintenir la fonction endothéliale malgré la diète riche en gras. La consommation de la catéchine (CAT) a maintenu la fonction endothéliale en présence de la diète riche en gras, mais des indices d'inflammation ont été observés. Chez les souris inactives (PI), la fonction endothéliale diminue avec la diète riche en gras sans toutefois montrer de hausse d'inflammation. B) À 6 mois, chez les souris contrôles (WT) les mécanismes de protection endogènes sont activés (EDHF et SOD2) pour contrer les effets délétères de la diète riche en gras. Les souris p53^{+/-} (p53^{+/-}) présentent une composante EDHF équivalente et une activité SOD2 similaire aux souris WT. EDCF: facteurs constricteurs dérivés de l'endothélium; EDRF: facteurs relaxants dérivés de l'endothélium; RS: espèces réactives.

Considérant la hausse de la prévalence des MCV, une meilleure compréhension des mécanismes menant vers la dysfonction endothéliale ne peut être que bénéfique. En effet, il est prévu que d'ici 20 ans la moitié de la population aux États-Unis sera obèse (Wang et al. 2011). Ce fléau laisse même suggérer que nos enfants vivront moins longtemps que leurs parents (Olshansky et al. 2005). Bien que mes études n'aient pas identifié de nouvelles cibles pharmacologiques pour prévenir les MCV, elles démontrent néanmoins la sensibilité de l'endothélium à l'environnement qui l'entoure, et celui dans lequel les cellules endothéliales se développent (phase de maturation). De plus, nous avons montré que l'exercice constitue une méthode de choix pour prévenir la dysfonction endothéliale occasionnée par une diète riche en gras. La prévention par un style de vie équilibré comprenant de l'exercice modéré régulier demeure le meilleur outil, simple et peu onéreux, à mettre en place pour prévenir le vieillissement de l'endothélium. Les cellules endothéliales sollicitées régulièrement par l'exercice physique ont été mieux protégées face à un stress exogène que les cellules endothéliales «*trop protégées*» par un antioxydant ou ayant une expression réduite de p53, le gardien du génome. En accord avec la théorie de l'hormesis, un stress léger provenant de l'exercice serait bénéfique à long terme pour stimuler les mécanismes de défenses endogènes cellulaires.

6. RÉFÉRENCES

- (2002). "MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial." Lancet **360**(9326): 23-33.
- Aarsland, D., Sardaheae, F. S., Anderssen, S. and Ballard, C. (2010). "Is physical activity a potential preventive factor for vascular dementia? A systematic review." Aging Ment Health **14**(4): 386-395.
- Akamine, E. H., Kawamoto, E. M., Scavone, C., Nigro, D., Carvalho, M. H., de Cassia, A. T. R., Britto, L. R. and Fortes, Z. B. (2006a). "Correction of endothelial dysfunction in diabetic female rats by tetrahydrobiopterin and chronic insulin." J Vasc Res **43**(4): 309-320.
- Akamine, E. H., Urakawa, T. A., de Oliveira, M. A., Nigro, D., de Carvalho, M. H., de Cassia, A. T. R. and Fortes, Z. B. (2006b). "Decreased endothelium-dependent vasodilation in diabetic female rats: role of prostanoids." J Vasc Res **43**(5): 401-410.
- Al-Shaer, M. H., Choueiri, N. E., Correia, M. L., Sinkey, C. A., Barenz, T. A. and Haynes, W. G. (2006). "Effects of aging and atherosclerosis on endothelial and vascular smooth muscle function in humans." Int J Cardiol **109**(2): 201-206.
- Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A. M. and Cook, J. L. (1999). "Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene." J Biol Chem **274**(37): 26071-26078.
- Albert, M. A., Glynn, R. J. and Ridker, P. M. (2003). "Plasma concentration of C-reactive protein and the calculated Framingham Coronary Heart Disease Risk Score." Circulation **108**(2): 161-165.
- Aldini, G., Carini, M., Piccoli, A., Rossoni, G. and Facino, R. M. (2003). "Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection." Life Sci **73**(22): 2883-2898.
- Alessio, H. M. and Goldfarb, A. H. (1988a). "Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training." J Appl Physiol **64**(4): 1333-1336.
- Alessio, H. M., Goldfarb, A. H. and Cutler, R. G. (1988b). "MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat." Am J Physiol **255**(6 Pt 1): C874-877.
- Alheid, U., Frolich, J. C. and Forstermann, U. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets." Thromb Res **47**(5): 561-571.
- Aliev, G., Palacios, H. H., Lipsitt, A. E., Fischbach, K., Lamb, B. T., Obrenovich, M. E., Morales, L., Gasimov, E. and Bragin, V. (2009). "Nitric oxide as an initiator of brain lesions during the development of Alzheimer disease." Neurotox Res **16**(3): 293-305.
- Altmann, S. W., Davis, H. R., Jr., Zhu, L. J., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N. and Graziano, M. P. (2004). "Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption." Science **303**(5661): 1201-1204.

- Alvarez, Y., Briones, A. M., Balfagon, G., Alonso, M. J. and Salaices, M. (2005). "Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses." *J Hypertens* **23**(4): 767-777.
- Anderson, T. J., Meredith, I. T., Yeung, A. C., Frei, B., Selwyn, A. P. and Ganz, P. (1995). "The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion." *N Engl J Med* **332**(8): 488-493.
- Anson, R. M., Guo, Z., de Cabo, R., Iyun, T., Rios, M., Hagepanos, A., Ingram, D. K., Lane, M. A. and Mattson, M. P. (2003). "Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10): 6216-6220.
- Antosh, M., Whitaker, R., Kroll, A., Hosier, S., Chang, C., Bauer, J., Cooper, L., Neretti, N. and Helfand, S. L. (2011). "Comparative transcriptional pathway bioinformatic analysis of dietary restriction, Sir2, p53 and resveratrol life span extension in *Drosophila*." *Cell Cycle* **10**(6): 904-911.
- Apostolakis, S., Vogiatzi, K., Amanatidou, V. and Spandidos, D. A. (2009). "Interleukin 8 and cardiovascular disease." *Cardiovascular research* **84**(3): 353-360.
- Applegate, E. A., Upton, D. E. and Stern, J. S. (1984). "Exercise and detraining: effect on food intake, adiposity and lipogenesis in Osborne-Mendel rats made obese by a high fat diet." *J Nutr* **114**(2): 447-459.
- Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H. and Nakanishi, S. (1990). "Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor." *Nature* **348**(6303): 730-732.
- Arehart, E., Stitham, J., Asselbergs, F. W., Douville, K., MacKenzie, T., Fetalvero, K. M., Gleim, S., Kasza, Z., Rao, Y., Martel, L., Segel, S., Robb, J., Kaplan, A., Simons, M., Powell, R. J., Moore, J. H., Rimm, E. B., Martin, K. A. and Hwa, J. (2008). "Acceleration of cardiovascular disease by a dysfunctional prostacyclin receptor mutation: potential implications for cyclooxygenase-2 inhibition." *Circ Res* **102**(8): 986-993.
- Arenas, I. A., Xu, Y. and Davidge, S. T. (2006). "Age-associated impairment in vasorelaxation to fluid shear stress in the female vasculature is improved by TNF-alpha antagonism." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**(3): H1259-1263.
- Arndt, H., Smith, C. W. and Granger, D. N. (1993). "Leukocyte-endothelial cell adhesion in spontaneously hypertensive and normotensive rats." *Hypertension* **21**(5): 667-673.
- Asaba, K., Tojo, A., Onozato, M. L., Goto, A., Quinn, M. T., Fujita, T. and Wilcox, C. S. (2005). "Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy." *Kidney Int* **67**(5): 1890-1898.
- Ayajiki, K., Kindermann, M., Hecker, M., Fleming, I. and Busse, R. (1996). "Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells." *Circ Res* **78**(5): 750-758.
- Babu, P. V., Si, H. and Liu, D. (2012). "Epigallocatechin gallate reduces vascular inflammation in db/db mice possibly through an NF-kappaB-mediated mechanism." *Mol Nutr Food Res* **56**(9): 1424-1432.
- Baigent, C., Blackwell, L., Emberson, J., Holland, L. E., Reith, C., Bhala, N., Peto, R., Barnes, E. H., Keech, A., Simes, J. and Collins, R. (2010). "Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials." *Lancet* **376**(9753): 1670-1681.
- Bailey-Downs, L. C., Mitschelen, M., Sosnowska, D., Toth, P., Pinto, J. T., Ballabh, P., Valcarcel-Ares, M. N., Farley, J., Koller, A., Henthorn, J. C., Bass, C., Sonntag, W. E., Ungvari, Z. and Csiszar, A. (2012). "Liver-specific knockdown of IGF-1

- decreases vascular oxidative stress resistance by impairing the Nrf2-dependent antioxidant response: a novel model of vascular aging." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **67**(4): 313-329.
- Bailey-Downs, L. C., Tucsek, Z., Toth, P., Sosnowska, D., Gautam, T., Sonntag, W. E., Csiszar, A. and Ungvari, Z. (2013). "Aging exacerbates obesity-induced oxidative stress and inflammation in perivascular adipose tissue in mice: a paracrine mechanism contributing to vascular redox dysregulation and inflammation." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **68**(7): 780-792.
- Baker, S. J., Markowitz, S., Fearon, E. R., Willson, J. K. and Vogelstein, B. (1990). "Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53." Science **249**(4971): 912-915.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. and Ziv, Y. (1998). "Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage." Science **281**(5383): 1674-1677.
- Banning, C. (1946). "Food Shortage and Public Health, First Half of 1945." The ANNALS of the American Academy of Political and Social Science **245**: 93-110.
- Barajas, B., Che, N., Yin, F., Rowshanrad, A., Orozco, L. D., Gong, K. W., Wang, X., Castellani, L. W., Reue, K., Lusis, A. J. and Araujo, J. A. (2011). "NF-E2-related factor 2 promotes atherosclerosis by effects on plasma lipoproteins and cholesterol transport that overshadow antioxidant protection." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(1): 58-66.
- Barbieri, S. S., Amadio, P., Gianellini, S., Tarantino, E., Zacchi, E., Veglia, F., Howe, L. R., Weksler, B. B., Mussoni, L. and Tremoli, E. (2012). "Cyclooxygenase-2-derived prostacyclin regulates arterial thrombus formation by suppressing tissue factor in a sirtuin-1-dependent-manner." Circulation **126**(11): 1373-1384.
- Barja, G. and Herrero, A. (1998). "Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon." J Bioenerg Biomembr **30**(3): 235-243.
- Barja, G. and Herrero, A. (2000). "Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals." FASEB J **14**(2): 312-318.
- Barker, D. J. (1995). "Fetal origins of coronary heart disease." BMJ **311**(6998): 171-174.
- Barker, D. J. (2004). "The developmental origins of adult disease." J Am Coll Nutr **23**(6 Suppl): 588S-595S.
- Barton, M., Haudenschild, C. C., d'Uscio, L. V., Shaw, S., Munter, K. and Luscher, T. F. (1998). "Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14367-14372.
- Bauer, J. H., Morris, S. N., Chang, C., Flatt, T., Wood, J. G. and Helfand, S. L. (2009). "dSir2 and Dmp53 interact to mediate aspects of CR-dependent lifespan extension in *D. melanogaster*." Aging (Albany NY) **1**(1): 38-48.
- Bauer, J. H., Poon, P. C., Glatt-Deeley, H., Abrams, J. M. and Helfand, S. L. (2005). "Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult *Drosophila melanogaster* extends life span." Curr Biol **15**(22): 2063-2068.
- Bauer, P. M., Buga, G. M. and Ignarro, L. J. (2001). "Role of p42/p44 mitogen-activated-protein kinase and p21waf1/cip1 in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation by nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12802-12807.
- Bauersachs, J., Popp, R., Hecker, M., Sauer, E., Fleming, I. and Busse, R. (1996). "Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor." Circulation **94**(12): 3341-3347.

- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P. J., Poosala, S., Becker, K. G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., Lakatta, E. G., Le Couteur, D., Shaw, R. J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D. K., de Cabo, R. and Sinclair, D. A. (2006). "Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet." *Nature* **444**(7117): 337-342.
- Bayod, S., Del Valle, J., Lanza, J. F., Sanchez-Roige, S., de Luxan-Delgado, B., Coto-Montes, A., Canudas, A. M., Camins, A., Escorihuela, R. M. and Pallas, M. (2012). "Long-term physical exercise induces changes in sirtuin 1 pathway and oxidative parameters in adult rat tissues." *Exp Gerontol* **47**(12): 925-935.
- Beasley, L. E., Koster, A., Newman, A. B., Javaid, M. K., Ferrucci, L., Kritchevsky, S. B., Kuller, L. H., Pahor, M., Schaap, L. A., Visser, M., Rubin, S. M., Goodpaster, B. H. and Harris, T. B. (2009). "Inflammation and race and gender differences in computerized tomography-measured adipose depots." *Obesity (Silver Spring)* **17**(5): 1062-1069.
- Beckerman, R. and Prives, C. (2010). "Transcriptional regulation by p53." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(8): a000935.
- Beckman, J. A., Liao, J. K., Hurley, S., Garrett, L. A., Chui, D., Mitra, D. and Creager, M. A. (2004). "Atorvastatin restores endothelial function in normocholesterolemic smokers independent of changes in low-density lipoprotein." *Circ Res* **95**(2): 217-223.
- Beckman, J. S. and Koppenol, W. H. (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." *Am J Physiol* **271**(5 Pt 1): C1424-1437.
- Bedard, K. and Krause, K. H. (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." *Physiol Rev* **87**(1): 245-313.
- Beliveau, R. and Gingras, D. (2007). "Role of nutrition in preventing cancer." *Can Fam Physician* **53**(11): 1905-1911.
- Benkhoff, S., Loot, A. E., Pierson, I., Sturza, A., Kohlstedt, K., Fleming, I., Shimokawa, H., Grisk, O., Brandes, R. P. and Schroder, K. (2012). "Leptin potentiates endothelium-dependent relaxation by inducing endothelial expression of neuronal NO synthase." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**(7): 1605-1612.
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M. A., Vidal, M. N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E. and Vousden, K. H. (2006). "TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis." *Cell* **126**(1): 107-120.
- Bensaad, K. and Vousden, K. H. (2005). "Savior and slayer: the two faces of p53." *Nat Med* **11**(12): 1278-1279.
- Berkowitz, D. E., White, R., Li, D., Minhas, K. M., Cernetich, A., Kim, S., Burke, S., Shoukas, A. A., Nyhan, D., Champion, H. C. and Hare, J. M. (2003). "Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels." *Circulation* **108**(16): 2000-2006.
- Blagosklonny, M. V., Campisi, J., Sinclair, D. A., Bartke, A., Blasco, M. A., Bonner, W. M., Bohr, V. A., Brosh, R. M., Jr., Brunet, A., Depinho, R. A., Donehower, L. A., Finch, C. E., Finkel, T., Gorospe, M., Gudkov, A. V., Hall, M. N., Hekimi, S., Helfand, S. L., Karlseder, J., Kenyon, C., Kroemer, G., Longo, V., Nussenzweig, A., Osiewacz, H. D., Peeper, D. S., Rando, T. A., Rudolph, K. L., Sassone-Corsi, P., Serrano, M., Sharpless, N. E., Skulachev, V. P., Tilly, J. L., Tower, J., Verdin, E. and Vijg, J. (2010). "Impact papers on aging in 2009." *Aging (Albany NY)* **2**(3): 111-121.
- Blair, S. N., Kohl, H. W., 3rd, Barlow, C. E., Paffenbarger, R. S., Jr., Gibbons, L. W. and Macera, C. A. (1995). "Changes in physical fitness and all-cause mortality. A

- prospective study of healthy and unhealthy men." JAMA : the journal of the American Medical Association **273**(14): 1093-1098.
- Blankenberg, S., Rupprecht, H. J., Bickel, C., Torzewski, M., Hafner, G., Tiret, L., Smieja, M., Cambien, F., Meyer, J. and Lackner, K. J. (2003). "Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease." N Engl J Med **349**(17): 1605-1613.
- Bode, A. M. and Dong, Z. (2004). "Post-translational modification of p53 in tumorigenesis." Nat Rev Cancer **4**(10): 793-805.
- Bohm, F., Jensen, J., Svane, B., Settergren, M. and Pernow, J. (2008). "Intracoronary endothelin receptor blockade improves endothelial function in patients with coronary artery disease." Can J Physiol Pharmacol **86**(11): 745-751.
- Bohme, G. A., Bon, C., Lemaire, M., Reibaud, M., Piot, O., Stutzmann, J. M., Doble, A. and Blanchard, J. C. (1993). "Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(19): 9191-9194.
- Bolduc, V., Baraghis, E., Duquette, N., Thorin-Trescases, N., Lambert, J., Lesage, F. and Thorin, E. (2012). "Catechin prevents severe dyslipidemia-associated changes in wall biomechanics of cerebral arteries in LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} mice and improves cerebral blood flow." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **302**(6): H1330-1339.
- Bolduc, V., Drouin, A., Gillis, M. A., Duquette, N., Thorin-Trescases, N., Frayne-Robillard, I., Des Rosiers, C., Tardif, J. C. and Thorin, E. (2011). "Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **301**(5): H2081-2092.
- Bonafe, M., Olivieri, F., Mari, D., Baggio, G., Mattace, R., Berardelli, M., Sansoni, P., De Benedictis, G., De Luca, M., Marchegiani, F., Cavallone, L., Cardelli, M., Giovagnetti, S., Ferrucci, L., Amadio, L., Lisa, R., Tucci, M. G., Troiano, L., Pini, G., Guerresi, P., Morellini, M., Sorbi, S., Passeri, G., Barbi, C., Valensin, S., Monti, D., Deiana, L., Pes, G. M., Carru, C. and Franceschi, C. (1999a). "P53 codon 72 polymorphism and longevity: additional data on centenarians from continental Italy and Sardinia." Am J Hum Genet **65**(6): 1782-1785.
- Bonafe, M., Olivieri, F., Mari, D., Baggio, G., Mattace, R., Sansoni, P., De Benedictis, G., De Luca, M., Bertolini, S., Barbi, C., Monti, D. and Franceschi, C. (1999b). "p53 variants predisposing to cancer are present in healthy centenarians." Am J Hum Genet **64**(1): 292-295.
- Boo, Y. C., Sorescu, G., Boyd, N., Shiojima, I., Walsh, K., Du, J. and Jo, H. (2002). "Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A." J Biol Chem **277**(5): 3388-3396.
- Boulanger, C. and Luscher, T. F. (1990). "Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide." J Clin Invest **85**(2): 587-590.
- Bouvard, V., Zaitchouk, T., Vacher, M., Duthu, A., Canivet, M., Choisy-Rossi, C., Nieruchalski, M. and May, E. (2000). "Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice." Oncogene **19**(5): 649-660.
- Branch-Mays, G. L., Dawson, D. R., Gunsolley, J. C., Reynolds, M. A., Ebersole, J. L., Novak, K. F., Mattison, J. A., Ingram, D. K. and Novak, M. J. (2008). "The effects of a calorie-reduced diet on periodontal inflammation and disease in a non-human primate model." J Periodontol **79**(7): 1184-1191.

- Brandes, R. P., Fleming, I. and Busse, R. (2005). "Endothelial aging." *Cardiovascular research* **66**(2): 286-294.
- Brandes, R. P., Schmitz-Winnenthal, F. H., Feletou, M., Godecke, A., Huang, P. L., Vanhoutte, P. M., Fleming, I. and Busse, R. (2000). "An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(17): 9747-9752.
- Brandes, R. P., Weissmann, N. and Schroder, K. (2010). "NADPH oxidases in cardiovascular disease." *Free Radic Biol Med* **49**(5): 687-706.
- Brasier, A. R. (2010). "The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation." *Cardiovasc Res* **86**(2): 211-218.
- Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1990). "Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(2): 682-685.
- Bresalier, R. S., Sandler, R. S., Quan, H., Bolognese, J. A., Oxenius, B., Horgan, K., Lines, C., Riddell, R., Morton, D., Lanas, A., Konstam, M. A. and Baron, J. A. (2005). "Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial." *N Engl J Med* **352**(11): 1092-1102.
- Brown, J. P., Wei, W. and Sedivy, J. M. (1997). "Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts." *Science* **277**(5327): 831-834.
- Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S. E., Mostoslavsky, R., Cohen, H. Y., Hu, L. S., Cheng, H. L., Jedrychowski, M. P., Gygi, S. P., Sinclair, D. A., Alt, F. W. and Greenberg, M. E. (2004). "Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase." *Science* **303**(5666): 2011-2015.
- Bruunsgaard, H., Skinhoj, P., Pedersen, A. N., Schroll, M. and Pedersen, B. K. (2000). "Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis." *Clin Exp Immunol* **121**(2): 255-260.
- Bryk, R., Griffin, P. and Nathan, C. (2000). "Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins." *Nature* **407**(6801): 211-215.
- Bucci, M., Gratton, J. P., Rudic, R. D., Acevedo, L., Roviezzo, F., Cirino, G. and Sessa, W. C. (2000). "In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation." *Nat Med* **6**(12): 1362-1367.
- Budanov, A. V. and Karin, M. (2008). "p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling." *Cell* **134**(3): 451-460.
- Budanov, A. V., Sablina, A. A., Feinstein, E., Koonin, E. V. and Chumakov, P. M. (2004). "Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD." *Science* **304**(5670): 596-600.
- Budanov, A. V., Shoshani, T., Faerman, A., Zelin, E., Kamer, I., Kalinski, H., Gorodin, S., Fishman, A., Chajut, A., Einat, P., Skaliter, R., Gudkov, A. V., Chumakov, P. M. and Feinstein, E. (2002). "Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability." *Oncogene* **21**(39): 6017-6031.
- Bunker, A. K., Arce-Esquivel, A. A., Rector, R. S., Booth, F. W., Ibdah, J. A. and Laughlin, M. H. (2010). "Physical activity maintains aortic endothelium-dependent relaxation in the obese type 2 diabetic OLETF rat." *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **298**(6): H1889-1901.
- Cai, H. and Harrison, D. G. (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." *Circ Res* **87**(10): 840-844.
- Calabrese, E. J., Bachmann, K. A., Bailer, A. J., Bolger, P. M., Borak, J., Cai, L., Cedergreen, N., Cherian, M. G., Chiueh, C. C., Clarkson, T. W., Cook, R. R.,

- Diamond, D. M., Doolittle, D. J., Dorato, M. A., Duke, S. O., Feinendegen, L., Gardner, D. E., Hart, R. W., Hastings, K. L., Hayes, A. W., Hoffmann, G. R., Ives, J. A., Jaworowski, Z., Johnson, T. E., Jonas, W. B., Kaminski, N. E., Keller, J. G., Klaunig, J. E., Knudsen, T. B., Kozumbo, W. J., Lettieri, T., Liu, S. Z., Maisseu, A., Maynard, K. I., Masoro, E. J., McClellan, R. O., Mehendale, H. M., Mothersill, C., Newlin, D. B., Nigg, H. N., Oehme, F. W., Phalen, R. F., Philbert, M. A., Rattan, S. I., Riviere, J. E., Rodricks, J., Sapolsky, R. M., Scott, B. R., Seymour, C., Sinclair, D. A., Smith-Sonneborn, J., Snow, E. T., Spear, L., Stevenson, D. E., Thomas, Y., Tubiana, M., Williams, G. M. and Mattson, M. P. (2007). "Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework." Toxicol Appl Pharmacol **222**(1): 122-128.
- Calabrese, E. J., Mattson, M. P. and Calabrese, V. (2010). "Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance." Hum Exp Toxicol **29**(12): 980-1015.
- Camici, G. G., Schiavoni, M., Francia, P., Bachschmid, M., Martin-Padura, I., Hersberger, M., Tanner, F. C., Pelicci, P., Volpe, M., Anversa, P., Luscher, T. F. and Cosentino, F. (2007). "Genetic deletion of p66(Shc) adaptor protein prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(12): 5217-5222.
- Camici, G. G., Shi, Y., Cosentino, F., Francia, P. and Luscher, T. F. (2010). "Anti-Aging Medicine: Molecular Basis for Endothelial Cell-Targeted Strategies - A Mini-Review." Gerontology.
- Campbell, W. B., Gebremedhin, D., Pratt, P. F. and Harder, D. R. (1996). "Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors." Circ Res **78**(3): 415-423.
- Campisi, J. (2013). "Aging, cellular senescence, and cancer." Annu Rev Physiol **75**: 685-705.
- Campisi, J. and d'Adda di Fagagna, F. (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 729-740.
- Canman, C. E., Lim, D. S., Cimprich, K. A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M. B. and Siliciano, J. D. (1998). "Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53." Science **281**(5383): 1677-1679.
- Capettini, L. S., Cortes, S. F., Gomes, M. A., Silva, G. A., Pesquero, J. L., Lopes, M. J., Teixeira, M. M. and Lemos, V. S. (2008). "Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(6): H2503-2511.
- Carlsson, L. M., Jonsson, J., Edlund, T. and Marklund, S. L. (1995). "Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(14): 6264-6268.
- Cathcart, M. C., Reynolds, J. V., O'Byrne, K. J. and Pidgeon, G. P. (2010). "The role of prostacyclin synthase and thromboxane synthase signaling in the development and progression of cancer." Biochim Biophys Acta **1805**(2): 153-166.
- Catt, K. J., Cain, M. D., Zimmet, P. Z. and Cran, E. (1969). "Blood angiotensin II levels of normal and hypertensive subjects." Br Med J **1**(5647): 819-821.
- Cesari, M., Penninx, B. W., Newman, A. B., Kritchevsky, S. B., Nicklas, B. J., Sutton-Tyrrell, K., Tracy, R. P., Rubin, S. M., Harris, T. B. and Pahor, M. (2003). "Inflammatory markers and cardiovascular disease (The Health, Aging and Body Composition [Health ABC] Study)." Am J Cardiol **92**(5): 522-528.

- Chakravarty, E. F., Hubert, H. B., Lingala, V. B. and Fries, J. F. (2008). "Reduced disability and mortality among aging runners: a 21-year longitudinal study." Arch Intern Med **168**(15): 1638-1646.
- Chataigneau, T., Feletou, M., Huang, P. L., Fishman, M. C., Duhault, J. and Vanhoutte, P. M. (1999). "Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice." Br J Pharmacol **126**(1): 219-226.
- Cheang, W. S., Wong, W. T., Tian, X. Y., Yang, Q., Lee, H. K., He, G. W., Yao, X. and Huang, Y. (2011). "Endothelial nitric oxide synthase enhancer reduces oxidative stress and restores endothelial function in db/db mice." Cardiovasc Res **92**(2): 267-275.
- Chen, A. F., Chen, D. D., Daiber, A., Faraci, F. M., Li, H., Rembold, C. M. and Laher, I. (2012). "Free radical biology of the cardiovascular system." Clin Sci (Lond) **123**(2): 73-91.
- Chen, C. K. and Pace-Asciak, C. R. (1996). "Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta." Gen Pharmacol **27**(2): 363-366.
- Chen, L. H. and Snyder, D. L. (1992). "Effects of age, dietary restriction and germ-free environment on glutathione-related enzymes in Lobund-Wistar rats." Arch Gerontol Geriatr **14**(1): 17-26.
- Chen, S. J., Wu, C. C. and Yen, M. H. (2001). "Exercise training activates large-conductance calcium-activated K(+) channels and enhances nitric oxide production in rat mesenteric artery and thoracic aorta." J Biomed Sci **8**(3): 248-255.
- Chen, W., Sun, Z., Wang, X. J., Jiang, T., Huang, Z., Fang, D. and Zhang, D. D. (2009). "Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response." Mol Cell **34**(6): 663-673.
- Chen, Z. P., Mitchelhill, K. I., Michell, B. J., Stapleton, D., Rodriguez-Crespo, I., Witters, L. A., Power, D. A., Ortiz de Montellano, P. R. and Kemp, B. E. (1999). "AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase." FEBS Lett **443**(3): 285-289.
- Chiang, J. Y. (2009). "Bile acids: regulation of synthesis." Journal of lipid research **50**(10): 1955-1966.
- Chiva-Blanch, G., Urpi-Sarda, M., Llorach, R., Rotches-Ribalta, M., Guillen, M., Casas, R., Arranz, S., Valderas-Martinez, P., Portoles, O., Corella, D., Tinahones, F., Lamuela-Raventos, R. M., Andres-Lacueva, C. and Estruch, R. (2012a). "Differential effects of polyphenols and alcohol of red wine on the expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines related to atherosclerosis: a randomized clinical trial." Am J Clin Nutr **95**(2): 326-334.
- Chiva-Blanch, G., Urpi-Sarda, M., Ros, E., Arranz, S., Valderas-Martinez, P., Casas, R., Sacanella, E., Llorach, R., Lamuela-Raventos, R. M., Andres-Lacueva, C. and Estruch, R. (2012b). "Dealcoholized red wine decreases systolic and diastolic blood pressure and increases plasma nitric oxide: short communication." Circ Res **111**(8): 1065-1068.
- Cho, H. J., Xie, Q. W., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D. and Nathan, C. (1992). "Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages." J Exp Med **176**(2): 599-604.
- Chumakov, P. M. (2007). "Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms." Biochemistry (Mosc) **72**(13): 1399-1421.
- Cifuentes, M. E., Rey, F. E., Carretero, O. A. and Pagano, P. J. (2000). "Upregulation of p67(phox) and gp91(phox) in aortas from angiotensin II-infused mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(5): H2234-2240.

- Cinar, M. G., Ulker, S., Alper, G. and Evinc, A. (2001). "Effect of dietary vitamin E supplementation on vascular reactivity of thoracic aorta in streptozotocin-diabetic rats." Pharmacology **62**(1): 56-64.
- Cipollone, F., Cicolini, G. and Bucci, M. (2008). "Cyclooxygenase and prostaglandin synthases in atherosclerosis: recent insights and future perspectives." Pharmacol Ther **118**(2): 161-180.
- Clements, C. M., McNally, R. S., Conti, B. J., Mak, T. W. and Ting, J. P. (2006). "DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(41): 15091-15096.
- Cohen, H. Y., Miller, C., Bitterman, K. J., Wall, N. R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K. T., Gorospe, M., de Cabo, R. and Sinclair, D. A. (2004). "Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase." Science **305**(5682): 390-392.
- Colbert, L. H., Visser, M., Simonsick, E. M., Tracy, R. P., Newman, A. B., Kritchevsky, S. B., Pahor, M., Taaffe, D. R., Brach, J., Rubin, S. and Harris, T. B. (2004). "Physical activity, exercise, and inflammatory markers in older adults: findings from the Health, Aging and Body Composition Study." J Am Geriatr Soc **52**(7): 1098-1104.
- Colcombe, S. and Kramer, A. F. (2003). "Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study." Psychol Sci **14**(2): 125-130.
- Collins, A. R., Lyon, C. J., Xia, X., Liu, J. Z., Tangirala, R. K., Yin, F., Boyadjian, R., Bikineyeva, A., Pratico, D., Harrison, D. G. and Hsueh, W. A. (2009). "Age-accelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes." Circ Res **104**(6): e42-54.
- Colman, R. J., Anderson, R. M., Johnson, S. C., Kastman, E. K., Kosmatka, K. J., Beasley, T. M., Allison, D. B., Cruzen, C., Simmons, H. A., Kemnitz, J. W. and Weindruch, R. (2009). "Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys." Science **325**(5937): 201-204.
- Colman, R. J., Beasley, T. M., Allison, D. B. and Weindruch, R. (2008). "Attenuation of sarcopenia by dietary restriction in rhesus monkeys." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **63**(6): 556-559.
- Cosentino, F. and Osto, E. (2007). "Aging and endothelial dysfunction." Clin Hemorheol Microcirc **37**(1-2): 143-147.
- Costanzo, S., Di Castelnuovo, A., Donati, M. B., Iacoviello, L. and de Gaetano, G. (2010). "Alcohol consumption and mortality in patients with cardiovascular disease: a meta-analysis." J Am Coll Cardiol **55**(13): 1339-1347.
- Costarelli, V. (2009). "Bile acids as possible human carcinogens: new tricks from an old dog." Int J Food Sci Nutr **60 Suppl 6**: 116-125.
- Crane, B. R., Arvai, A. S., Gachhui, R., Wu, C., Ghosh, D. K., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J. and Tainer, J. A. (1997). "The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes." Science **278**(5337): 425-431.
- Crane, B. R., Arvai, A. S., Ghosh, D. K., Wu, C., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J. and Tainer, J. A. (1998). "Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate." Science **279**(5359): 2121-2126.
- Creager, M. A., Cooke, J. P., Mendelsohn, M. E., Gallagher, S. J., Coleman, S. M., Loscalzo, J. and Dzau, V. J. (1990). "Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans." J Clin Invest **86**(1): 228-234.

- Crichton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P. R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T. and Ryan, K. M. (2006). "DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis." *Cell* **126**(1): 121-134.
- Csiszar, A., Labinskyy, N., Jimenez, R., Pinto, J. T., Ballabh, P., Losonczy, G., Pearson, K. J., de Cabo, R. and Ungvari, Z. (2009). "Anti-oxidative and anti-inflammatory vasoprotective effects of caloric restriction in aging: role of circulating factors and SIRT1." *Mech Ageing Dev* **130**(8): 518-527.
- Csiszar, A., Labinskyy, N., Orosz, Z. and Ungvari, Z. (2006a). "Altered mitochondrial energy metabolism may play a role in vascular aging." *Med Hypotheses* **67**(4): 904-908.
- Csiszar, A., Labinskyy, N., Perez, V., Recchia, F. A., Podlutzky, A., Mukhopadhyay, P., Losonczy, G., Pacher, P., Austad, S. N., Bartke, A. and Ungvari, Z. (2008a). "Endothelial function and vascular oxidative stress in long-lived GH/IGF-deficient Ames dwarf mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**(5): H1882-1894.
- Csiszar, A., Labinskyy, N., Smith, K., Rivera, A., Orosz, Z. and Ungvari, Z. (2007a). "Vasculoprotective effects of anti-tumor necrosis factor-alpha treatment in aging." *Am J Pathol* **170**(1): 388-398.
- Csiszar, A., Labinskyy, N., Zhao, X., Hu, F., Serpillon, S., Huang, Z., Ballabh, P., Levy, R. J., Hintze, T. H., Wolin, M. S., Austad, S. N., Podlutzky, A. and Ungvari, Z. (2007b). "Vascular superoxide and hydrogen peroxide production and oxidative stress resistance in two closely related rodent species with disparate longevity." *Aging Cell* **6**(6): 783-797.
- Csiszar, A., Smith, K., Labinskyy, N., Orosz, Z., Rivera, A. and Ungvari, Z. (2006b). "Resveratrol attenuates TNF-alpha-induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF-kappaB inhibition." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**(4): H1694-1699.
- Csiszar, A., Ungvari, Z., Edwards, J. G., Kaminski, P., Wolin, M. S., Koller, A. and Kaley, G. (2002). "Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function." *Circ Res* **90**(11): 1159-1166.
- Csiszar, A., Ungvari, Z., Koller, A., Edwards, J. G. and Kaley, G. (2003). "Aging-induced proinflammatory shift in cytokine expression profile in coronary arteries." *FASEB J* **17**(9): 1183-1185.
- Csiszar, A., Ungvari, Z., Koller, A., Edwards, J. G. and Kaley, G. (2004). "Proinflammatory phenotype of coronary arteries promotes endothelial apoptosis in aging." *Physiol Genomics* **17**(1): 21-30.
- Csiszar, A., Wang, M., Lakatta, E. G. and Ungvari, Z. (2008b). "Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB." *J Appl Physiol* **105**(4): 1333-1341.
- Cuevas, A. M., Guasch, V., Castillo, O., Iribarra, V., Mizon, C., San Martin, A., Strobel, P., Perez, D., Germain, A. M. and Leighton, F. (2000). "A high-fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers." *Lipids* **35**(2): 143-148.
- Cushman, M., Arnold, A. M., Psaty, B. M., Manolio, T. A., Kuller, L. H., Burke, G. L., Polak, J. F. and Tracy, R. P. (2005). "C-reactive protein and the 10-year incidence of coronary heart disease in older men and women: the cardiovascular health study." *Circulation* **112**(1): 25-31.
- Dai, G., Vaughn, S., Zhang, Y., Wang, E. T., Garcia-Cardena, G. and Gimbrone, M. A., Jr. (2007). "Biomechanical forces in atherosclerosis-resistant vascular regions regulate endothelial redox balance via phosphoinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of Nrf2." *Circ Res* **101**(7): 723-733.

- Dal-Ros, S., Bronner, C., Auger, C. and Schini-Kerth, V. B. (2012). "Red wine polyphenols improve an established aging-related endothelial dysfunction in the mesenteric artery of middle-aged rats: role of oxidative stress." Biochem Biophys Res Commun **419**(2): 381-387.
- Davidson, M. H., Donovan, J. M., Misir, S. and Jones, M. R. (2010). "A 50-week extension study on the safety and efficacy of colesvelam in adults with primary hypercholesterolemia." Am J Cardiovasc Drugs **10**(5): 305-314.
- Davies, K. J., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A. and Packer, L. (1982). "Free radicals and tissue damage produced by exercise." Biochem Biophys Res Commun **107**(4): 1198-1205.
- de Cabo, R., Furer-Galban, S., Anson, R. M., Gilman, C., Gorospe, M. and Lane, M. A. (2003). "An in vitro model of caloric restriction." Exp Gerontol **38**(6): 631-639.
- De Mey, J. G. and Vanhoutte, P. M. (1982). "Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium." Circ Res **51**(4): 439-447.
- De Moraes, R., Gioseffi, G., Nobrega, A. C. and Tibirica, E. (2004). "Effects of exercise training on the vascular reactivity of the whole kidney circulation in rabbits." J Appl Physiol **97**(2): 683-688.
- Dekker, R. J., van Soest, S., Fontijn, R. D., Salamanca, S., de Groot, P. G., VanBavel, E., Pannekoek, H. and Horrevoets, A. J. (2002). "Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2)." Blood **100**(5): 1689-1698.
- DeLeo, A. B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G. C., Law, L. W. and Old, L. J. (1979). "Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(5): 2420-2424.
- Delp, M. D., Behnke, B. J., Spier, S. A., Wu, G. and Muller-Delp, J. M. (2008). "Ageing diminishes endothelium-dependent vasodilatation and tetrahydrobiopterin content in rat skeletal muscle arterioles." J Physiol **586**(4): 1161-1168.
- DeSouza, C. A., Shapiro, L. F., Clevenger, C. M., Dineno, F. A., Monahan, K. D., Tanaka, H. and Seals, D. R. (2000). "Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men." Circulation **102**(12): 1351-1357.
- Dhar, S. K., Xu, Y., Chen, Y. and St Clair, D. K. (2006). "Specificity protein 1-dependent p53-mediated suppression of human manganese superoxide dismutase gene expression." J Biol Chem **281**(31): 21698-21709.
- Dilis, V., Katsoulis, M., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Naska, A. and Trichopoulou, A. (2012). "Mediterranean diet and CHD: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort." The British journal of nutrition **108**(4): 699-709.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. and Zeiher, A. M. (1999). "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation." Nature **399**(6736): 601-605.
- Dolinoy, D. C., Weidman, J. R. and Jirtle, R. L. (2007). "Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease." Reprod Toxicol **23**(3): 297-307.
- Donato, A. J., Black, A. D., Jablonski, K. L., Gano, L. B. and Seals, D. R. (2008). "Aging is associated with greater nuclear NF kappa B, reduced I kappa B alpha, and increased expression of proinflammatory cytokines in vascular endothelial cells of healthy humans." Aging Cell **7**(6): 805-812.

- Donato, A. J., Eskurza, I., Silver, A. E., Levy, A. S., Pierce, G. L., Gates, P. E. and Seals, D. R. (2007). "Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB." *Circ Res* **100**(11): 1659-1666.
- Donehower, L. A. (2005). "p53: guardian AND suppressor of longevity?" *Exp Gerontol* **40**(1-2): 7-9.
- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S. and Bradley, A. (1992). "Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours." *Nature* **356**(6366): 215-221.
- Dong, F., Zhang, X., Wold, L. E., Ren, Q., Zhang, Z. and Ren, J. (2005). "Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1." *Br J Pharmacol* **145**(3): 323-333.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F. C., Schedl, A., Haller, H. and Kurzchalia, T. V. (2001). "Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice." *Science* **293**(5539): 2449-2452.
- Drane, P., Bravard, A., Bouvard, V. and May, E. (2001). "Reciprocal down-regulation of p53 and SOD2 gene expression-implication in p53 mediated apoptosis." *Oncogene* **20**(4): 430-439.
- Drouin, A., Bolduc, V., Thorin-Trescases, N., Belanger, E., Fernandes, P., Baraghis, E., Lesage, F., Gillis, M. A., Villeneuve, L., Hamel, E., Ferland, G. and Thorin, E. (2011a). "Catechin treatment improves cerebrovascular flow-mediated dilation and learning abilities in atherosclerotic mice." *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **300**(3): H1032-1043.
- Drouin, A., Farhat, N., Bolduc, V., Thorin-Trescases, N., Gillis, M. A., Villeneuve, L., Nguyen, A. and Thorin, E. (2011b). "Up-regulation of thromboxane A(2) impairs cerebrovascular eNOS function in aging atherosclerotic mice." *Pflugers Arch* **462**(3): 371-383.
- Drouin, A. and Thorin, E. (2009). "Flow-induced dilation is mediated by Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide in mouse cerebral arteries." *Stroke* **40**(5): 1827-1833.
- Drouin, A., Thorin-Trescases, N., Hamel, E., Falck, J. R. and Thorin, E. (2007). "Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H₂O₂ production in mouse cerebral arteries." *Cardiovasc Res* **73**(1): 73-81.
- Duffy, S. J., Keaney, J. F., Jr., Holbrook, M., Gokce, N., Swerdloff, P. L., Frei, B. and Vita, J. A. (2001). "Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease." *Circulation* **104**(2): 151-156.
- Dumont, P., Leu, J. I., Della Pietra, A. C., 3rd, George, D. L. and Murphy, M. (2003). "The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential." *Nat Genet* **33**(3): 357-365.
- Durrant, J. R., Seals, D. R., Connell, M. L., Russell, M. J., Lawson, B. R., Folian, B. J., Donato, A. J. and Lesniewski, L. A. (2009). "Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase." *J Physiol* **587**(Pt 13): 3271-3285.
- Dusting, G. J., Chapple, D. J., Hughes, R., Moncada, S. and Vane, J. R. (1978a). "Prostacyclin (PGI₂) induces coronary vasodilatation in anaesthetised dogs." *Cardiovasc Res* **12**(12): 720-730.

- Dusting, G. J., Moncada, S., Mullane, K. M. and Vane, J. R. (1978b). "Implications of prostacyclin generation for modulation of vascular tone." Clin Sci Mol Med Suppl **4**: 195s-198s.
- Dusting, G. J., Moncada, S. and Vane, J. R. (1978c). "Vascular actions of arachidonic acid and its metabolites in perfused mesenteric and femoral beds of the dog." Eur J Pharmacol **49**(1): 65-72.
- Edwards, G., Dora, K. A., Gardener, M. J., Garland, C. J. and Weston, A. H. (1998). "K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries." Nature **396**(6708): 269-272.
- Egan, K. M., Lawson, J. A., Fries, S., Koller, B., Rader, D. J., Smyth, E. M. and Fitzgerald, G. A. (2004). "COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice." Science **306**(5703): 1954-1957.
- Egashira, K., Hirooka, Y., Kai, H., Sugimachi, M., Suzuki, S., Inou, T. and Takeshita, A. (1994). "Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia." Circulation **89**(6): 2519-2524.
- Ekelund, U., Luan, J., Sherar, L. B., Esliger, D. W., Griew, P. and Cooper, A. (2012). "Moderate to vigorous physical activity and sedentary time and cardiometabolic risk factors in children and adolescents." JAMA **307**(7): 704-712.
- El Assar, M., Angulo, J., Vallejo, S., Peiro, C., Sanchez-Ferrer, C. F. and Rodriguez-Manas, L. (2012). "Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction." Front Physiol **3**: 132.
- el-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1992). "Definition of a consensus binding site for p53." Nat Genet **1**(1): 45-49.
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell **75**(4): 817-825.
- Elchuri, S., Oberley, T. D., Qi, W., Eisenstein, R. S., Jackson Roberts, L., Van Remmen, H., Epstein, C. J. and Huang, T. T. (2005). "CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life." Oncogene **24**(3): 367-380.
- Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O. and Oren, M. (1989). "Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(22): 8763-8767.
- Ellis, M. H., Baraf, L., Shaish, A., Har-Zahav, A., Harats, D. and Ashur-Fabian, O. (2012). "Alteration of lipids and the transcription of lipid-related genes in myelodysplastic syndromes via a TP53-related pathway." Exp Hematol **40**(7): 540-547 e541.
- Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., Bryant, C. M., White, R. T. and Protter, A. A. (1993). "CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein." J Biol Chem **268**(16): 11811-11816.
- Endres, M., Gertz, K., Lindauer, U., Katchanov, J., Schultze, J., Schrock, H., Nickenig, G., Kuschinsky, W., Dirnagl, U. and Laufs, U. (2003). "Mechanisms of stroke protection by physical activity." Ann Neurol **54**(5): 582-590.
- Engler, M. B., Engler, M. M., Chen, C. Y., Malloy, M. J., Browne, A., Chiu, E. Y., Kwak, H. K., Milbury, P., Paul, S. M., Blumberg, J. and Mietus-Snyder, M. L. (2004). "Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults." J Am Coll Nutr **23**(3): 197-204.

- Enseleit, F., Hurlimann, D. and Luscher, T. F. (2001). "Vascular protective effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and their relation to clinical events." J Cardiovasc Pharmacol **37 Suppl 1**: S21-30.
- Eskurza, I., Kahn, Z. D. and Seals, D. R. (2006). "Xanthine oxidase does not contribute to impaired peripheral conduit artery endothelium-dependent dilatation with ageing." J Physiol **571**(Pt 3): 661-668.
- Eskurza, I., Myerburgh, L. A., Kahn, Z. D. and Seals, D. R. (2005). "Tetrahydrobiopterin augments endothelium-dependent dilatation in sedentary but not in habitually exercising older adults." J Physiol **568**(Pt 3): 1057-1065.
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvado, J., Covas, M. I., Corella, D., Aros, F., Gomez-Gracia, E., Ruiz-Gutierrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventos, R. M., Serra-Majem, L., Pinto, X., Basora, J., Munoz, M. A., Sorli, J. V., Martinez, J. A. and Martinez-Gonzalez, M. A. (2013). "Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet." N Engl J Med **368**(14): 1279-1290.
- Etoh, T., Inoguchi, T., Kakimoto, M., Sonoda, N., Kobayashi, K., Kuroda, J., Sumimoto, H. and Nawata, H. (2003). "Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventional insulin treatment." Diabetologia **46**(10): 1428-1437.
- Fan, J., Unoki, H., Iwasa, S. and Watanabe, T. (2000). "Role of endothelin-1 in atherosclerosis." Ann N Y Acad Sci **902**: 84-93; discussion 93-84.
- Faraci, F. M., Sigmund, C. D., Shesely, E. G., Maeda, N. and Heistad, D. D. (1998). "Responses of carotid artery in mice deficient in expression of the gene for endothelial NO synthase." Am J Physiol **274**(2 Pt 2): H564-570.
- Faraci, F. M., Sobey, C. G., Chrissobolis, S., Lund, D. D., Heistad, D. D. and Weintraub, N. L. (2001). "Arachidonate dilates basilar artery by lipoxygenase-dependent mechanism and activation of K(+) channels." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**(1): R246-253.
- Faraonio, R., Vergara, P., Di Marzo, D., Pierantoni, M. G., Napolitano, M., Russo, T. and Cimino, F. (2006). "p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes." J Biol Chem **281**(52): 39776-39784.
- Farhat, N., Thorin-Trescases, N., Mamarbachi, M., Villeneuve, L., Yu, C., Martel, C., Duquette, N., Gayda, M., Nigam, A., Juneau, M., Allen, B. G. and Thorin, E. (2013). "Angiopoietin-like 2 promotes atherogenesis in mice." J Am Heart Assoc **2**(3): e000201.
- Farhat, N., Thorin-Trescases, N., Voghel, G., Villeneuve, L., Mamarbachi, M., Perrault, L. P., Carrier, M. and Thorin, E. (2008). "Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers." Can J Physiol Pharmacol **86**(11): 761-769.
- Feletou, M. (2011a). The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. San Rafael (CA), Morgan & Claypool Life Sciences Publisher,
- Feletou, M. (2011b). The Endothelium: Part 2: EDHF-Mediated Responses “The Classical Pathway”. San Rafael (CA), Morgan & Claypool Life Sciences Publisher,
- Feletou, M., Huang, Y. and Vanhoutte, P. M. (2011). "Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products." British journal of pharmacology **164**(3): 894-912.
- Feletou, M. and Vanhoutte, P. M. (2006). "Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(6): 1215-1225.

- Feletou, M. and Vanhoutte, P. M. (2009). "EDHF: an update." *Clin Sci (Lond)* **117**(4): 139-155.
- Feng, L., Xia, Y., Garcia, G. E., Hwang, D. and Wilson, C. B. (1995). "Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide." *J Clin Invest* **95**(4): 1669-1675.
- Feng, Z., Hu, W., de Stanchina, E., Teresky, A. K., Jin, S., Lowe, S. and Levine, A. J. (2007a). "The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways." *Cancer Res* **67**(7): 3043-3053.
- Feng, Z., Hu, W., Teresky, A. K., Hernando, E., Cordon-Cardo, C. and Levine, A. J. (2007b). "Declining p53 function in the aging process: a possible mechanism for the increased tumor incidence in older populations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(42): 16633-16638.
- Feng, Z., Zhang, H., Levine, A. J. and Jin, S. (2005). "The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(23): 8204-8209.
- Ferbeyre, G. and Lowe, S. W. (2002). "The price of tumour suppression?" *Nature* **415**(6867): 26-27.
- Ferraz da Costa, D. C., Casanova, F. A., Quarti, J., Malheiros, M. S., Sanches, D., Dos Santos, P. S., Fialho, E. and Silva, J. L. (2012). "Transient transfection of a wild-type p53 gene triggers resveratrol-induced apoptosis in cancer cells." *PLoS One* **7**(11): e48746.
- Ferrucci, L., Corsi, A., Lauretani, F., Bandinelli, S., Bartali, B., Taub, D. D., Guralnik, J. M. and Longo, D. L. (2005). "The origins of age-related proinflammatory state." *Blood* **105**(6): 2294-2299.
- Filaire, E., Rouveix, M., Massart, A., Gladine, C., Davicco, M. J. and Durand, D. (2009). "Lipid peroxidation and antioxidant status in rat: effect of food restriction and wheel running." *Eur J Appl Physiol* **107**(2): 243-250.
- Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." *Nature* **408**(6809): 239-247.
- Finlay, C. A., Hinds, P. W. and Levine, A. J. (1989). "The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation." *Cell* **57**(7): 1083-1093.
- Fisher, N. D., Hughes, M., Gerhard-Herman, M. and Hollenberg, N. K. (2003). "Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans." *J Hypertens* **21**(12): 2281-2286.
- Fisher-Wellman, K. and Bloomer, R. J. (2009). "Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history." *Dyn Med* **8**: 1.
- Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Hermann, C., Busse, R. and Fleming, I. (2000). "Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress." *Acta Physiol Scand* **168**(1): 81-88.
- Fitzpatrick, D. F., Hirschfield, S. L. and Coffey, R. G. (1993). "Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products." *Am J Physiol* **265**(2 Pt 2): H774-778.
- Fledderus, J. O., Boon, R. A., Volger, O. L., Hurttala, H., Yla-Herttuala, S., Pannekoek, H., Levonen, A. L. and Horrevoets, A. J. (2008). "KLF2 primes the antioxidant transcription factor Nrf2 for activation in endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(7): 1339-1346.
- Fleenor, B. S., Seals, D. R., Zigler, M. L. and Sindler, A. L. (2012). "Superoxide-lowering therapy with TEMPOL reverses arterial dysfunction with aging in mice." *Aging Cell* **11**(2): 269-276.

- Fleming, I., Bauersachs, J., Fisslthaler, B. and Busse, R. (1998). "Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress." *Circ Res* **82**(6): 686-695.
- Fleming, I. and Busse, R. (2003). "Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **284**(1): R1-12.
- Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B. E. and Busse, R. (2001). "Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity." *Circ Res* **88**(11): E68-75.
- Folz, R. J. and Crapo, J. D. (1994). "Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene." *Genomics* **22**(1): 162-171.
- Fontana, L., Meyer, T. E., Klein, S. and Holloszy, J. O. (2004). "Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(17): 6659-6663.
- Forstermann, U., Mulsch, A., Bohme, E. and Busse, R. (1986). "Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries." *Circ Res* **58**(4): 531-538.
- Forstermann, U., Pollock, J. S., Schmidt, H. H., Heller, M. and Murad, F. (1991). "Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(5): 1788-1792.
- Forstermann, U. and Sessa, W. C. (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." *Eur Heart J* **33**(7): 829-837, 837a-837d.
- Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E. and De Benedictis, G. (2000). "Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence." *Ann N Y Acad Sci* **908**: 244-254.
- Francia, P., delli Gatti, C., Bachschmid, M., Martin-Padura, I., Savoia, C., Migliaccio, E., Pelicci, P. G., Schiavoni, M., Luscher, T. F., Volpe, M. and Cosentino, F. (2004). "Deletion of p66shc gene protects against age-related endothelial dysfunction." *Circulation* **110**(18): 2889-2895.
- Franco, J. G., Lisboa, P. C., Lima, N. S., Amaral, T. A., Peixoto-Silva, N., Resende, A. C., Oliveira, E., Passos, M. C. and Moura, E. G. (2013). "Resveratrol attenuates oxidative stress and prevents steatosis and hypertension in obese rats programmed by early weaning." *J Nutr Biochem* **24**(6): 960-966.
- Francois, H., Athirakul, K., Mao, L., Rockman, H. and Coffman, T. M. (2004). "Role for thromboxane receptors in angiotensin-II-induced hypertension." *Hypertension* **43**(2): 364-369.
- Francois, H., Makhanova, N., Ruiz, P., Ellison, J., Mao, L., Rockman, H. A. and Coffman, T. M. (2008). "A role for the thromboxane receptor in L-NAME hypertension." *Am J Physiol Renal Physiol* **295**(4): F1096-1102.
- Frangos, J. A., Eskin, S. G., McIntire, L. V. and Ives, C. L. (1985). "Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells." *Science* **227**(4693): 1477-1479.
- Freed-Pastor, W. A., Mizuno, H., Zhao, X., Langerod, A., Moon, S. H., Rodriguez-Barrueco, R., Barsotti, A., Chicas, A., Li, W., Polotskaia, A., Bissell, M. J., Osborne, T. F., Tian, B., Lowe, S. W., Silva, J. M., Borresen-Dale, A. L., Levine, A. J., Bargonetti, J. and Prives, C. (2012). "Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway." *Cell* **148**(1-2): 244-258.

- Fuchs, S. Y., Adler, V., Buschmann, T., Wu, X. and Ronai, Z. (1998). "Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination." *Oncogene* **17**(19): 2543-2547.
- Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A. and Sessa, W. C. (1999). "Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt." *Nature* **399**(6736): 597-601.
- Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." *Nature* **288**(5789): 373-376.
- Gao, X., Zhang, H., Schmidt, A. M. and Zhang, C. (2008). "AGE/RAGE produces endothelial dysfunction in coronary arterioles in type 2 diabetic mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**(2): H491-498.
- Garcia-Calvo, M., Lisnock, J., Bull, H. G., Hawes, B. E., Burnett, D. A., Braun, M. P., Crona, J. H., Davis, H. R., Jr., Dean, D. C., Detmers, P. A., Graziano, M. P., Hughes, M., Macintyre, D. E., Ogawa, A., O'Neill K, A., Iyer, S. P., Shevell, D. E., Smith, M. M., Tang, Y. S., Makarewicz, A. M., Ujjainwalla, F., Altmann, S. W., Chapman, K. T. and Thornberry, N. A. (2005). "The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(23): 8132-8137.
- Garcia-Cao, I., Garcia-Cao, M., Martin-Caballero, J., Criado, L. M., Klatt, P., Flores, J. M., Weill, J. C., Blasco, M. A. and Serrano, M. (2002). ""Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally." *EMBO J* **21**(22): 6225-6235.
- Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A. and Sessa, W. C. (1998). "Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90." *Nature* **392**(6678): 821-824.
- Garg, U. C. and Hassid, A. (1989). "Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells." *J Clin Invest* **83**(5): 1774-1777.
- Gates, P. E., Boucher, M. L., Silver, A. E., Monahan, K. D. and Seals, D. R. (2007). "Impaired flow-mediated dilation with age is not explained by L-arginine bioavailability or endothelial asymmetric dimethylarginine protein expression." *J Appl Physiol* **102**(1): 63-71.
- Gatto, E. M., Riobo, N. A., Carreras, M. C., Chernavsky, A., Rubio, A., Satz, M. L. and Poderoso, J. J. (2000). "Overexpression of neutrophil neuronal nitric oxide synthase in Parkinson's disease." *Nitric Oxide* **4**(5): 534-539.
- Geleijnse, J. M., Giltay, E. J., Grobbee, D. E., Donders, A. R. and Kok, F. J. (2002). "Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials." *J Hypertens* **20**(8): 1493-1499.
- Gems, D. and Partridge, L. (2008). "Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger"." *Cell Metab* **7**(3): 200-203.
- Gendron, M. E., Theoret, J. F., Mamarbachi, A. M., Drouin, A., Nguyen, A., Bolduc, V., Thorin-Trescases, N., Merhi, Y. and Thorin, E. (2010). "Late chronic catechin antioxidant treatment is deleterious to the endothelial function in aging mice with established atherosclerosis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**(6): H2062-2070.
- Gendron, M. E. and Thorin, E. (2007a). "A change in the redox environment and thromboxane A2 production precede endothelial dysfunction in mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**(4): H2508-2515.

- Gendron, M. E., Thorin-Trescases, N., Mamarbachi, A. M., Villeneuve, L., Theoret, J. F., Mehri, Y. and Thorin, E. (2012). "Time-dependent beneficial effect of chronic polyphenol treatment with catechin on endothelial dysfunction in aging mice." Dose-response : a publication of International Hormesis Society **10**(1): 108-119.
- Gendron, M. E., Thorin-Trescases, N., Villeneuve, L. and Thorin, E. (2007b). "Aging associated with mild dyslipidemia reveals that COX-2 preserves dilation despite endothelial dysfunction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(1): H451-458.
- Gerszten, R. E., Garcia-Zepeda, E. A., Lim, Y. C., Yoshida, M., Ding, H. A., Gimbrone, M. A., Jr., Luster, A. D., Lusinskas, F. W. and Rosenzweig, A. (1999). "MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions." Nature **398**(6729): 718-723.
- Gertz, K., Priller, J., Kronenberg, G., Fink, K. B., Winter, B., Schrock, H., Ji, S., Milosevic, M., Harms, C., Bohm, M., Dirnagl, U., Laufs, U. and Endres, M. (2006). "Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow." Circ Res **99**(10): 1132-1140.
- Ginsburg, G. S., Agil, A., O'Toole, M., Rimm, E., Douglas, P. S. and Rifai, N. (1996). "Effects of a single bout of ultraendurance exercise on lipid levels and susceptibility of lipids to peroxidation in triathletes." JAMA **276**(3): 221-225.
- Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., Paolucci, D., Moroni, M., Contursi, C., Pelliccia, G., Luzi, L., Minucci, S., Marcaccio, M., Pinton, P., Rizzuto, R., Bernardi, P., Paolucci, F. and Pelicci, P. G. (2005). "Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis." Cell **122**(2): 221-233.
- Gluais, P., Edwards, G., Weston, A. H., Vanhoutte, P. M. and Feletou, M. (2005a). "Hydrogen peroxide and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery." Eur J Pharmacol **513**(3): 219-224.
- Gluais, P., Lonchamp, M., Morrow, J. D., Vanhoutte, P. M. and Feletou, M. (2005b). "Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin." Br J Pharmacol **146**(6): 834-845.
- Gluais, P., Paysant, J., Badier-Commander, C., Verbeuren, T., Vanhoutte, P. M. and Feletou, M. (2006). "In SHR aorta, calcium ionophore A-23187 releases prostacyclin and thromboxane A2 as endothelium-derived contracting factors." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(5): H2255-2264.
- Gluckman, P. D., Hanson, M. A., Bateson, P., Beedle, A. S., Law, C. M., Bhutta, Z. A., Anokhin, K. V., Bougneres, P., Chandak, G. R., Dasgupta, P., Smith, G. D., Ellison, P. T., Forrester, T. E., Gilbert, S. F., Jablonka, E., Kaplan, H., Prentice, A. M., Simpson, S. J., Uauy, R. and West-Eberhard, M. J. (2009). "Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease." Lancet **373**(9675): 1654-1657.
- Gluckman, P. D., Hanson, M. A., Cooper, C. and Thornburg, K. L. (2008). "Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease." N Engl J Med **359**(1): 61-73.
- Goldstein, I., Ezra, O., Rivlin, N., Molchadsky, A., Madar, S., Goldfinger, N. and Rotter, V. (2012). "p53, a novel regulator of lipid metabolism pathways." J Hepatol **56**(3): 656-662.
- Goldstein, J. L., Hobbs, H. H. and Brown, M. S. (2001). The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease, Chapter 120, McGraw-Hill,
- Gomez-Cabrera, M. C., Borrás, C., Pallardo, F. V., Sastre, J., Ji, L. L. and Vina, J. (2005). "Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful

- cellular adaptations to exercise in rats." The Journal of physiology **567**(Pt 1): 113-120.
- Goodrick, C. L., Ingram, D. K., Reynolds, M. A., Freeman, J. R. and Cider, N. (1990). "Effects of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age." Mech Ageing Dev **55**(1): 69-87.
- Goodwin, B., Jones, S. A., Price, R. R., Watson, M. A., McKee, D. D., Moore, L. B., Galardi, C., Wilson, J. G., Lewis, M. C., Roth, M. E., Maloney, P. R., Willson, T. M. and Kliewer, S. A. (2000). "A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis." Molecular cell **6**(3): 517-526.
- Gorlach, A., Brandes, R. P., Nguyen, K., Amidi, M., Dehghani, F. and Busse, R. (2000). "A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall." Circ Res **87**(1): 26-32.
- Gorman, R. R., Bunting, S. and Miller, O. V. (1977). "Modulation of human platelet adenylate cyclase by prostacyclin (PGX)." Prostaglandins **13**(3): 377-388.
- Goto, M. (2008). "Inflammaging (inflammation + aging): A driving force for human aging based on an evolutionarily antagonistic pleiotropy theory?" Biosci Trends **2**(6): 218-230.
- Gounder, S. S., Kannan, S., Devadoss, D., Miller, C. J., Whitehead, K. S., Odelberg, S. J., Firpo, M. A., Paine, R., 3rd, Hoidal, J. R., Abel, E. D. and Rajasekaran, N. S. (2012). "Impaired transcriptional activity of nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training." PLoS One **7**(9): e45697.
- Gracia-Sancho, J., Villarreal, G., Jr., Zhang, Y. and Garcia-Cardena, G. (2010). "Activation of SIRT1 by resveratrol induces KLF2 expression conferring an endothelial vasoprotective phenotype." Cardiovasc Res **85**(3): 514-519.
- Gragasin, F. S., Xu, Y., Arenas, I. A., Kainth, N. and Davidge, S. T. (2003). "Estrogen reduces angiotensin II-induced nitric oxide synthase and NAD(P)H oxidase expression in endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(1): 38-44.
- Graiani, G., Lagrasta, C., Migliaccio, E., Spillmann, F., Meloni, M., Madeddu, P., Quaini, F., Padura, I. M., Lanfrancone, L., Pelicci, P. and Emanuelli, C. (2005). "Genetic deletion of the p66Shc adaptor protein protects from angiotensin II-induced myocardial damage." Hypertension **46**(2): 433-440.
- Gratton, J. P., Fontana, J., O'Connor, D. S., Garcia-Cardena, G., McCabe, T. J. and Sessa, W. C. (2000). "Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1." J Biol Chem **275**(29): 22268-22272.
- Green, D., O'Driscoll, G., Rankin, J. M., Maiorana, A. J. and Taylor, R. R. (1998). "Beneficial effect of vitamin E administration on nitric oxide function in subjects with hypercholesterolaemia." Clin Sci (Lond) **95**(3): 361-367.
- Green, S. J., Mellouk, S., Hoffman, S. L., Meltzer, M. S. and Nacy, C. A. (1990). "Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes." Immunol Lett **25**(1-3): 15-19.
- Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M. and Harris, C. C. (1994). "Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis." Cancer Res **54**(18): 4855-4878.

- Grigore, L., Raselli, S., Garlaschelli, K., Redaelli, L., Norata, G. D., Pirillo, A. and Catapano, A. L. (2013). "Effect of treatment with pravastatin or ezetimibe on endothelial function in patients with moderate hypercholesterolemia." *Eur J Clin Pharmacol* **69**(3): 341-346.
- Gryglewski, R. J., Dembinska-Kiec, A., Zmuda, A. and Gryglewska, T. (1978). "Prostacyclin and thromboxane A2 biosynthesis capacities of heart, arteries and platelets at various stages of experimental atherosclerosis in rabbits." *Atherosclerosis* **31**(4): 385-394.
- Gu, W. and Roeder, R. G. (1997). "Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain." *Cell* **90**(4): 595-606.
- Guevara, N. V., Kim, H. S., Antonova, E. I. and Chan, L. (1999). "The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo." *Nat Med* **5**(3): 335-339.
- Guo, Z., Mitchell-Raymundo, F., Yang, H., Ikeno, Y., Nelson, J., Diaz, V., Richardson, A. and Reddick, R. (2002). "Dietary restriction reduces atherosclerosis and oxidative stress in the aorta of apolipoprotein E-deficient mice." *Mech Ageing Dev* **123**(8): 1121-1131.
- Guo, Z. M., Yang, H., Hamilton, M. L., VanRemmen, H. and Richardson, A. (2001). "Effects of age and food restriction on oxidative DNA damage and antioxidant enzyme activities in the mouse aorta." *Mech Ageing Dev* **122**(15): 1771-1786.
- Guyton, A. C. and Hall, J. E. (2006). *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia, Elsevier Saunders,
- Hadi, H. A. and Suwaidi, J. A. (2007). "Endothelial dysfunction in diabetes mellitus." *Vasc Health Risk Manag* **3**(6): 853-876.
- Haffner, S. M., Lehto, S., Ronnema, T., Pyorala, K. and Laakso, M. (1998). "Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction." *N Engl J Med* **339**(4): 229-234.
- Hajra, L., Evans, A. I., Chen, M., Hyduk, S. J., Collins, T. and Cybulsky, M. I. (2000). "The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 9052-9057.
- Halcox, J. P., Nour, K. R., Zalos, G. and Quyyumi, A. A. (2001). "Coronary vasodilation and improvement in endothelial dysfunction with endothelin ET(A) receptor blockade." *Circ Res* **89**(11): 969-976.
- Halcox, J. P., Schenke, W. H., Zalos, G., Mincemoyer, R., Prasad, A., Waclawiw, M. A., Nour, K. R. and Quyyumi, A. A. (2002). "Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction." *Circulation* **106**(6): 653-658.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press,
- Hamburg, N. M., Larson, M. G., Vita, J. A., Vasan, R. S., Keyes, M. J., Widlansky, M. E., Fox, C. S., Mitchell, G. F., Levy, D., Meigs, J. B. and Benjamin, E. J. (2008). "Metabolic syndrome, insulin resistance, and brachial artery vasodilator function in Framingham Offspring participants without clinical evidence of cardiovascular disease." *Am J Cardiol* **101**(1): 82-88.
- Hamburg, N. M., McMackin, C. J., Huang, A. L., Shenouda, S. M., Widlansky, M. E., Schulz, E., Gokce, N., Ruderman, N. B., Keaney, J. F., Jr. and Vita, J. A. (2007). "Physical inactivity rapidly induces insulin resistance and microvascular dysfunction in healthy volunteers." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(12): 2650-2656.

- Hamilton, C. A., Brosnan, M. J., McIntyre, M., Graham, D. and Dominiczak, A. F. (2001). "Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction." *Hypertension* **37**(2 Part 2): 529-534.
- Hamilton, C. A., Miller, W. H., Al-Benna, S., Brosnan, M. J., Drummond, R. D., McBride, M. W. and Dominiczak, A. F. (2004). "Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease." *Clin Sci (Lond)* **106**(3): 219-234.
- Harada, N., Ito, K., Hosoya, T., Mimura, J., Maruyama, A., Noguchi, N., Yagami, K. I., Morito, N., Takahashi, S., Maher, J. M., Yamamoto, M. and Itoh, K. (2012). "Nrf2 in bone marrow-derived cells positively contributes to the advanced stage of atherosclerotic plaque formation." *Free Radic Biol Med* **53**(12): 2256-2262.
- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." *J Gerontol* **11**(3): 298-300.
- Harman, D. (1972). "The biologic clock: the mitochondria?" *J Am Geriatr Soc* **20**(4): 145-147.
- Harman, D. (1983). "Free radical theory of aging: Consequences of mitochondrial aging." *AGE* **6**(3): 86-94.
- Harman, D. (2006). "Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span." *Ann N Y Acad Sci* **1067**: 10-21.
- Harvey, M., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., Bradley, A. and Donehower, L. A. (1993). "Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice." *Nat Genet* **5**(3): 225-229.
- Hasdai, D., Holmes, D. R., Jr., Garratt, K. N., Edwards, W. D. and Lerman, A. (1997a). "Mechanical pressure and stretch release endothelin-1 from human atherosclerotic coronary arteries in vivo." *Circulation* **95**(2): 357-362.
- Hasdai, D., Mathew, V., Schwartz, R. S., Smith, L. A., Holmes, D. R., Jr., Katusic, Z. S. and Lerman, A. (1997b). "Enhanced endothelin-B-receptor-mediated vasoconstriction of small porcine coronary arteries in diet-induced hypercholesterolemia." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(11): 2737-2743.
- Hashimoto, M., Kim, S., Eto, M., Iijima, K., Ako, J., Yoshizumi, M., Akishita, M., Kondo, K., Itakura, H., Hosoda, K., Toba, K. and Ouchi, Y. (2001). "Effect of acute intake of red wine on flow-mediated vasodilatation of the brachial artery." *Am J Cardiol* **88**(12): 1457-1460, A1459.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. and Haupt, Y. (2003). "Apoptosis - the p53 network." *J Cell Sci* **116**(Pt 20): 4077-4085.
- Hayflick, L. (2007). "Biological aging is no longer an unsolved problem." *Ann N Y Acad Sci* **1100**: 1-13.
- He, K., Song, Y., Davi, G. L., Liu, K., Van Horn, L., Dyer, A. R. and Greenland, P. (2004). "Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies." *Circulation* **109**(22): 2705-2711.
- Heilbronn, L. K., de Jonge, L., Frisard, M. I., DeLany, J. P., Larson-Meyer, D. E., Rood, J., Nguyen, T., Martin, C. K., Volaufova, J., Most, M. M., Greenway, F. L., Smith, S. R., Deutsch, W. A., Williamson, D. A. and Ravussin, E. (2006). "Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial." *JAMA* **295**(13): 1539-1548.
- Heitzer, T., Finckh, B., Albers, S., Krohn, K., Kohlschütter, A. and Meinertz, T. (2001a). "Beneficial effects of alpha-lipoic acid and ascorbic acid on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in diabetic patients: relation to parameters of oxidative stress." *Free Radic Biol Med* **31**(1): 53-61.

- Heitzer, T., Just, H. and Munzel, T. (1996). "Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers." *Circulation* **94**(1): 6-9.
- Heitzer, T., Krohn, K., Albers, S. and Meinertz, T. (2000). "Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus." *Diabetologia* **43**(11): 1435-1438.
- Heitzer, T., Schlinzig, T., Krohn, K., Meinertz, T. and Munzel, T. (2001b). "Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease." *Circulation* **104**(22): 2673-2678.
- Heitzer, T., Yla Herttuala, S., Wild, E., Luoma, J. and Drexler, H. (1999). "Effect of vitamin E on endothelial vasodilator function in patients with hypercholesterolemia, chronic smoking or both." *J Am Coll Cardiol* **33**(2): 499-505.
- Helenius, M., Hanninen, M., Lehtinen, S. K. and Salminen, A. (1996). "Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF-kB transcription factor in mouse cardiac muscle." *J Mol Cell Cardiol* **28**(3): 487-498.
- Heller, R., Unbehauen, A., Schellenberg, B., Mayer, B., Werner-Felmayer, G. and Werner, E. R. (2001). "L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin." *J Biol Chem* **276**(1): 40-47.
- Helton, E. S. and Chen, X. (2007). "p53 modulation of the DNA damage response." *J Cell Biochem* **100**(4): 883-896.
- Heo, K. S., Chang, E., Le, N. T., Cushman, H., Yeh, E. T., Fujiwara, K. and Abe, J. (2013). "De-SUMOylation enzyme of sentrin/SUMO-specific protease 2 regulates disturbed flow-induced SUMOylation of ERK5 and p53 that leads to endothelial dysfunction and atherosclerosis." *Circ Res* **112**(6): 911-923.
- Heo, K. S., Fujiwara, K. and Abe, J. (2011a). "Disturbed-flow-mediated vascular reactive oxygen species induce endothelial dysfunction." *Circ J* **75**(12): 2722-2730.
- Heo, K. S., Lee, H., Nigro, P., Thomas, T., Le, N. T., Chang, E., McClain, C., Reinhart-King, C. A., King, M. R., Berk, B. C., Fujiwara, K., Woo, C. H. and Abe, J. (2011b). "PKCzeta mediates disturbed flow-induced endothelial apoptosis via p53 SUMOylation." *J Cell Biol* **193**(5): 867-884.
- Hertog, M. G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S. and et al. (1995). "Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study." *Arch Intern Med* **155**(4): 381-386.
- Heymes, C., Habib, A., Yang, D., Mathieu, E., Marotte, F., Samuel, J. and Boulanger, C. M. (2000). "Cyclo-oxygenase-1 and -2 contribution to endothelial dysfunction in ageing." *Br J Pharmacol* **131**(4): 804-810.
- Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M. and Kihara, Y. (2009). "Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases." *Circ J* **73**(3): 411-418.
- Higashi, Y., Sasaki, S., Nakagawa, K., Kimura, M., Noma, K., Hara, K., Jitsuiki, D., Goto, C., Oshima, T., Chayama, K. and Yoshizumi, M. (2006). "Tetrahydrobiopterin improves aging-related impairment of endothelium-dependent vasodilation through increase in nitric oxide production." *Atherosclerosis* **186**(2): 390-395.
- Higgins, P., Dawson, J., Lees, K. R., McArthur, K., Quinn, T. J. and Walters, M. R. (2012). "Xanthine oxidase inhibition for the treatment of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis." *Cardiovasc Ther* **30**(4): 217-226.
- Hinds, P., Finlay, C. and Levine, A. J. (1989). "Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation." *J Virol* **63**(2): 739-746.

- Hinkal, G. W., Gatza, C. E., Parikh, N. and Donehower, L. A. (2009). "Altered senescence, apoptosis, and DNA damage response in a mutant p53 model of accelerated aging." Mech Ageing Dev **130**(4): 262-271.
- Ho, Y. S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A. and Ho, D. S. (2004). "Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury." J Biol Chem **279**(31): 32804-32812.
- Hogg, N., Kalyanaraman, B., Joseph, J., Struck, A. and Parthasarathy, S. (1993). "Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis." FEBS Lett **334**(2): 170-174.
- Hogikyan, R. V., Galecki, A. T., Pitt, B., Halter, J. B., Greene, D. A. and Supiano, M. A. (1998). "Specific impairment of endothelium-dependent vasodilation in subjects with type 2 diabetes independent of obesity." J Clin Endocrinol Metab **83**(6): 1946-1952.
- Holliday, R. (2006). "Aging is no longer an unsolved problem in biology." Ann N Y Acad Sci **1067**: 1-9.
- Holly, A. C., Melzer, D., Pilling, L. C., Henley, W., Hernandez, D. G., Singleton, A. B., Bandinelli, S., Guralnik, J. M., Ferrucci, L. and Harries, L. W. (2013). "Towards a gene expression biomarker set for human biological age." Ageing Cell **12**(2): 324-326.
- Holowatz, L. A., Thompson, C. S. and Kenney, W. L. (2006). "L-Arginine supplementation or arginase inhibition augments reflex cutaneous vasodilatation in aged human skin." J Physiol **574**(Pt 2): 573-581.
- Holscher, C. and Rose, S. P. (1993). "Inhibiting synthesis of the putative retrograde messenger nitric oxide results in amnesia in a passive avoidance task in the chick." Brain Res **619**(1-2): 189-194.
- Honda, R., Tanaka, H. and Yasuda, H. (1997). "Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53." FEBS Lett **420**(1): 25-27.
- Hong, H. J., Loh, S. H. and Yen, M. H. (2000). "Suppression of the development of hypertension by the inhibitor of inducible nitric oxide synthase." Br J Pharmacol **131**(3): 631-637.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (2002). "SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver." J Clin Invest **109**(9): 1125-1131.
- Hosoya, T., Maruyama, A., Kang, M. I., Kawatani, Y., Shibata, T., Uchida, K., Warabi, E., Noguchi, N., Itoh, K. and Yamamoto, M. (2005). "Differential responses of the Nrf2-Keap1 system to laminar and oscillatory shear stresses in endothelial cells." J Biol Chem **280**(29): 27244-27250.
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L. L., Scherer, B. and Sinclair, D. A. (2003). "Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan." Nature **425**(6954): 191-196.
- Hsieh, T. C., Wang, Z., Hamby, C. V. and Wu, J. M. (2005). "Inhibition of melanoma cell proliferation by resveratrol is correlated with upregulation of quinone reductase 2 and p53." Biochem Biophys Res Commun **334**(1): 223-230.
- Hu, W., Zhang, C., Wu, R., Sun, Y., Levine, A. and Feng, Z. (2010). "Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(16): 7455-7460.
- Huang, A., Vita, J. A., Venema, R. C. and Keane, J. F., Jr. (2000). "Ascorbic acid enhances endothelial nitric-oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin." J Biol Chem **275**(23): 17399-17406.

- Huang, C., Ma, W. Y., Goranson, A. and Dong, Z. (1999). "Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway." Carcinogenesis **20**(2): 237-242.
- Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K. D., Moskowitz, M. A., Bevan, J. A. and Fishman, M. C. (1995). "Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase." Nature **377**(6546): 239-242.
- Humpert, P. M., Djuric, Z., Zeuge, U., Oikonomou, D., Seregin, Y., Laine, K., Eckstein, V., Nawroth, P. P. and Bierhaus, A. (2008). "Insulin stimulates the clonogenic potential of angiogenic endothelial progenitor cells by IGF-1 receptor-dependent signaling." Mol Med **14**(5-6): 301-308.
- Huo, Y., Weber, C., Forlow, S. B., Sperandio, M., Thatte, J., Mack, M., Jung, S., Littman, D. R. and Ley, K. (2001). "The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium." The Journal of clinical investigation **108**(9): 1307-1314.
- Hupp, T. R. and Lane, D. P. (1994). "Allosteric activation of latent p53 tetramers." Curr Biol **4**(10): 865-875.
- Hursting, S. D., Perkins, S. N. and Phang, J. M. (1994). "Calorie restriction delays spontaneous tumorigenesis in p53-knockout transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): 7036-7040.
- Hussain, S. P., Amstad, P., He, P., Robles, A., Lupold, S., Kaneko, I., Ichimiya, M., Sengupta, S., Mechanic, L., Okamura, S., Hofseth, L. J., Moake, M., Nagashima, M., Forrester, K. S. and Harris, C. C. (2004). "p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis." Cancer Res **64**(7): 2350-2356.
- Hwang, I. C., Kim, K. H., Choi, W. S., Kim, H. J., Im, M. S., Kim, Y. J., Kim, S. H., Kim, M. A., Sohn, D. W. and Zo, J. H. (2012). "Impact of acute exercise on brachial artery flow-mediated dilatation in young healthy people." Cardiovasc Ultrasound **10**: 39.
- Hyun, D. H., Emerson, S. S., Jo, D. G., Mattson, M. P. and de Cabo, R. (2006). "Calorie restriction up-regulates the plasma membrane redox system in brain cells and suppresses oxidative stress during aging." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(52): 19908-19912.
- Ibarra, M., Lopez-Guerrero, J. J., Mejia-Zepeda, R. and Villalobos-Molina, R. (2006). "Endothelium-dependent inhibition of the contractile response is decreased in aorta from aged and spontaneously hypertensive rats." Arch Med Res **37**(3): 334-341.
- Ide, T., Brown-Endres, L., Chu, K., Ongusaha, P. P., Ohtsuka, T., El-Deiry, W. S., Aaronson, S. A. and Lee, S. W. (2009). "GAMT, a p53-inducible modulator of apoptosis, is critical for the adaptive response to nutrient stress." Mol Cell **36**(3): 379-392.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wei, L. H., Bauer, P. M., Wu, G. and del Soldato, P. (2001). "Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 4202-4208.
- Ihling, C., Haendeler, J., Menzel, G., Hess, R. D., Fraedrich, G., Schaefer, H. E. and Zeiher, A. M. (1998). "Co-expression of p53 and MDM2 in human atherosclerosis: implications for the regulation of cellularity of atherosclerotic lesions." J Pathol **185**(3): 303-312.
- Indrayan, A. (2005). Forecasting vascular disease cases and associated mortality in India. G. o. I. National Commission on Macroeconomics and Health. New Delhi, India: 197-215.

- Ingram, D. K. and Roth, G. S. (2011). "Glycolytic inhibition as a strategy for developing calorie restriction mimetics." *Exp Gerontol* **46**(2-3): 148-154.
- Inoki, K., Zhu, T. and Guan, K. L. (2003). "TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival." *Cell* **115**(5): 577-590.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyachi, T., Goto, K. and Masaki, T. (1989). "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(8): 2863-2867.
- Inoue, T., Komoda, H., Nonaka, M., Kameda, M., Uchida, T. and Node, K. (2008). "Interleukin-8 as an independent predictor of long-term clinical outcome in patients with coronary artery disease." *Int J Cardiol* **124**(3): 319-325.
- Insull, W., Jr. (2006). "Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review." *Southern medical journal* **99**(3): 257-273.
- Ishida, S., Hamasaki, S., Kamekou, M., Yoshitama, T., Nakano, F., Yoshikawa, A., Kataoka, T., Saihara, K., Minagoe, S. and Tei, C. (2003). "Advancing age is associated with diminished vascular remodeling and impaired vasodilation in resistance coronary arteries." *Coron Artery Dis* **14**(6): 443-449.
- Ishii, K., Zhen, L. X., Wang, D. H., Funamori, Y., Ogawa, K. and Taketa, K. (1996). "Prevention of mammary tumorigenesis in acatalasemic mice by vitamin E supplementation." *Jpn J Cancer Res* **87**(7): 680-684.
- Ishii, T., Itoh, K., Ruiz, E., Leake, D. S., Unoki, H., Yamamoto, M. and Mann, G. E. (2004). "Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal." *Circ Res* **94**(5): 609-616.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D. and Yamamoto, M. (1999). "Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain." *Genes Dev* **13**(1): 76-86.
- Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T. and Weinberg, R. A. (1994). "Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice." *Curr Biol* **4**(1): 1-7.
- Jacks, T. and Weinberg, R. A. (1996). "Cell-cycle control and its watchman." *Nature* **381**(6584): 643-644.
- Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R. and Mangelsdorf, D. J. (1996). "An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha." *Nature* **383**(6602): 728-731.
- Jedrzejewski, M. K., Ewbank, D. C., Wang, H. and Trojanowski, J. Q. (2010). "Exercise and cognition: results from the National Long Term Care Survey." *Alzheimers Dement* **6**(6): 448-455.
- Jenkins, J. R., Rudge, K. and Currie, G. A. (1984). "Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53." *Nature* **312**(5995): 651-654.
- Jenkins, N. T., Padilla, J., Arce-Esquivel, A. A., Bayless, D. S., Martin, J. S., Leidy, H. J., Booth, F. W., Rector, R. S. and Laughlin, M. H. (2012). "Effects of endurance exercise training, metformin, and their combination on adipose tissue leptin and IL-10 secretion in OLETF rats." *J Appl Physiol* (1985) **113**(12): 1873-1883.
- Jerez, S., Sierra, L., Coviello, A. and de Bruno, M. P. (2008). "Endothelial dysfunction and improvement of the angiotensin II-reactivity in hypercholesterolemic rabbits: role of cyclooxygenase metabolites." *Eur J Pharmacol* **580**(1-2): 182-189.

- Jiang, J. C., Jaruga, E., Repnevskaya, M. V. and Jazwinski, S. M. (2000). "An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast." *FASEB J* **14**(14): 2135-2137.
- Jones, R. G., Plas, D. R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M. J. and Thompson, C. B. (2005). "AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint." *Mol Cell* **18**(3): 283-293.
- Jones, S. N., Roe, A. E., Donehower, L. A. and Bradley, A. (1995). "Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53." *Nature* **378**(6553): 206-208.
- Judkins, C. P., Diep, H., Broughton, B. R., Mast, A. E., Hooker, E. U., Miller, A. A., Selemidis, S., Dusting, G. J., Sobey, C. G. and Drummond, G. R. (2010). "Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**(1): H24-32.
- Jung, O., Schreiber, J. G., Geiger, H., Pedrazzini, T., Busse, R. and Brandes, R. P. (2004). "gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension." *Circulation* **109**(14): 1795-1801.
- Kaeberlein, M., McDonagh, T., Heltweg, B., Hixon, J., Westman, E. A., Caldwell, S. D., Napper, A., Curtis, R., DiStefano, P. S., Fields, S., Bedalov, A. and Kennedy, B. K. (2005). "Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol." *J Biol Chem* **280**(17): 17038-17045.
- Kania, D. M., Binkley, N., Checovich, M., Havighurst, T., Schilling, M. and Ershler, W. B. (1995). "Elevated plasma levels of interleukin-6 in postmenopausal women do not correlate with bone density." *J Am Geriatr Soc* **43**(3): 236-239.
- Kanter, M. M., Lesmes, G. R., Kaminsky, L. A., La Ham-Saeger, J. and Nequin, N. D. (1988). "Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race. Relationship to lipid peroxidation." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **57**(1): 60-63.
- Karasu, C., Ozansoy, G., Bozkurt, O., Erdogan, D. and Omeroglu, S. (1997). "Antioxidant and triglyceride-lowering effects of vitamin E associated with the prevention of abnormalities in the reactivity and morphology of aorta from streptozotocin-diabetic rats. Antioxidants in Diabetes-Induced Complications (ADIC) Study Group." *Metabolism* **46**(8): 872-879.
- Karatzis, K., Papamichael, C., Aznaouridis, K., Karatzis, E., Lekakis, J., Matsouka, C., Boskou, G., Chiou, A., Sitara, M., Feliou, G., Kontoyiannis, D., Zampelas, A. and Mavrikakis, M. (2004). "Constituents of red wine other than alcohol improve endothelial function in patients with coronary artery disease." *Coron Artery Dis* **15**(8): 485-490.
- Karim, M., McCormick, K. and Kappagoda, C. T. (2000). "Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation." *J Nutr* **130**(8S Suppl): 2105S-2108S.
- Kastman, E. K., Willette, A. A., Coe, C. L., Bendlin, B. B., Kosmatka, K. J., McLaren, D. G., Xu, G., Canu, E., Field, A. S., Alexander, A. L., Voytko, M. L., Beasley, T. M., Colman, R. J., Weindruch, R. H. and Johnson, S. C. (2010). "A calorie-restricted diet decreases brain iron accumulation and preserves motor performance in old rhesus monkeys." *J Neurosci* **30**(23): 7940-7947.
- Katsiki, N. and Manes, C. (2009). "Is there a role for supplemented antioxidants in the prevention of atherosclerosis?" *Clinical nutrition* **28**(1): 3-9.
- Katsimpardi, L., Litterman, N. K., Schein, P. A., Miller, C. M., Loffredo, F. S., Wojtkiewicz, G. R., Chen, J. W., Lee, R. T., Wagers, A. J. and Rubin, L. L. (2014). "Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors." *Science* **344**(6184): 630-634.

- Kawauchi, K., Araki, K., Tobiume, K. and Tanaka, N. (2008). "p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation." Nat Cell Biol **10**(5): 611-618.
- Kawka, D. W., Ouellet, M., Hetu, P. O., Singer, II and Riendeau, D. (2007). "Double-label expression studies of prostacyclin synthase, thromboxane synthase and COX isoforms in normal aortic endothelium." Biochim Biophys Acta **1771**(1): 45-54.
- Keaney, J. F., Jr., Gaziano, J. M., Xu, A., Frei, B., Curran-Celentano, J., Shwaery, G. T., Loscalzo, J. and Vita, J. A. (1993). "Dietary antioxidants preserve endothelium-dependent vessel relaxation in cholesterol-fed rabbits." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 11880-11884.
- Keller, E. T., Chang, C. and Ershler, W. B. (1996). "Inhibition of NFkappaB activity through maintenance of IkappaBalpha levels contributes to dihydrotestosterone-mediated repression of the interleukin-6 promoter." J Biol Chem **271**(42): 26267-26275.
- Kemnitz, J. W., Roecker, E. B., Weindruch, R., Elson, D. F., Baum, S. T. and Bergman, R. N. (1994). "Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys." Am J Physiol **266**(4 Pt 1): E540-547.
- Kerr, S., Brosnan, M. J., McIntyre, M., Reid, J. L., Dominiczak, A. F. and Hamilton, C. A. (1999). "Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium." Hypertension **33**(6): 1353-1358.
- Ketonen, J., Pilvi, T. and Mervaala, E. (2010). "Caloric restriction reverses high-fat diet-induced endothelial dysfunction and vascular superoxide production in C57Bl/6 mice." Heart Vessels **25**(3): 254-262.
- Keung, W., Ussher, J. R., Jaswal, J. S., Raubenheimer, M., Lam, V. H., Wagg, C. S. and Lopaschuk, G. D. (2013). "Inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1 activity alleviates insulin resistance in diet-induced obese mice." Diabetes **62**(3): 711-720.
- Khan, B. V., Harrison, D. G., Olbrych, M. T., Alexander, R. W. and Medford, R. M. (1996). "Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(17): 9114-9119.
- Khoury, M. P. and Bourdon, J. C. (2010). "The isoforms of the p53 protein." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(3): a000927.
- Kielstein, J. T., Bode-Boger, S. M., Frolich, J. C., Ritz, E., Haller, H. and Fliser, D. (2003). "Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects." Circulation **107**(14): 1891-1895.
- Kim, C. S., Jung, S. B., Naqvi, A., Hoffman, T. A., DeRicco, J., Yamamori, T., Cole, M. P., Jeon, B. H. and Irani, K. (2008). "p53 impairs endothelium-dependent vasomotor function through transcriptional upregulation of p66shc." Circ Res **103**(12): 1441-1450.
- Kim, D. H., Kim, J. and Lee, J. W. (2011a). "Requirement for MLL3 in p53 regulation of hepatic expression of small heterodimer partner and bile acid homeostasis." Molecular endocrinology **25**(12): 2076-2083.
- Kim, D. H. and Lee, J. W. (2011b). "Tumor suppressor p53 regulates bile acid homeostasis via small heterodimer partner." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(30): 12266-12270.
- Kim, J. H., Bugaj, L. J., Oh, Y. J., Bivalacqua, T. J., Ryoo, S., Soucy, K. G., Santhanam, L., Webb, A., Camara, A., Sikka, G., Nyhan, D., Shoukas, A. A., Ilies, M., Christianson, D. W., Champion, H. C. and Berkowitz, D. E. (2009). "Arginase

- inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats." *J Appl Physiol* **107**(4): 1249-1257.
- Kirkwood, T. B. (2005). "Understanding the odd science of aging." *Cell* **120**(4): 437-447.
- Kishimoto, C., Shioji, K., Nakamura, H., Nakayama, Y., Yodoi, J. and Sasayama, S. (2001). "Serum thioredoxin (TRX) levels in patients with heart failure." *Jpn Circ J* **65**(6): 491-494.
- Klipstein-Grobusch, K., Geleijnse, J. M., den Breeijen, J. H., Boeing, H., Hofman, A., Grobbee, D. E. and Witteman, J. C. (1999). "Dietary antioxidants and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study." *Am J Clin Nutr* **69**(2): 261-266.
- Knekt, P., Reunanen, A., Jarvinen, R., Seppanen, R., Heliovaara, M. and Aromaa, A. (1994). "Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study." *Am J Epidemiol* **139**(12): 1180-1189.
- Knowles, J. W., Reddick, R. L., Jennette, J. C., Shesely, E. G., Smithies, O. and Maeda, N. (2000). "Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment." *J Clin Invest* **105**(4): 451-458.
- Knowles, R. G., Palacios, M., Palmer, R. M. and Moncada, S. (1989). "Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(13): 5159-5162.
- Kobayashi, T., Tahara, Y., Matsumoto, M., Iguchi, M., Sano, H., Murayama, T., Arai, H., Oida, H., Yurugi-Kobayashi, T., Yamashita, J. K., Katagiri, H., Majima, M., Yokode, M., Kita, T. and Narumiya, S. (2004). "Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice." *J Clin Invest* **114**(6): 784-794.
- Koenig, W., Sund, M., Frohlich, M., Fischer, H. G., Lowel, H., Doring, A., Hutchinson, W. L. and Pepys, M. B. (1999). "C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992." *Circulation* **99**(2): 237-242.
- Koga, T., Takata, Y., Kobayashi, K., Takishita, S., Yamashita, Y. and Fujishima, M. (1989). "Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the rat." *Hypertension* **14**(5): 542-548.
- Komarov, P. G., Komarova, E. A., Kondratov, R. V., Christov-Tselkov, K., Coon, J. S., Chernov, M. V. and Gudkov, A. V. (1999). "A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy." *Science* **285**(5434): 1733-1737.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R. and May, P. (1979). "Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum." *J Virol* **31**(2): 472-483.
- Kris-Etherton, P. M., Lichtenstein, A. H., Howard, B. V., Steinberg, D. and Witztum, J. L. (2004). "Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease." *Circulation* **110**(5): 637-641.
- Kritchevsky, S. B., Cesari, M. and Pahor, M. (2005). "Inflammatory markers and cardiovascular health in older adults." *Cardiovasc Res* **66**(2): 265-275.
- Krummen, S., Drouin, A., Gendron, M. E., Falck, J. R. and Thorin, E. (2006). "ROS-sensitive cytochrome P450 activity maintains endothelial dilatation in ageing but is transitory in dyslipidaemic mice." *British journal of pharmacology* **147**(8): 897-904.

- Krummen, S., Falck, J. R. and Thorin, E. (2005). "Two distinct pathways account for EDHF-dependent dilatation in the gracilis artery of dyslipidaemic hApoB^{+/+} mice." *British journal of pharmacology* **145**(2): 264-270.
- Ku, H. H., Brunk, U. T. and Sohal, R. S. (1993a). "Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species." *Free Radic Biol Med* **15**(6): 621-627.
- Ku, H. H. and Sohal, R. S. (1993b). "Comparison of mitochondrial pro-oxidant generation and anti-oxidant defenses between rat and pigeon: possible basis of variation in longevity and metabolic potential." *Mech Ageing Dev* **72**(1): 67-76.
- Kubes, P., Suzuki, M. and Granger, D. N. (1991). "Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(11): 4651-4655.
- Kuchan, M. J. and Frangos, J. A. (1994). "Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells." *Am J Physiol* **266**(3 Pt 1): C628-636.
- Kuhlencordt, P. J., Gyurko, R., Han, F., Scherrer-Crosbie, M., Aretz, T. H., Hajjar, R., Picard, M. H. and Huang, P. L. (2001). "Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice." *Circulation* **104**(4): 448-454.
- Kukovetz, W. R., Holzmann, S., Wurm, A. and Poch, G. (1979). "Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries." *J Cyclic Nucleotide Res* **5**(6): 469-476.
- Kumar, A., Hoffman, T. A., Dericco, J., Naqvi, A., Jain, M. K. and Irani, K. (2009). "Transcriptional repression of Kruppel like factor-2 by the adaptor protein p66shc." *FASEB J* **23**(12): 4344-4352.
- Kumar, A., Kim, C. S., Hoffman, T. A., Naqvi, A., Dericco, J., Jung, S. B., Lin, Z., Jain, M. K. and Irani, K. (2011). "p53 impairs endothelial function by transcriptionally repressing Kruppel-Like Factor 2." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **31**(1): 133-141.
- Kuribayashi, K., Krigsfeld, G., Wang, W., Xu, J., Mayes, P. A., Dicker, D. T., Wu, G. S. and El-Deiry, W. S. (2008). "TNFSF10 (TRAIL), a p53 target gene that mediates p53-dependent cell death." *Cancer Biol Ther* **7**(12): 2034-2038.
- Kushi, L. H., Folsom, A. R., Prineas, R. J., Mink, P. J., Wu, Y. and Bostick, R. M. (1996). "Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women." *N Engl J Med* **334**(18): 1156-1162.
- Labinskyy, N., Csiszar, A., Orosz, Z., Smith, K., Rivera, A., Buffenstein, R. and Ungvari, Z. (2006). "Comparison of endothelial function, O₂⁻ and H₂O₂ production, and vascular oxidative stress resistance between the longest-living rodent, the naked mole rat, and mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**(6): H2698-2704.
- Ladurner, A., Schmitt, C. A., Schachner, D., Atanasov, A. G., Werner, E. R., Dirsch, V. M. and Heiss, E. H. (2012). "Ascorbate stimulates endothelial nitric oxide synthase enzyme activity by rapid modulation of its phosphorylation status." *Free Radic Biol Med* **52**(10): 2082-2090.
- Lakatta, E. G. (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging." *Circulation* **107**(3): 490-497.
- Lakatta, E. G. and Levy, D. (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease." *Circulation* **107**(1): 139-146.
- Lakowski, B. and Hekimi, S. (1998). "The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22): 13091-13096.

- Landmesser, U., Cai, H., Dikalov, S., McCann, L., Hwang, J., Jo, H., Holland, S. M. and Harrison, D. G. (2002). "Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II." *Hypertension* **40**(4): 511-515.
- Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S. R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S. M., Mitch, W. E. and Harrison, D. G. (2003). "Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension." *J Clin Invest* **111**(8): 1201-1209.
- Landmesser, U., Hornig, B. and Drexler, H. (2004). "Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?" *Circulation* **109**(21 Suppl 1): II27-33.
- Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." *Nature* **358**(6381): 15-16.
- Lane, D. P. and Crawford, L. V. (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." *Nature* **278**(5701): 261-263.
- Lapointe, J. and Hekimi, S. (2010). "When a theory of aging ages badly." *Cell Mol Life Sci* **67**(1): 1-8.
- Larson-Meyer, D. E., Heilbronn, L. K., Redman, L. M., Newcomer, B. R., Frisard, M. I., Anton, S., Smith, S. R., Alfonso, A. and Ravussin, E. (2006). "Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta-cell function, fat cell size, and ectopic lipid in overweight subjects." *Diabetes Care* **29**(6): 1337-1344.
- Lassegue, B., San Martin, A. and Griendling, K. K. (2012). "Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system." *Circ Res* **110**(10): 1364-1390.
- Laufs, U., Wassmann, S., Czech, T., Munzel, T., Eisenhauer, M., Bohm, M. and Nickenig, G. (2005). "Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(4): 809-814.
- Laurin, D., Verreault, R., Lindsay, J., MacPherson, K. and Rockwood, K. (2001). "Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons." *Arch Neurol* **58**(3): 498-504.
- Laursen, J. B., Somers, M., Kurz, S., McCann, L., Warnholtz, A., Freeman, B. A., Tarpey, M., Fukai, T. and Harrison, D. G. (2001). "Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin." *Circulation* **103**(9): 1282-1288.
- Law, M. R., Wald, N. J. and Rudnicka, A. R. (2003). "Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis." *Bmj* **326**(7404): 1423.
- Lawler, O. A., Miggin, S. M. and Kinsella, B. T. (2001). "Protein kinase A-mediated phosphorylation of serine 357 of the mouse prostacyclin receptor regulates its coupling to G(s)-, to G(i)-, and to G(q)-coupled effector signaling." *J Biol Chem* **276**(36): 33596-33607.
- Laye, M. J., Rector, R. S., Borengasser, S. J., Naples, S. P., Uptergrove, G. M., Ibdah, J. A., Booth, F. W. and Thyfault, J. P. (2009). "Cessation of daily wheel running differentially alters fat oxidation capacity in liver, muscle, and adipose tissue." *J Appl Physiol* **106**(1): 161-168.
- Lebel, M., Massip, L., Garand, C. and Thorin, E. (2010). "Ascorbate improves metabolic abnormalities in Wrn mutant mice but not the free radical scavenger catechin." *Ann N Y Acad Sci* **1197**: 40-44.
- Leblond, F., Nguyen, A., Bolduc, V., Lambert, J., Yu, C., Duquette, N. and Thorin, E. (2013). "Postnatal exposure to voluntary exercise but not the antioxidant catechin protects the vasculature after a switch to an atherogenic environment in middle-age mice." *Pflugers Arch* **465**(2): 197-208.

- Leblond, F., Poirier, S., Yu, C., Duquette, N., Mayer, G. and Thorin, E. (2014). "The anti-hypercholesterolemic effect of low p53 expression protects vascular endothelial function in mice." *PLoS One* **9**(3): e92394.
- Lee, C. D., Folsom, A. R. and Blair, S. N. (2003). "Physical activity and stroke risk: a meta-analysis." *Stroke* **34**(10): 2475-2481.
- Lee, S., Park, Y. and Zhang, C. (2011). "Exercise Training Prevents Coronary Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetic Mice." *Am J Biomed Sci* **3**(4): 241-252.
- Leeuwenburgh, C., Hansen, P. A., Holloszy, J. O. and Heinecke, J. W. (1999). "Oxidized amino acids in the urine of aging rats: potential markers for assessing oxidative stress in vivo." *Am J Physiol* **276**(1 Pt 2): R128-135.
- Leikert, J. F., Rathel, T. R., Wohlfart, P., Cheynier, V., Vollmar, A. M. and Dirsch, V. M. (2002). "Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells." *Circulation* **106**(13): 1614-1617.
- Leone, A. M., Valgimigli, M., Giannico, M. B., Zaccone, V., Perfetti, M., D'Amario, D., Rebuzzi, A. G. and Crea, F. (2009). "From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells." *Eur Heart J* **30**(8): 890-899.
- Lerman, A., Edwards, B. S., Hallett, J. W., Heublein, D. M., Sandberg, S. M. and Burnett, J. C., Jr. (1991). "Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis." *N Engl J Med* **325**(14): 997-1001.
- Lerman, A. and Zeiher, A. M. (2005). "Endothelial function: cardiac events." *Circulation* **111**(3): 363-368.
- Leung, W. H., Lau, C. P. and Wong, C. K. (1993). "Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolaemic patients." *Lancet* **341**(8859): 1496-1500.
- Levine, A. J. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." *Cell* **88**(3): 323-331.
- Levine, A. J. and Greenbaum, B. (2012). "The maintenance of epigenetic states by p53: the guardian of the epigenome." *Oncotarget* **3**(12): 1503-1504.
- Levonen, A. L., Inkala, M., Heikura, T., Jauhiainen, S., Jyrkkanen, H. K., Kansanen, E., Maatta, K., Romppanen, E., Turunen, P., Rutanen, J. and Yla-Herttuala, S. (2007). "Nrf2 gene transfer induces antioxidant enzymes and suppresses smooth muscle cell growth in vitro and reduces oxidative stress in rabbit aorta in vivo." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(4): 741-747.
- Lewis, P., Stefanovic, N., Pete, J., Calkin, A. C., Giunti, S., Thallas-Bonke, V., Jandeleit-Dahm, K. A., Allen, T. J., Kola, I., Cooper, M. E. and de Haan, J. B. (2007). "Lack of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase-1 accelerates atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice." *Circulation* **115**(16): 2178-2187.
- Li, L. M., Kilbourn, R. G., Adams, J. and Fidler, I. J. (1991). "Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells." *Cancer Res* **51**(10): 2531-2535.
- Li, Y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., Noble, L. J., Yoshimura, M. P., Berger, C., Chan, P. H., Wallace, D. C. and Epstein, C. J. (1995). "Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase." *Nat Genet* **11**(4): 376-381.
- Liao, C. Y., Rikke, B. A., Johnson, T. E., Diaz, V. and Nelson, J. F. (2010). "Genetic variation in the murine lifespan response to dietary restriction: from life extension to life shortening." *Aging Cell* **9**(1): 92-95.

- Liao, J. K. (1994). "Inhibition of Gi proteins by low density lipoprotein attenuates bradykinin-stimulated release of endothelial-derived nitric oxide." *J Biol Chem* **269**(17): 12987-12992.
- Libby, P., Okamoto, Y., Rocha, V. Z. and Folco, E. (2010). "Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice." *Circ J* **74**(2): 213-220.
- Libby, P., Ridker, P. M. and Hansson, G. K. (2011). "Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis." *Nature* **473**(7347): 317-325.
- Linzer, D. I. and Levine, A. J. (1979). "Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells." *Cell* **17**(1): 43-52.
- Liu, C. Q., Leung, F. P., Wong, S. L., Wong, W. T., Lau, C. W., Lu, L., Yao, X., Yao, T. and Huang, Y. (2009). "Thromboxane prostanoid receptor activation impairs endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxations: the role of Rho kinase." *Biochem Pharmacol* **78**(4): 374-381.
- Liu, G. and Chen, X. (2006). "DNA polymerase eta, the product of the xeroderma pigmentosum variant gene and a target of p53, modulates the DNA damage checkpoint and p53 activation." *Mol Cell Biol* **26**(4): 1398-1413.
- Liu, G. H., Qu, J. and Shen, X. (2008). "NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK." *Biochim Biophys Acta* **1783**(5): 713-727.
- Loffredo, F. S., Steinhauser, M. L., Jay, S. M., Gannon, J., Pancoast, J. R., Yalamanchi, P., Sinha, M., Dall'Osso, C., Khong, D., Shadrach, J. L., Miller, C. M., Singer, B. S., Stewart, A., Psychogios, N., Gerszten, R. E., Hartigan, A. J., Kim, M. J., Serwold, T., Wagers, A. J. and Lee, R. T. (2013). "Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy." *Cell* **153**(4): 828-839.
- Lonn, E., Bosch, J., Yusuf, S., Sheridan, P., Pogue, J., Arnold, J. M., Ross, C., Arnold, A., Sleight, P., Probstfield, J. and Dagenais, G. R. (2005). "Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial." *JAMA* **293**(11): 1338-1347.
- Lorenz, M., Wessler, S., Follmann, E., Michaelis, W., Dusterhoff, T., Baumann, G., Stangl, K. and Stangl, V. (2004). "A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation." *J Biol Chem* **279**(7): 6190-6195.
- Lowenstein, C. J., Alley, E. W., Raval, P., Snowman, A. M., Snyder, S. H., Russell, S. W. and Murphy, W. J. (1993). "Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(20): 9730-9734.
- Lu, Y., Feskens, E. J., Boer, J. M. and Muller, M. (2010). "The potential influence of genetic variants in genes along bile acid and bile metabolic pathway on blood cholesterol levels in the population." *Atherosclerosis* **210**(1): 14-27.
- Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L. and Gu, W. (2001). "Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress." *Cell* **107**(2): 137-148.
- Luscher, T. F. and Vanhoutte, P. M. (1986). "Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat." *Hypertension* **8**(4): 344-348.
- Luscher, T. F., Yang, Z., Tschudi, M., von Segesser, L., Stulz, P., Boulanger, C., Siebenmann, R., Turina, M. and Buhler, F. R. (1990). "Interaction between

- endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins." *Circ Res* **66**(4): 1088-1094.
- Lutz, M., Cortez, J. and Vinet, R. (1995). "Effects of dietary fats, alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on aortic ring segment responses in the rat." *Int J Vitam Nutr Res* **65**(4): 225-230.
- Machha, A., Achike, F. I., Mustafa, A. M. and Mustafa, M. R. (2007). "Quercetin, a flavonoid antioxidant, modulates endothelium-derived nitric oxide bioavailability in diabetic rat aortas." *Nitric Oxide* **16**(4): 442-447.
- MacLachlan, T. K. and El-Deiry, W. S. (2002). "Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(14): 9492-9497.
- MacMicking, J., Xie, Q. W. and Nathan, C. (1997a). "Nitric oxide and macrophage function." *Annu Rev Immunol* **15**: 323-350.
- MacMicking, J. D., North, R. J., LaCourse, R., Mudgett, J. S., Shah, S. K. and Nathan, C. F. (1997b). "Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5243-5248.
- Maggio, M., Basaria, S., Ble, A., Lauretani, F., Bandinelli, S., Ceda, G. P., Valenti, G., Ling, S. M. and Ferrucci, L. (2006a). "Correlation between testosterone and the inflammatory marker soluble interleukin-6 receptor in older men." *J Clin Endocrinol Metab* **91**(1): 345-347.
- Maggio, M., Guralnik, J. M., Longo, D. L. and Ferrucci, L. (2006b). "Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61**(6): 575-584.
- Maier, B., Gluba, W., Bernier, B., Turner, T., Mohammad, K., Guise, T., Sutherland, A., Thorner, M. and Scoble, H. (2004). "Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53." *Genes Dev* **18**(3): 306-319.
- Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni, J. F., Jr., Nelson, C. E., Kim, D. H., Kassel, J., Gryka, M. A., Bischoff, F. Z., Tainsky, M. A. and et al. (1990). "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms." *Science* **250**(4985): 1233-1238.
- Mancini, G. B., Henry, G. C., Macaya, C., O'Neill, B. J., Pucillo, A. L., Carere, R. G., Wargovich, T. J., Mudra, H., Luscher, T. F., Klibaner, M. I., Haber, H. E., Uprichard, A. C., Pepine, C. J. and Pitt, B. (1996). "Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study." *Circulation* **94**(3): 258-265.
- Manea, A., Manea, S. A., Gafencu, A. V. and Raicu, M. (2007). "Regulation of NADPH oxidase subunit p22(phox) by NF-kB in human aortic smooth muscle cells." *Arch Physiol Biochem* **113**(4-5): 163-172.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. and Balkwill, F. (2008). "Cancer-related inflammation." *Nature* **454**(7203): 436-444.
- Marchenko, N. D., Wolff, S., Erster, S., Becker, K. and Moll, U. M. (2007). "Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation." *EMBO J* **26**(4): 923-934.
- Marchenko, N. D., Zaika, A. and Moll, U. M. (2000). "Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling." *J Biol Chem* **275**(21): 16202-16212.
- Margaritis, I., Tessier, F., Richard, M. J. and Marconnet, P. (1997). "No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors." *Int J Sports Med* **18**(3): 186-190.

- Marletta, M. A. (1993). "Nitric oxide synthase structure and mechanism." *J Biol Chem* **268**(17): 12231-12234.
- Martin-Padura, I., de Nigris, F., Migliaccio, E., Mansueto, G., Minardi, S., Rienzo, M., Lerman, L. O., Stendardo, M., Giorgio, M., De Rosa, G., Pelicci, P. G. and Napoli, C. (2008). "p66Shc deletion confers vascular protection in advanced atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E knockout mice." *Endothelium* **15**(5-6): 276-287.
- Martinez-Gonzalez, M. A. and Gea, A. (2012). "Mediterranean diet: the whole is more than the sum of its parts." *The British journal of nutrition* **108**(4): 577-578.
- Massip, L., Garand, C., Paquet, E. R., Cogger, V. C., O'Reilly, J. N., Tworek, L., Hatherell, A., Taylor, C. G., Thorin, E., Zahradka, P., Le Couteur, D. G. and Lebel, M. (2010). "Vitamin C restores healthy aging in a mouse model for Werner syndrome." *FASEB J* **24**(1): 158-172.
- Mastaloudis, A., Leonard, S. W. and Traber, M. G. (2001). "Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise." *Free Radic Biol Med* **31**(7): 911-922.
- Matheu, A., Maraver, A., Klatt, P., Flores, I., Garcia-Cao, I., Borrás, C., Flores, J. M., Vina, J., Blasco, M. A. and Serrano, M. (2007). "Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway." *Nature* **448**(7151): 375-379.
- Matoba, S., Kang, J. G., Patino, W. D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P. J., Bunz, F. and Hwang, P. M. (2006). "p53 regulates mitochondrial respiration." *Science* **312**(5780): 1650-1653.
- Matoba, T., Shimokawa, H., Nakashima, M., Hirakawa, Y., Mukai, Y., Hirano, K., Kanaide, H. and Takeshita, A. (2000). "Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice." *J Clin Invest* **106**(12): 1521-1530.
- Matsumoto, T., Ishida, K., Kobayashi, T. and Kamata, K. (2009a). "Pyrrolidine dithiocarbamate reduces vascular prostanoid-induced responses in aged type 2 diabetic rat model." *J Pharmacol Sci* **110**(3): 326-333.
- Matsumoto, T., Ishida, K., Nakayama, N., Taguchi, K., Kobayashi, T. and Kamata, K. (2010). "Mechanisms underlying the losartan treatment-induced improvement in the endothelial dysfunction seen in mesenteric arteries from type 2 diabetic rats." *Pharmacol Res* **62**(3): 271-281.
- Matsumoto, T., Kakami, M., Noguchi, E., Kobayashi, T. and Kamata, K. (2007a). "Imbalance between endothelium-derived relaxing and contracting factors in mesenteric arteries from aged OLETF rats, a model of Type 2 diabetes." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**(3): H1480-1490.
- Matsumoto, T., Kobayashi, T., Wachi, H., Seyama, Y. and Kamata, K. (2007b). "Vascular NAD(P)H oxidase mediates endothelial dysfunction in basilar arteries from Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats." *Atherosclerosis* **192**(1): 15-24.
- Matsumoto, T., Nakayama, N., Ishida, K., Kobayashi, T. and Kamata, K. (2009b). "Eicosapentaenoic acid improves imbalance between vasodilator and vasoconstrictor actions of endothelium-derived factors in mesenteric arteries from rats at chronic stage of type 2 diabetes." *J Pharmacol Exp Ther* **329**(1): 324-334.
- Matsumoto, T., Takaoka, E., Ishida, K., Nakayama, N., Noguchi, E., Kobayashi, T. and Kamata, K. (2009c). "Abnormalities of endothelium-dependent responses in mesenteric arteries from Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats are improved by chronic treatment with thromboxane A2 synthase inhibitor." *Atherosclerosis* **205**(1): 87-95.
- Matsuno, K., Yamada, H., Iwata, K., Jin, D., Katsuyama, M., Matsuki, M., Takai, S., Yamanishi, K., Miyazaki, M., Matsubara, H. and Yabe-Nishimura, C. (2005).

- "Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice." Circulation **112**(17): 2677-2685.
- Mattagajasingh, I., Kim, C. S., Naqvi, A., Yamamori, T., Hoffman, T. A., Jung, S. B., DeRicco, J., Kasuno, K. and Irani, K. (2007). "SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(37): 14855-14860.
- Mattison, J. A., Roth, G. S., Beasley, T. M., Tilmont, E. M., Handy, A. M., Herbert, R. L., Longo, D. L., Allison, D. B., Young, J. E., Bryant, M., Barnard, D., Ward, W. F., Qi, W., Ingram, D. K. and de Cabo, R. (2012). "Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study." Nature **489**(7415): 318-321.
- Mattson, M. P. (2008a). "Hormesis and disease resistance: activation of cellular stress response pathways." Human & experimental toxicology **27**(2): 155-162.
- Mattson, M. P. (2008b). "Hormesis defined." Ageing Res Rev **7**(1): 1-7.
- Mattson, M. P. and Wan, R. (2005). "Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems." J Nutr Biochem **16**(3): 129-137.
- Mattusch, F., Dufaux, B., Heine, O., Mertens, I. and Rost, R. (2000). "Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine months of endurance training." Int J Sports Med **21**(1): 21-24.
- Matz, R. L., de Sotomayor, M. A., Schott, C., Stoclet, J. C. and Andriantsitohaina, R. (2000). "Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids." Br J Pharmacol **131**(2): 303-311.
- Matz, R. L., Van Overloop, B., Gaubert, E. and Gairard, A. (2001). "Maturation reveals a decrease in endothelium-dependent contraction induced by depolarization in the aorta of spontaneously hypertensive rats." Life Sci **69**(15): 1791-1804.
- Maya, R., Balass, M., Kim, S. T., Shkedy, D., Leal, J. F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., Kastan, M. B., Katzir, E. and Oren, M. (2001). "ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage." Genes Dev **15**(9): 1067-1077.
- Mayhan, W. G., Arrick, D. M., Patel, K. P. and Sun, H. (2011). "Exercise training normalizes impaired NOS-dependent responses of cerebral arterioles in type 1 diabetic rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **300**(3): H1013-1020.
- Mayhan, W. G., Sun, H., Mayhan, J. F. and Patel, K. P. (2004). "Influence of exercise on dilatation of the basilar artery during diabetes mellitus." J Appl Physiol **96**(5): 1730-1737.
- McAdam, B. F., Catella-Lawson, F., Mardini, I. A., Kapoor, S., Lawson, J. A. and FitzGerald, G. A. (1999). "Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(1): 272-277.
- McCabe, T. J., Fulton, D., Roman, L. J. and Sessa, W. C. (2000). "Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation." J Biol Chem **275**(9): 6123-6128.
- McCay, C. M., Crowell, M. F. and Maynard, L. A. (1935). "The Effect of Retarded Growth Upon the Length of Life Span and Upon the Ultimate Body Size." J. Nutr. **10**: 63-79.
- McCulloch, A. I., Bottrill, F. E., Randall, M. D. and Hiley, C. R. (1997). "Characterization and modulation of EDHF-mediated relaxations in the rat isolated superior mesenteric arterial bed." Br J Pharmacol **120**(8): 1431-1438.

- McNeill, A. M., Kim, N., Duckles, S. P., Krause, D. N. and Kontos, H. A. (1999). "Chronic estrogen treatment increases levels of endothelial nitric oxide synthase protein in rat cerebral microvessels." *Stroke* **30**(10): 2186-2190.
- Medvedev, Z. A. (1990). "An attempt at a rational classification of theories of ageing." *Biol Rev Camb Philos Soc* **65**(3): 375-398.
- Meeking, D. R., Browne, D. L., Allard, S., Munday, J., Chowienyczyck, P. J., Shaw, K. M. and Cummings, M. H. (2000). "Effects of cyclo-oxygenase inhibition on vasodilatory response to acetylcholine in patients with type 1 diabetes and nondiabetic subjects." *Diabetes Care* **23**(12): 1840-1843.
- Meng, W., Ma, J., Ayata, C., Hara, H., Huang, P. L., Fishman, M. C. and Moskowitz, M. A. (1996). "ACh dilates pial arterioles in endothelial and neuronal NOS knockout mice by NO-dependent mechanisms." *Am J Physiol* **271**(3 Pt 2): H1145-1150.
- Menini, S., Amadio, L., Oddi, G., Ricci, C., Pesce, C., Pugliese, F., Giorgio, M., Migliaccio, E., Pelicci, P., Iacobini, C. and Pugliese, G. (2006). "Deletion of p66Shc longevity gene protects against experimental diabetic glomerulopathy by preventing diabetes-induced oxidative stress." *Diabetes* **55**(6): 1642-1650.
- Mercer, J., Figg, N., Stoneman, V., Braganza, D. and Bennett, M. R. (2005). "Endogenous p53 protects vascular smooth muscle cells from apoptosis and reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice." *Circ Res* **96**(6): 667-674.
- Mercer, J., Mahmoudi, M. and Bennett, M. (2007). "DNA damage, p53, apoptosis and vascular disease." *Mutat Res* **621**(1-2): 75-86.
- Mercer, W. E., Nelson, D., DeLeo, A. B., Old, L. J. and Baserga, R. (1982). "Microinjection of monoclonal antibody to protein p53 inhibits serum-induced DNA synthesis in 3T3 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(20): 6309-6312.
- Messaoudi, I., Warner, J., Fischer, M., Park, B., Hill, B., Mattison, J., Lane, M. A., Roth, G. S., Ingram, D. K., Picker, L. J., Douek, D. C., Mori, M. and Nikolich-Zugich, J. (2006). "Delay of T cell senescence by caloric restriction in aged long-lived nonhuman primates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(51): 19448-19453.
- Meydani, M., Das, S., Band, M., Epstein, S. and Roberts, S. (2011). "The effect of caloric restriction and glycemic load on measures of oxidative stress and antioxidants in humans: results from the CALERIE Trial of Human Caloric Restriction." *J Nutr Health Aging* **15**(6): 456-460.
- Meydani, S. N., Endres, S., Woods, M. M., Goldin, B. R., Soo, C., Morrill-Labrode, A., Dinarello, C. A. and Gorbach, S. L. (1991). "Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women." *J Nutr* **121**(4): 547-555.
- Meyer, T. E., Kovacs, S. J., Ehsani, A. A., Klein, S., Holloszy, J. O. and Fontana, L. (2006). "Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans." *J Am Coll Cardiol* **47**(2): 398-402.
- Michell, B. J., Chen, Z., Tiganis, T., Stapleton, D., Katsis, F., Power, D. A., Sim, A. T. and Kemp, B. E. (2001). "Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* **276**(21): 17625-17628.
- Michell, B. J., Griffiths, J. E., Mitchelhill, K. I., Rodriguez-Crespo, I., Tiganis, T., Bozinovski, S., de Montellano, P. R., Kemp, B. E. and Pearson, R. B. (1999). "The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase." *Curr Biol* **9**(15): 845-848.
- Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P. P., Lanfrancone, L. and Pelicci, P. G. (1999). "The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals." *Nature* **402**(6759): 309-313.

- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. and Moll, U. M. (2003). "p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria." *Mol Cell* **11**(3): 577-590.
- Miles, E. A., Rees, D., Banerjee, T., Cazzola, R., Lewis, S., Wood, R., Oates, R., Tallant, A., Cestaro, B., Yaqoob, P., Wahle, K. W. and Calder, P. C. (2008). "Age-related increases in circulating inflammatory markers in men are independent of BMI, blood pressure and blood lipid concentrations." *Atherosclerosis* **196**(1): 298-305.
- Miller, E. R., 3rd, Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R. A., Appel, L. J. and Guallar, E. (2005). "Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality." *Ann Intern Med* **142**(1): 37-46.
- Miller, J. D., Chu, Y., Castaneda, L. E., Serrano, K. M., Brooks, R. M. and Heistad, D. D. (2013). "Vascular function during prolonged progression and regression of atherosclerosis in mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**(3): 459-465.
- Milne, J. C., Lambert, P. D., Schenk, S., Carney, D. P., Smith, J. J., Gagne, D. J., Jin, L., Boss, O., Perni, R. B., Vu, C. B., Bemis, J. E., Xie, R., Disch, J. S., Ng, P. Y., Nunes, J. J., Lynch, A. V., Yang, H., Galonek, H., Israelian, K., Choy, W., Iffland, A., Lavu, S., Medvedik, O., Sinclair, D. A., Olefsky, J. M., Jirousek, M. R., Elliott, P. J. and Westphal, C. H. (2007). "Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes." *Nature* **450**(7170): 712-716.
- Miura, H., Bosnjak, J. J., Ning, G., Saito, T., Miura, M. and Gutterman, D. D. (2003). "Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles." *Circ Res* **92**(2): e31-40.
- Modena, M. G., Bonetti, L., Coppi, F., Bursi, F. and Rossi, R. (2002). "Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women." *J Am Coll Cardiol* **40**(3): 505-510.
- Mollnau, H., Wendt, M., Szocs, K., Lassegue, B., Schulz, E., Oelze, M., Li, H., Bodenschatz, M., August, M., Kleschyov, A. L., Tsilimingas, N., Walter, U., Forstermann, U., Meinertz, T., Griendling, K. and Munzel, T. (2002). "Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling." *Circ Res* **90**(4): E58-65.
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D. and Levine, A. J. (1992). "The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation." *Cell* **69**(7): 1237-1245.
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. and Vane, J. R. (1976). "An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation." *Nature* **263**(5579): 663-665.
- Montes de Oca Luna, R., Wagner, D. S. and Lozano, G. (1995). "Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53." *Nature* **378**(6553): 203-206.
- Moore, L., Lu, X., Ghebranious, N., Tyner, S. and Donehower, L. A. (2007). "Aging-associated truncated form of p53 interacts with wild-type p53 and alters p53 stability, localization, and activity." *Mech Ageing Dev* **128**(11-12): 717-730.
- Morishita, T., Tsutsui, M., Shimokawa, H., Sabanai, K., Tasaki, H., Suda, O., Nakata, S., Tanimoto, A., Wang, K. Y., Ueta, Y., Sasaguri, Y., Nakashima, Y. and Yanagihara, N. (2005). "Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(30): 10616-10621.
- MRC/BHF (2002). "MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial." *Lancet* **360**(9326): 7-22.

- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W., Oren, M. and Krammer, P. H. (1998). "p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs." *J Exp Med* **188**(11): 2033-2045.
- Munk, P. S., Breland, U. M., Aukrust, P., Ueland, T., Kvaloy, J. T. and Larsen, A. I. (2011). "High intensity interval training reduces systemic inflammation in post-PCI patients." *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **18**(6): 850-857.
- Munk, P. S., Staal, E. M., Butt, N., Isaksen, K. and Larsen, A. I. (2009). "High-intensity interval training may reduce in-stent restenosis following percutaneous coronary intervention with stent implantation A randomized controlled trial evaluating the relationship to endothelial function and inflammation." *Am Heart J* **158**(5): 734-741.
- Murata, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Hirata, M., Yamasaki, A., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Aze, Y., Tanaka, T., Yoshida, N., Ueno, A., Oh-ishi, S. and Narumiya, S. (1997). "Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor." *Nature* **388**(6643): 678-682.
- Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., Kearney, M., Chen, D., Symes, J. F., Fishman, M. C., Huang, P. L. and Isner, J. M. (1998). "Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia." *J Clin Invest* **101**(11): 2567-2578.
- Nadaud, S., Philippe, M., Arnal, J. F., Michel, J. B. and Soubrier, F. (1996). "Sustained increase in aortic endothelial nitric oxide synthase expression in vivo in a model of chronic high blood flow." *Circ Res* **79**(4): 857-863.
- Naderali, E. K., Smith, S. L., Doyle, P. J. and Williams, G. (2001). "The mechanism of resveratrol-induced vasorelaxation differs in the mesenteric resistance arteries of lean and obese rats." *Clin Sci (Lond)* **100**(1): 55-60.
- Nakaki, T., Nakayama, M. and Kato, R. (1990). "Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells." *Eur J Pharmacol* **189**(6): 347-353.
- Nakane, M., Schmidt, H. H., Pollock, J. S., Forstermann, U. and Murad, F. (1993). "Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle." *FEBS Lett* **316**(2): 175-180.
- Nakata, S., Tsutsui, M., Shimokawa, H., Suda, O., Morishita, T., Shibata, K., Yatera, Y., Sabanai, K., Tanimoto, A., Nagasaki, M., Tasaki, H., Sasaguri, Y., Nakashima, Y., Otsuji, Y. and Yanagihara, N. (2008). "Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms." *Circulation* **117**(17): 2211-2223.
- Napoli, C., Martin-Padura, I., de Nigris, F., Giorgio, M., Mansueto, G., Somma, P., Condorelli, M., Sica, G., De Rosa, G. and Pelicci, P. (2003). "Deletion of the p66Shc longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 2112-2116.
- Natali, A., Sironi, A. M., Toschi, E., Camastra, S., Sanna, G., Perissinotto, A., Taddei, S. and Ferrannini, E. (2000). "Effect of vitamin C on forearm blood flow and glucose metabolism in essential hypertension." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(11): 2401-2406.
- Navasolava, N. M., Dignat-George, F., Sabatier, F., Larina, I. M., Demiot, C., Fortrat, J. O., Gauquelin-Koch, G., Kozlovskaya, I. B. and Custaud, M. A. (2010). "Enforced physical inactivity increases endothelial microparticle levels in healthy volunteers." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**(2): H248-256.

- Neumann, C. A., Cao, J. and Manevich, Y. (2009). "Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling." Cell Cycle **8**(24): 4072-4078.
- Ng, S. F., Lin, R. C., Laybutt, D. R., Barres, R., Owens, J. A. and Morris, M. J. (2010). "Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring." Nature **467**(7318): 963-966.
- Nguyen, A., Geoffroy, S., Phillips, M. and Thorin, E. (2011). "Free Radical-Dependent Sod2 Promoter Demethylation is Associated with Healthy Vascular Aging." Circulation **124**(S21): A17314.
- Nguyen, A., Thorin-Trescases, N. and Thorin, E. (2010). "Working under pressure: coronary arteries and the endothelin system." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **298**(5): R1188-1194.
- Nieman, D. C., Henson, D. A., Gusewitch, G., Warren, B. J., Dotson, R. C., Butterworth, D. E. and Nehlsen-Cannarella, S. L. (1993). "Physical activity and immune function in elderly women." Med Sci Sports Exerc **25**(7): 823-831.
- Nishikawa, Y., Stepp, D. W. and Chilian, W. M. (2000). "Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(2): H459-465.
- Nocon, M., Hiemann, T., Muller-Riemenschneider, F., Thalau, F., Roll, S. and Willich, S. N. (2008). "Association of physical activity with all-cause and cardiovascular mortality: a systematic review and meta-analysis." Eur J Cardiovasc Prev Rehabil **15**(3): 239-246.
- North, B. J. and Sinclair, D. A. (2012). "The intersection between aging and cardiovascular disease." Circ Res **110**(8): 1097-1108.
- Novakovic, A., Bukarica, L. G., Kanjuh, V. and Heinle, H. (2006). "Potassium channels-mediated vasorelaxation of rat aorta induced by resveratrol." Basic Clin Pharmacol Toxicol **99**(5): 360-364.
- Nozaki, S., Kashiwagi, H., Yamashita, S., Nakagawa, T., Kostner, B., Tomiyama, Y., Nakata, A., Ishigami, M., Miyagawa, J., Kameda-Takemura, K. and et al. (1995). "Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects." J Clin Invest **96**(4): 1859-1865.
- Numaguchi, Y., Harada, M., Osanai, H., Hayashi, K., Toki, Y., Okumura, K., Ito, T. and Hayakawa, T. (1999). "Altered gene expression of prostacyclin synthase and prostacyclin receptor in the thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats." Cardiovasc Res **41**(3): 682-688.
- O'Connor, J. C., Wallace, D. M., O'Brien, C. J. and Cotter, T. G. (2008). "A novel antioxidant function for the tumor-suppressor gene p53 in the retinal ganglion cell." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(10): 4237-4244.
- Oak, J. H. and Cai, H. (2007). "Attenuation of angiotensin II signaling recouples eNOS and inhibits nonendothelial NOX activity in diabetic mice." Diabetes **56**(1): 118-126.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. and Tanaka, N. (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." Science **288**(5468): 1053-1058.
- Ohashi, Y., Kawashima, S., Hirata, K., Yamashita, T., Ishida, T., Inoue, N., Sakoda, T., Kurihara, H., Yazaki, Y. and Yokoyama, M. (1998). "Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase." J Clin Invest **102**(12): 2061-2071.
- Okada, T., Tsukano, H., Endo, M., Tabata, M., Miyata, K., Kadomatsu, T., Miyashita, K., Semba, K., Nakamura, E., Tsukano, M., Mizuta, H. and Oike, Y. (2010).

- "Synoviocyte-derived angiopoietin-like protein 2 contributes to synovial chronic inflammation in rheumatoid arthritis." The American journal of pathology **176**(5): 2309-2319.
- Okuda, M., Inoue, N., Azumi, H., Seno, T., Sumi, Y., Hirata, K., Kawashima, S., Hayashi, Y., Itoh, H., Yodoi, J. and Yokoyama, M. (2001). "Expression of glutaredoxin in human coronary arteries: its potential role in antioxidant protection against atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(9): 1483-1487.
- Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L. and Vogelstein, B. (1992). "Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas." Nature **358**(6381): 80-83.
- Olshansky, S. J., Passaro, D. J., Hershow, R. C., Layden, J., Carnes, B. A., Brody, J., Hayflick, L., Butler, R. N., Allison, D. B. and Ludwig, D. S. (2005). "A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century." N Engl J Med **352**(11): 1138-1145.
- Oren, M. and Levine, A. J. (1983). "Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(1): 56-59.
- Orimo, M., Minamino, T., Miyauchi, H., Tateno, K., Okada, S., Moriya, J. and Komuro, I. (2009). "Protective role of SIRT1 in diabetic vascular dysfunction." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(6): 889-894.
- Ozaki, M., Kawashima, S., Yamashita, T., Hirase, T., Namiki, M., Inoue, N., Hirata, K., Yasui, H., Sakurai, H., Yoshida, Y., Masada, M. and Yokoyama, M. (2002). "Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice." J Clin Invest **110**(3): 331-340.
- Packer, M. A., Stasiv, Y., Benraiss, A., Chmielnicki, E., Grinberg, A., Westphal, H., Goldman, S. A. and Enikolopov, G. (2003). "Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9566-9571.
- Padilla, J., Simmons, G. H., Bender, S. B., Arce-Esquivel, A. A., Whyte, J. J. and Laughlin, M. H. (2011). "Vascular effects of exercise: endothelial adaptations beyond active muscle beds." Physiology (Bethesda) **26**(3): 132-145.
- Palmer, R. M., Ashton, D. S. and Moncada, S. (1988). "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." Nature **333**(6174): 664-666.
- Palmero, E. I., Achatz, M. I., Ashton-Prolla, P., Olivier, M. and Hainaut, P. (2010). "Tumor protein 53 mutations and inherited cancer: beyond Li-Fraumeni syndrome." Curr Opin Oncol **22**(1): 64-69.
- Palsamy, P. and Subramanian, S. (2011). "Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling." Biochim Biophys Acta **1812**(7): 719-731.
- Panichi, V., Taccola, D., Rizza, G. M., Consani, C., Ghiadoni, L., Filippi, C., Cristofani, R., Panicucci, E., Migliori, M., Sidoti, A., Biagioli, M., Boracelli, D., Barsotti, G. and Tetta, C. (2006). "Interleukin-8 is a powerful prognostic predictor of all-cause and cardiovascular mortality in dialytic patients." Nephron Clin Pract **102**(2): c51-58.
- Papapetropoulos, A., Garcia-Cardena, G., Madri, J. A. and Sessa, W. C. (1997). "Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells." J Clin Invest **100**(12): 3131-3139.
- Park, J. Y., Wang, P. Y., Matsumoto, T., Sung, H. J., Ma, W., Choi, J. W., Anderson, S. A., Leary, S. C., Balaban, R. S., Kang, J. G. and Hwang, P. M. (2009). "p53 improves aerobic exercise capacity and augments skeletal muscle mitochondrial DNA content." Circ Res **105**(7): 705-712, 711 p following 712.

- Park, Y., Booth, F. W., Lee, S., Laye, M. J. and Zhang, C. (2012). "Physical activity opposes coronary vascular dysfunction induced during high fat feeding in mice." J Physiol **590**(Pt 17): 4255-4268.
- Parmar, K. M., Larman, H. B., Dai, G., Zhang, Y., Wang, E. T., Moorthy, S. N., Kratz, J. R., Lin, Z., Jain, M. K., Gimbrone, M. A., Jr. and Garcia-Cardena, G. (2006). "Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2." J Clin Invest **116**(1): 49-58.
- Patterson, C. M., Dunn-Meynell, A. A. and Levin, B. E. (2008). "Three weeks of early-onset exercise prolongs obesity resistance in DIO rats after exercise cessation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **294**(2): R290-301.
- Pearson, K. J., Baur, J. A., Lewis, K. N., Peshkin, L., Price, N. L., Labinskyy, N., Swindell, W. R., Kamara, D., Minor, R. K., Perez, E., Jamieson, H. A., Zhang, Y., Dunn, S. R., Sharma, K., Pleshko, N., Woollett, L. A., Csiszar, A., Ikeno, Y., Le Couteur, D., Elliott, P. J., Becker, K. G., Navas, P., Ingram, D. K., Wolf, N. S., Ungvari, Z., Sinclair, D. A. and de Cabo, R. (2008). "Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span." Cell Metab **8**(2): 157-168.
- Pedrajas, J. R., Carreras, A., Valderrama, R. and Barroso, J. B. (2010). "Mitochondrial 1-Cys-peroxiredoxin/thioredoxin system protects manganese-containing superoxide dismutase (Mn-SOD) against inactivation by peroxynitrite in *Saccharomyces cerevisiae*." Nitric Oxide **23**(3): 206-213.
- Perez, M. J. and Briz, O. (2009a). "Bile-acid-induced cell injury and protection." World journal of gastroenterology : WJG **15**(14): 1677-1689.
- Perez, V. I., Bokov, A., Van Remmen, H., Mele, J., Ran, Q., Ikeno, Y. and Richardson, A. (2009b). "Is the oxidative stress theory of aging dead?" Biochim Biophys Acta **1790**(10): 1005-1014.
- Perez, V. I., Van Remmen, H., Bokov, A., Epstein, C. J., Vijg, J. and Richardson, A. (2009c). "The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice." Aging Cell **8**(1): 73-75.
- Pfister, S. L. (2006). "Aortic thromboxane receptor deficiency alters vascular reactivity in cholesterol-fed rabbits." Atherosclerosis **189**(2): 358-363.
- Pfister, S. L., Spitzbarth, N., Nithipatikom, K., Edgemond, W. S., Falck, J. R. and Campbell, W. B. (1998). "Identification of the 11,14,15- and 11,12, 15-trihydroxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived relaxing factors of rabbit aorta." J Biol Chem **273**(47): 30879-30887.
- Physical Activity Guidelines Advisory Committee and the Physical Activity Guidelines writing group (2008). 2008 Physical Activity Guidelines for Americans. U. S. D. o. H. a. H. Services. USA.
- Pierce, G. L., Beske, S. D., Lawson, B. R., Southall, K. L., Benay, F. J., Donato, A. J. and Seals, D. R. (2008). "Weight loss alone improves conduit and resistance artery endothelial function in young and older overweight/obese adults." Hypertension **52**(1): 72-79.
- Pierce, G. L., Donato, A. J., LaRocca, T. J., Eskurza, I., Silver, A. E. and Seals, D. R. (2011). "Habitually exercising older men do not demonstrate age-associated vascular endothelial oxidative stress." Aging cell **10**(6): 1032-1037.
- Pierce, G. L., Jablonski, K. L., Walker, A. E., Seibert, S. M., Devan, A. E., Black, S. M., Sharma, S. and Seals, D. R. (2012). "Tetrahydrobiopterin supplementation enhances carotid artery compliance in healthy older men: a pilot study." Am J Hypertens **25**(10): 1050-1054.

- Pieri, C., Falasca, M., Marcheselli, F., Moroni, F., Recchioni, R., Marmocchi, F. and Lupidi, G. (1992). "Food restriction in female Wistar rats: V. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in the liver." *Arch Gerontol Geriatr* **14**(1): 93-99.
- Pletcher, S. D., Macdonald, S. J., Marguerie, R., Certa, U., Stearns, S. C., Goldstein, D. B. and Partridge, L. (2002). "Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster*." *Curr Biol* **12**(9): 712-723.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1997). "A model for p53-induced apoptosis." *Nature* **389**(6648): 300-305.
- Popowich, D. A., Vavra, A. K., Walsh, C. P., Bhikapurwala, H. A., Rossi, N. B., Jiang, Q., Aalami, O. O. and Kibbe, M. R. (2010). "Regulation of reactive oxygen species by p53: implications for nitric oxide-mediated apoptosis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**(6): H2192-2200.
- Pou, K. M., Massaro, J. M., Hoffmann, U., Vasan, R. S., Maurovich-Horvat, P., Larson, M. G., Keaney, J. F., Jr., Meigs, J. B., Lipinska, I., Kathiresan, S., Murabito, J. M., O'Donnell, C. J., Benjamin, E. J. and Fox, C. S. (2007). "Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study." *Circulation* **116**(11): 1234-1241.
- Pou, S., Pou, W. S., Bredt, D. S., Snyder, S. H. and Rosen, G. M. (1992). "Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase." *J Biol Chem* **267**(34): 24173-24176.
- Pullinger, C. R., Eng, C., Salen, G., Shefer, S., Batta, A. K., Erickson, S. K., Verhagen, A., Rivera, C. R., Mulvihill, S. J., Malloy, M. J. and Kane, J. P. (2002). "Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype." *J Clin Invest* **110**(1): 109-117.
- Purdie, C. A., Harrison, D. J., Peter, A., Dobbie, L., White, S., Howie, S. E., Salter, D. M., Bird, C. C., Wyllie, A. H., Hooper, M. L. and et al. (1994). "Tumour incidence, spectrum and ploidy in mice with a large deletion in the p53 gene." *Oncogene* **9**(2): 603-609.
- Qu, C., Leung, S. W., Vanhoutte, P. M. and Man, R. Y. (2010). "Chronic inhibition of nitric-oxide synthase potentiates endothelium-dependent contractions in the rat aorta by augmenting the expression of cyclooxygenase-2." *J Pharmacol Exp Ther* **334**(2): 373-380.
- Racette, S. B., Weiss, E. P., Villareal, D. T., Arif, H., Steger-May, K., Schechtman, K. B., Fontana, L., Klein, S. and Holloszy, J. O. (2006). "One year of caloric restriction in humans: feasibility and effects on body composition and abdominal adipose tissue." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61**(9): 943-950.
- Radak, Z., Apor, P., Pucsok, J., Berkes, I., Ogonovszky, H., Pavlik, G., Nakamoto, H. and Goto, S. (2003). "Marathon running alters the DNA base excision repair in human skeletal muscle." *Life Sci* **72**(14): 1627-1633.
- Radak, Z., Chung, H. Y., Koltai, E., Taylor, A. W. and Goto, S. (2008). "Exercise, oxidative stress and hormesis." *Ageing research reviews* **7**(1): 34-42.
- Radak, Z., Chung, H. Y., Naito, H., Takahashi, R., Jung, K. J., Kim, H. J. and Goto, S. (2004). "Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise." *FASEB J* **18**(6): 749-750.
- Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Pucsok, J., Sasvari, M., Nyakas, C. and Goto, S. (2001a). "Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain." *Neurochem Int* **38**(1): 17-23.

- Radak, Z., Naito, H., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Takahashi, R., Cardozo-Pelaez, F. and Goto, S. (2002). "Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle." *Pflugers Arch* **445**(2): 273-278.
- Radak, Z., Pucsek, J., Mecsek, S., Csont, T. and Ferdinandy, P. (1999). "Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle." *Free Radic Biol Med* **26**(7-8): 1059-1063.
- Radak, Z., Sasvari, M., Nyakas, C., Kaneko, T., Tahara, S., Ohno, H. and Goto, S. (2001b). "Single bout of exercise eliminates the immobilization-induced oxidative stress in rat brain." *Neurochem Int* **39**(1): 33-38.
- Radak, Z., Sasvari, M., Nyakas, C., Pucsek, J., Nakamoto, H. and Goto, S. (2000). "Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium." *Arch Biochem Biophys* **376**(2): 248-251.
- Rajagopalan, S., Kurz, S., Munzel, T., Tarpey, M., Freeman, B. A., Griending, K. K. and Harrison, D. G. (1996). "Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone." *J Clin Invest* **97**(8): 1916-1923.
- Rapoport, R. M., Draznin, M. B. and Murad, F. (1983). "Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation." *Nature* **306**(5939): 174-176.
- Ray, P., Ghosh, S. K., Zhang, D. H. and Ray, A. (1997). "Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor." *FEBS Lett* **409**(1): 79-85.
- Ray, R., Murdoch, C. E., Wang, M., Santos, C. X., Zhang, M., Alom-Ruiz, S., Anilkumar, N., Ouattara, A., Cave, A. C., Walker, S. J., Grieve, D. J., Charles, R. L., Eaton, P., Brewer, A. C. and Shah, A. M. (2011). "Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**(6): 1368-1376.
- Rector, R. S., Thyfault, J. P., Laye, M. J., Morris, R. T., Borengasser, S. J., Uptergrove, G. M., Chakravarthy, M. V., Booth, F. W. and Ibdah, J. A. (2008). "Cessation of daily exercise dramatically alters precursors of hepatic steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats." *J Physiol* **586**(Pt 17): 4241-4249.
- Reddy, K. S. and Yusuf, S. (1998). "Emerging epidemic of cardiovascular disease in developing countries." *Circulation* **97**(6): 596-601.
- Redman, L. M., Heilbronn, L. K., Martin, C. K., Alfonso, A., Smith, S. R. and Ravussin, E. (2007). "Effect of calorie restriction with or without exercise on body composition and fat distribution." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(3): 865-872.
- Renaud, S. and de Lorgeril, M. (1992). "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease." *Lancet* **339**(8808): 1523-1526.
- Rezaie-Majd, A., Maca, T., Bucek, R. A., Valent, P., Muller, M. R., Husslein, P., Kashanipour, A., Minar, E. and Baghestanian, M. (2002). "Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(7): 1194-1199.
- Riad, A., Westermann, D., Van Linthout, S., Mohr, Z., Uyumaz, S., Becher, P. M., Rutten, H., Wohlfart, P., Peters, H., Schultheiss, H. P. and Tschope, C. (2008). "Enhancement of endothelial nitric oxide synthase production reverses vascular

- dysfunction and inflammation in the hindlimbs of a rat model of diabetes." *Diabetologia* **51**(12): 2325-2332.
- Ridker, P. M. (1998). "Inflammation, infection, and cardiovascular risk: how good is the clinical evidence?" *Circulation* **97**(17): 1671-1674.
- Ridker, P. M., Rifai, N., Rose, L., Buring, J. E. and Cook, N. R. (2002). "Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events." *N Engl J Med* **347**(20): 1557-1565.
- Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Ascherio, A., Giovannucci, E., Colditz, G. A. and Willett, W. C. (1993). "Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men." *N Engl J Med* **328**(20): 1450-1456.
- Rippe, C., Lesniewski, L., Connell, M., LaRocca, T., Donato, A. and Seals, D. (2010). "Short-term calorie restriction reverses vascular endothelial dysfunction in old mice by increasing nitric oxide and reducing oxidative stress." *Aging cell* **9**(3): 304-312.
- Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klötting, N., Birringer, M., Kiehntopf, M., Stumvoll, M., Kahn, C. R. and Bluher, M. (2009). "Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(21): 8665-8670.
- Rodman, D. M., Mallet, J. and McMurtry, I. F. (1991). "Difference in effect of inhibitors of energy metabolism on endothelium-dependent relaxation of rat pulmonary artery and aorta." *Am J Respir Cell Mol Biol* **4**(3): 237-242.
- Rodondi, N., Marques-Vidal, P., Butler, J., Sutton-Tyrrell, K., Cornuz, J., Satterfield, S., Harris, T., Bauer, D. C., Ferrucci, L., Vittinghoff, E. and Newman, A. B. (2010). "Markers of atherosclerosis and inflammation for prediction of coronary heart disease in older adults." *Am J Epidemiol* **171**(5): 540-549.
- Rodriguez-Manas, L., El-Assar, M., Vallejo, S., Lopez-Doriga, P., Solis, J., Petidier, R., Montes, M., Nevado, J., Castro, M., Gomez-Guerrero, C., Peiro, C. and Sanchez-Ferrer, C. F. (2009). "Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation." *Aging Cell* **8**(3): 226-238.
- Rogina, B. and Helfand, S. L. (2004). "Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(45): 15998-16003.
- Romanov, V. S., Pospelov, V. A. and Pospelova, T. V. (2012). "Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis." *Biochemistry (Mosc)* **77**(6): 575-584.
- Roque, F. R., Briones, A. M., Garcia-Redondo, A. B., Galan, M., Martinez-Revelles, S., Avendano, M. S., Cachafeiro, V., Fernandes, T., Vassallo, D. V., Oliveira, E. M. and Salices, M. (2012). "Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension." *Br J Pharmacol*.
- Roseboom, T. J., van der Meulen, J. H., Osmond, C., Barker, D. J., Ravelli, A. C., Schroeder-Tanka, J. M., van Montfrans, G. A., Michels, R. P. and Bleker, O. P. (2000). "Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944-45." *Heart* **84**(6): 595-598.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." *N Engl J Med* **340**(2): 115-126.
- Rossi, R., Chiurlia, E., Nuzzo, A., Cioni, E., Origliani, G. and Modena, M. G. (2004). "Flow-mediated vasodilation and the risk of developing hypertension in healthy postmenopausal women." *J Am Coll Cardiol* **44**(8): 1636-1640.

- Rossi, R., Cioni, E., Nuzzo, A., Origliani, G. and Modena, M. G. (2005). "Endothelial-dependent vasodilation and incidence of type 2 diabetes in a population of healthy postmenopausal women." *Diabetes Care* **28**(3): 702-707.
- Rota, M., LeCapitaine, N., Hosoda, T., Boni, A., De Angelis, A., Padin-Iruegas, M. E., Esposito, G., Vitale, S., Urbanek, K., Casarsa, C., Giorgio, M., Luscher, T. F., Pelicci, P. G., Anversa, P., Leri, A. and Kajstura, J. (2006). "Diabetes promotes cardiac stem cell aging and heart failure, which are prevented by deletion of the p66shc gene." *Circ Res* **99**(1): 42-52.
- Roubenoff, R., Harris, T. B., Abad, L. W., Wilson, P. W., Dallal, G. E. and Dinarello, C. A. (1998). "Monocyte cytokine production in an elderly population: effect of age and inflammation." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **53**(1): M20-26.
- Rous, P. (1914). "The Influence of Diet on Transplanted and Spontaneous Mouse Tumors." *J Exp Med* **20**(5): 433-451.
- Rovio, S., Kareholt, I., Helkala, E. L., Viitanen, M., Winblad, B., Tuomilehto, J., Soininen, H., Nissinen, A. and Kivipelto, M. (2005). "Leisure-time physical activity at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease." *Lancet Neurol* **4**(11): 705-711.
- Royds, J. A. and Iacopetta, B. (2006). "p53 and disease: when the guardian angel fails." *Cell Death Differ* **13**(6): 1017-1026.
- Rubanyi, G. M., Romero, J. C. and Vanhoutte, P. M. (1986). "Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor." *Am J Physiol* **250**(6 Pt 2): H1145-1149.
- Rush, J. W., Quadriatero, J., Levy, A. S. and Ford, R. J. (2007). "Chronic resveratrol enhances endothelium-dependent relaxation but does not alter eNOS levels in aorta of spontaneously hypertensive rats." *Exp Biol Med (Maywood)* **232**(6): 814-822.
- Sablina, A. A., Budanov, A. V., Ilyinskaya, G. V., Agapova, L. S., Kravchenko, J. E. and Chumakov, P. M. (2005). "The antioxidant function of the p53 tumor suppressor." *Nat Med* **11**(12): 1306-1313.
- Saitoh, S., Matsumoto, K., Kamioka, M., Ohkawara, H., Kaneshiro, T., Ishibashi, T. and Maruyama, Y. (2009). "Novel pathway of endothelin-1 and reactive oxygen species in coronary vasospasm with endothelial dysfunction." *Coron Artery Dis* **20**(6): 400-408.
- Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W. and Appella, E. (1998). "DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade." *Genes Dev* **12**(18): 2831-2841.
- Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takawa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K. and Masaki, T. (1990). "Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor." *Nature* **348**(6303): 732-735.
- Saleem, A., Adhietty, P. J. and Hood, D. A. (2009). "Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle." *Physiol Genomics* **37**(1): 58-66.
- Salvioli, S., Capri, M., Bucci, L., Lanni, C., Racchi, M., Uberti, D., Memo, M., Mari, D., Govoni, S. and Franceschi, C. (2009). "Why do centenarians escape or postpone cancer? The role of IGF-1, inflammation and p53." *Cancer Immunol Immunother* **58**(12): 1909-1917.
- Sanchez, M., Galisteo, M., Vera, R., Villar, I. C., Zarzuelo, A., Tamargo, J., Perez-Vizcaino, F. and Duarte, J. (2006). "Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats." *J Hypertens* **24**(1): 75-84.
- Sanchez, M., Lodi, F., Vera, R., Villar, I. C., Cogolludo, A., Jimenez, R., Moreno, L., Romero, M., Tamargo, J., Perez-Vizcaino, F. and Duarte, J. (2007). "Quercetin and isorhamnetin prevent endothelial dysfunction, superoxide production, and

- overexpression of p47phox induced by angiotensin II in rat aorta." *J Nutr* **137**(4): 910-915.
- Sanchez-Quesada, J. L., Homs-Serradesanferm, R., Serrat-Serrat, J., Serra-Grima, J. R., Gonzalez-Sastre, F. and Ordonez-Llanos, J. (1995). "Increase of LDL susceptibility to oxidation occurring after intense, long duration aerobic exercise." *Atherosclerosis* **118**(2): 297-305.
- Schachinger, V., Britten, M. B. and Zeiher, A. M. (2000). "Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease." *Circulation* **101**(16): 1899-1906.
- Schiffrin, E. L. and Deng, L. Y. (1995). "Comparison of effects of angiotensin I-converting enzyme inhibition and beta-blockade for 2 years on function of small arteries from hypertensive patients." *Hypertension* **25**(4 Pt 2): 699-703.
- Schinzari, F., Tesaro, M., Rovella, V., Di Daniele, N., Gentileschi, P., Mores, N., Campia, U. and Cardillo, C. (2012). "Rho-kinase inhibition improves vasodilator responsiveness during hyperinsulinemia in the metabolic syndrome." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **303**(6): E806-811.
- Schleicher, M., Yu, J., Murata, T., Derakhshan, B., Atochin, D., Qian, L., Kashiwagi, S., Di Lorenzo, A., Harrison, K. D., Huang, P. L. and Sessa, W. C. (2009). "The Akt1-eNOS axis illustrates the specificity of kinase-substrate relationships in vivo." *Sci Signal* **2**(82): ra41.
- Schmidt, P., Youhnovski, N., Daiber, A., Balan, A., Arsic, M., Bachschmid, M., Przybylski, M. and Ullrich, V. (2003). "Specific nitration at tyrosine 430 revealed by high resolution mass spectrometry as basis for redox regulation of bovine prostacyclin synthase." *J Biol Chem* **278**(15): 12813-12819.
- Schrager, M. A., Metter, E. J., Simonsick, E., Ble, A., Bandinelli, S., Lauretani, F. and Ferrucci, L. (2007). "Sarcopenic obesity and inflammation in the InCHIANTI study." *J Appl Physiol* **102**(3): 919-925.
- Schriner, S. E., Linford, N. J., Martin, G. M., Treuting, P., Ogburn, C. E., Emond, M., Coskun, P. E., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., Wallace, D. C. and Rabinovitch, P. S. (2005). "Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria." *Science* **308**(5730): 1909-1911.
- Schroder, K., Zhang, M., Benkhoff, S., Mieth, A., Pliquett, R., Kosowski, J., Kruse, C., Luedike, P., Michaelis, U. R., Weissmann, N., Dimmeler, S., Shah, A. M. and Brandes, R. P. (2012). "Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase." *Circ Res* **110**(9): 1217-1225.
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C. L., Hollenberg, N. K., Sies, H., Kwik-Urbe, C., Schmitz, H. H. and Kelm, M. (2006). "(-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(4): 1024-1029.
- Schwartzenberg-Bar-Yoseph, F., Armoni, M. and Karnieli, E. (2004). "The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression." *Cancer Res* **64**(7): 2627-2633.
- Schwarz, P. M., Kleinert, H. and Forstermann, U. (1999). "Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(11): 2584-2590.
- Scotland, R. S., Madhani, M., Chauhan, S., Moncada, S., Andresen, J., Nilsson, H., Hobbs, A. J. and Ahluwalia, A. (2005). "Investigation of vascular responses in endothelial nitric oxide synthase/cyclooxygenase-1 double-knockout mice: key

- role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of blood pressure in vivo." *Circulation* **111**(6): 796-803.
- Sen-Banerjee, S., Mir, S., Lin, Z., Hamik, A., Atkins, G. B., Das, H., Banerjee, P., Kumar, A. and Jain, M. K. (2005). "Kruppel-like factor 2 as a novel mediator of statin effects in endothelial cells." *Circulation* **112**(5): 720-726.
- Sen-Banerjee, S., Lin, Z., Atkins, G. B., Greif, D. M., Rao, R. M., Kumar, A., Feinberg, M. W., Chen, Z., Simon, D. I., Lusinskas, F. W., Michel, T. M., Gimbrone, M. A., Jr., Garcia-Cardena, G. and Jain, M. K. (2004). "KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation." *J Exp Med* **199**(10): 1305-1315.
- She, Q. B., Bode, A. M., Ma, W. Y., Chen, N. Y. and Dong, Z. (2001). "Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase." *Cancer Res* **61**(4): 1604-1610.
- Shi, Y., Man, R. Y. and Vanhoutte, P. M. (2008). "Two isoforms of cyclooxygenase contribute to augmented endothelium-dependent contractions in femoral arteries of 1-year-old rats." *Acta Pharmacol Sin* **29**(2): 185-192.
- Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C. (1997). "DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2." *Cell* **91**(3): 325-334.
- Shima, K., Shi, K., Mizuno, A., Sano, T., Ishida, K. and Noma, Y. (1996). "Exercise training has a long-lasting effect on prevention of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty rats." *Metabolism* **45**(4): 475-480.
- Simic, G., Lucassen, P. J., Krsnik, Z., Kruslin, B., Kostovic, I., Winblad, B. and Bogdanovi (2000). "nNOS expression in reactive astrocytes correlates with increased cell death related DNA damage in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease." *Exp Neurol* **165**(1): 12-26.
- Sinclair, D. A. (2005). "Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation." *Mech Ageing Dev* **126**(9): 987-1002.
- Sindler, A. L., Delp, M. D., Reyes, R., Wu, G. and Muller-Delp, J. M. (2009). "Effects of ageing and exercise training on eNOS uncoupling in skeletal muscle resistance arterioles." *J Physiol* **587**(Pt 15): 3885-3897.
- Sindler, A. L., Fleenor, B. S., Calvert, J. W., Marshall, K. D., Zigler, M. L., Lefer, D. J. and Seals, D. R. (2011). "Nitrite supplementation reverses vascular endothelial dysfunction and large elastic artery stiffness with aging." *Aging Cell* **10**(3): 429-437.
- Singh, B. and Bhat, H. K. (2012). "Superoxide dismutase 3 is induced by antioxidants, inhibits oxidative DNA damage and is associated with inhibition of estrogen-induced breast cancer." *Carcinogenesis* **33**(12): 2601-2610.
- Singh, S., Vrishni, S., Singh, B. K., Rahman, I. and Kakkar, P. (2010). "Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases." *Free Radic Res* **44**(11): 1267-1288.
- Singh, T. and Newman, A. B. (2011). "Inflammatory markers in population studies of aging." *Ageing Res Rev* **10**(3): 319-329.
- Sinha, M., Jang, Y. C., Oh, J., Khong, D., Wu, E. Y., Manohar, R., Miller, C., Regalado, S. G., Loffredo, F. S., Pancoast, J. R., Hirshman, M. F., Lebowitz, J., Shadrach, J. L., Cerletti, M., Kim, M. J., Serwold, T., Goodyear, L. J., Rosner, B., Lee, R. T. and Wagers, A. J. (2014). "Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle." *Science* **344**(6184): 649-652.
- Smith, C. J., Santhanam, L., Bruning, R. S., Stanhewicz, A., Berkowitz, D. E. and Holowatz, L. A. (2011). "Upregulation of inducible nitric oxide synthase

- contributes to attenuated cutaneous vasodilation in essential hypertensive humans." *Hypertension* **58**(5): 935-942.
- Smith, M. A., Richey Harris, P. L., Sayre, L. M., Beckman, J. S. and Perry, G. (1997). "Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease." *J Neurosci* **17**(8): 2653-2657.
- Smits, V. A., Klompmaker, R., Vallenius, T., Rijksen, G., Makela, T. P. and Medema, R. H. (2000). "p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint." *J Biol Chem* **275**(39): 30638-30643.
- Société canadienne de physiologie de l'exercice (2012). Directives canadiennes en matière d'activité physique et de comportement sédentaire. Canada.
- Solomon, S. D., McMurray, J. J., Pfeffer, M. A., Wittes, J., Fowler, R., Finn, P., Anderson, W. F., Zuber, A., Hawk, E. and Bertagnoli, M. (2005). "Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention." *N Engl J Med* **352**(11): 1071-1080.
- Sowa, G., Pypaert, M. and Sessa, W. C. (2001). "Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 14072-14077.
- Spescha, R. D., Shi, Y., Wegener, S., Keller, S., Weber, B., Wyss, M. M., Lauinger, N., Tabatabai, G., Paneni, F., Cosentino, F., Hock, C., Weller, M., Nitsch, R. M., Luscher, T. F. and Camici, G. G. (2013). "Deletion of the ageing gene p66(Shc) reduces early stroke size following ischaemia/reperfusion brain injury." *Eur Heart J* **34**(2): 96-103.
- Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S. and Mak, T. W. (2001). "Regulation of PTEN transcription by p53." *Mol Cell* **8**(2): 317-325.
- Stampfer, M. J., Hennekens, C. H., Manson, J. E., Colditz, G. A., Rosner, B. and Willett, W. C. (1993). "Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women." *N Engl J Med* **328**(20): 1444-1449.
- Starkie, R., Ostrowski, S. R., Jauffred, S., Febbraio, M. and Pedersen, B. K. (2003). "Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans." *FASEB J* **17**(8): 884-886.
- Statistique Canada (2011). Mortalité : liste sommaire des causes 2008. Division de la statistique de la santé. Ottawa, Canada, Ministre de l'Industrie.
- Steckelings, U. M., Kaschina, E. and Unger, T. (2005). "The AT2 receptor--a matter of love and hate." *Peptides* **26**(8): 1401-1409.
- Stehouwer, C. D., Nauta, J. J., Zeldenrust, G. C., Hackeng, W. H., Donker, A. J. and den Ottolander, G. J. (1992). "Urinary albumin excretion, cardiovascular disease, and endothelial dysfunction in non-insulin-dependent diabetes mellitus." *Lancet* **340**(8815): 319-323.
- Stein, G. H., Drullinger, L. F., Soulard, A. and Dulic, V. (1999). "Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts." *Mol Cell Biol* **19**(3): 2109-2117.
- Steinberg, D. and Witztum, J. L. (2002). "Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis?" *Circulation* **105**(17): 2107-2111.
- Stephens, N. G., Parsons, A., Schofield, P. M., Kelly, F., Cheeseman, K. and Mitchinson, M. J. (1996). "Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS)." *Lancet* **347**(9004): 781-786.

- Stroes, E., Kastelein, J., Cosentino, F., Erkelens, W., Wever, R., Koomans, H., Luscher, T. and Rabelink, T. (1997). "Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia." *J Clin Invest* **99**(1): 41-46.
- Stroes, E. S., Koomans, H. A., de Bruin, T. W. and Rabelink, T. J. (1995). "Vascular function in the forearm of hypercholesterolaemic patients off and on lipid-lowering medication." *Lancet* **346**(8973): 467-471.
- Stuehr, D. J., Kwon, N. S., Nathan, C. F., Griffith, O. W., Feldman, P. L. and Wiseman, J. (1991). "N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine." *J Biol Chem* **266**(10): 6259-6263.
- Styskal, J., Van Remmen, H., Richardson, A. and Salmon, A. B. (2012). "Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models?" *Free Radic Biol Med* **52**(1): 46-58.
- Sukumar, P., Viswambharan, H., Imrie, H., Cubbon, R. M., Yuldasheva, N., Gage, M., Galloway, S., Skromna, A., Kandavelu, P., Santos, C. X., Gatenby, V. K., Smith, J., Beech, D. J., Wheatcroft, S. B., Channon, K. M., Shah, A. M. and Kearney, M. T. (2013). "Nox2 NADPH oxidase has a critical role in insulin resistance-related endothelial cell dysfunction." *Diabetes* **62**(6): 2130-2134.
- Sung, B., Park, S., Yu, B. P. and Chung, H. Y. (2006). "Amelioration of age-related inflammation and oxidative stress by PPARgamma activator: suppression of NF-kappaB by 2,4-thiazolidinedione." *Exp Gerontol* **41**(6): 590-599.
- Sussan, T. E., Jun, J., Thimmulappa, R., Bedja, D., Antero, M., Gabrielson, K. L., Polotsky, V. Y. and Biswal, S. (2008). "Disruption of Nrf2, a key inducer of antioxidant defenses, attenuates ApoE-mediated atherosclerosis in mice." *PLoS One* **3**(11): e3791.
- Suvorava, T., Lauer, N. and Kojda, G. (2004). "Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice." *J Am Coll Cardiol* **44**(6): 1320-1327.
- Suwa, M., Nakano, H., Radak, Z. and Kumagai, S. (2008). "Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle." *Metabolism* **57**(7): 986-998.
- Suwaidi, J. A., Hamasaki, S., Higano, S. T., Nishimura, R. A., Holmes, D. R., Jr. and Lerman, A. (2000). "Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction." *Circulation* **101**(9): 948-954.
- Suzuki, S., Tanaka, T., Poyurovsky, M. V., Nagano, H., Mayama, T., Ohkubo, S., Lokshin, M., Hosokawa, H., Nakayama, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Sato, E., Nagao, T., Yokote, K., Tatsuno, I. and Prives, C. (2010). "Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(16): 7461-7466.
- Tabata, M., Kadomatsu, T., Fukuhara, S., Miyata, K., Ito, Y., Endo, M., Urano, T., Zhu, H. J., Tsukano, H., Tazume, H., Kaikita, K., Miyashita, K., Iwawaki, T., Shimabukuro, M., Sakaguchi, K., Ito, T., Nakagata, N., Yamada, T., Katagiri, H., Kasuga, M., Ando, Y., Ogawa, H., Mochizuki, N., Itoh, H., Suda, T. and Oike, Y. (2009). "Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance." *Cell metabolism* **10**(3): 178-188.
- Taddei, S., Galetta, F., Virdis, A., Ghiadoni, L., Salvetti, G., Franzoni, F., Giusti, C. and Salvetti, A. (2000). "Physical activity prevents age-related impairment in nitric oxide availability in elderly athletes." *Circulation* **101**(25): 2896-2901.
- Taddei, S., Versari, D., Cipriano, A., Ghiadoni, L., Galetta, F., Franzoni, F., Magagna, A., Virdis, A. and Salvetti, A. (2006). "Identification of a cytochrome P450 2C9-

- derived endothelium-derived hyperpolarizing factor in essential hypertensive patients." *J Am Coll Cardiol* **48**(3): 508-515.
- Taddei, S., Viridis, A., Ghiadoni, L., Magagna, A. and Salvetti, A. (1998a). "Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension." *Circulation* **97**(22): 2222-2229.
- Taddei, S., Viridis, A., Ghiadoni, L., Mattei, P. and Salvetti, A. (1998b). "Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on endothelium-dependent vasodilatation in essential hypertensive patients." *J Hypertens* **16**(4): 447-456.
- Taddei, S., Viridis, A., Ghiadoni, L., Salvetti, G., Bernini, G., Magagna, A. and Salvetti, A. (2001). "Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans." *Hypertension* **38**(2): 274-279.
- Taddei, S., Viridis, A., Mattei, P., Ghiadoni, L., Fasolo, C. B., Sudano, I. and Salvetti, A. (1997). "Hypertension causes premature aging of endothelial function in humans." *Hypertension* **29**(3): 736-743.
- Takac, I., Schroder, K., Zhang, L., Lardy, B., Anilkumar, N., Lambeth, J. D., Shah, A. M., Morel, F. and Brandes, R. P. (2011). "The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4." *J Biol Chem* **286**(15): 13304-13313.
- Takagi, Y., Gon, Y., Todaka, T., Nozaki, K., Nishiyama, A., Sono, H., Hashimoto, N., Kikuchi, H. and Yodoi, J. (1998). "Expression of thioredoxin is enhanced in atherosclerotic plaques and during neointima formation in rat arteries." *Lab Invest* **78**(8): 957-966.
- Tan, M., Li, S., Swaroop, M., Guan, K., Oberley, L. W. and Sun, Y. (1999). "Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53." *J Biol Chem* **274**(17): 12061-12066.
- Tanaka, H., Dinunno, F. A., Monahan, K. D., Clevenger, C. M., DeSouza, C. A. and Seals, D. R. (2000). "Aging, habitual exercise, and dynamic arterial compliance." *Circulation* **102**(11): 1270-1275.
- Tang, E. H., Ku, D. D., Tipoe, G. L., Feletou, M., Man, R. Y. and Vanhoutte, P. M. (2005). "Endothelium-dependent contractions occur in the aorta of wild-type and COX2-/- knockout but not COX1-/- knockout mice." *J Cardiovasc Pharmacol* **46**(6): 761-765.
- Tang, E. H., Leung, F. P., Huang, Y., Feletou, M., So, K. F., Man, R. Y. and Vanhoutte, P. M. (2007). "Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor." *Br J Pharmacol* **151**(1): 15-23.
- Tang, E. H. and Vanhoutte, P. M. (2008). "Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension." *Physiol Genomics* **32**(3): 409-418.
- Targonski, P. V., Bonetti, P. O., Pumper, G. M., Higano, S. T., Holmes, D. R., Jr. and Lerman, A. (2003). "Coronary endothelial dysfunction is associated with an increased risk of cerebrovascular events." *Circulation* **107**(22): 2805-2809.
- Tateson, J. E., Moncada, S. and Vane, J. R. (1977). "Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets." *Prostaglandins* **13**(3): 389-397.
- Taylor, P. D., Oon, B. B., Thomas, C. R. and Poston, L. (1994). "Prevention by insulin treatment of endothelial dysfunction but not enhanced noradrenaline-induced contractility in mesenteric resistance arteries from streptozotocin-induced diabetic rats." *Br J Pharmacol* **111**(1): 35-41.
- Taylor, R. and Thoma, K. (1985). "Mortality patterns in the modernized Pacific Island nation of Nauru." *Am J Public Health* **75**(2): 149-155.

- Tazume, H., Miyata, K., Tian, Z., Endo, M., Horiguchi, H., Takahashi, O., Horio, E., Tsukano, H., Kadomatsu, T., Nakashima, Y., Kunitomo, R., Kaneko, Y., Moriyama, S., Sakaguchi, H., Okamoto, K., Hara, M., Yoshinaga, T., Yoshimura, K., Aoki, H., Araki, K., Hao, H., Kawasuji, M. and Oike, Y. (2012). "Macrophage-derived angiopoietin-like protein 2 accelerates development of abdominal aortic aneurysm." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**(6): 1400-1409.
- Tedgui, A. and Mallat, Z. (2006). "Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways." *Physiol Rev* **86**(2): 515-581.
- Teerlink, T., Luo, Z., Palm, F. and Wilcox, C. S. (2009). "Cellular ADMA: regulation and action." *Pharmacol Res* **60**(6): 448-460.
- Teodoro, B. G., Natali, A. J., Fernandes, S. A., Silva, L. A., Pinho, R. A., Matta, S. L. and Peluzio Mdo, C. (2012). "Improvements of Atherosclerosis and Hepatic Oxidative Stress are Independent of Exercise Intensity in LDLr(-/-) Mice." *J Atheroscler Thromb* **19**(10): 904-911.
- Thakur, V. S., Gupta, K. and Gupta, S. (2012). "Green tea polyphenols increase p53 transcriptional activity and acetylation by suppressing class I histone deacetylases." *Int J Oncol* **41**(1): 353-361.
- Thériault, L., Stonebridge, C. and Browarski, S. (2010). The Canadian Heart Health Strategy Risk Factors and Future Cost Implications. Canada, The Conference Board of Canada.
- Thomas, D. W., Mannon, R. B., Mannon, P. J., Latour, A., Oliver, J. A., Hoffman, M., Smithies, O., Koller, B. H. and Coffman, T. M. (1998). "Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A2." *J Clin Invest* **102**(11): 1994-2001.
- Thomson, L., Trujillo, M., Telleri, R. and Radi, R. (1995). "Kinetics of cytochrome c2+ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems." *Arch Biochem Biophys* **319**(2): 491-497.
- Thorin, E., Hamilton, C. A., Dominiczak, M. H. and Reid, J. L. (1994). "Chronic exposure of cultured bovine endothelial cells to oxidized LDL abolishes prostacyclin release." *Arterioscler Thromb* **14**(3): 453-459.
- Thorin, E., Huang, P. L., Fishman, M. C. and Bevan, J. A. (1998). "Nitric oxide inhibits alpha2-adrenoceptor-mediated endothelium-dependent vasodilation." *Circ Res* **82**(12): 1323-1329.
- Thorin, E. and Webb, D. J. (2010). "Endothelium-derived endothelin-1." *Pflugers Arch* **459**(6): 951-958.
- Thorin-Trescases, N. and Thorin, E. (2010). Vascular Aging and Oxidative Stress: Hormesis and Adaptative Cellular Pathways. *Aging and Age-Related Disorders*. S. Bondy and K. Maiese. New York, Humana Press (Springer Science+Business Media): 309-321.
- Thornborrow, E. C., Patel, S., Mastropietro, A. E., Schwartzfarb, E. M. and Manfredi, J. J. (2002). "A conserved intronic response element mediates direct p53-dependent transcriptional activation of both the human and murine bax genes." *Oncogene* **21**(7): 990-999.
- Tian, J., Yan, Z., Wu, Y., Zhang, S. L., Wang, K., Ma, X. R., Guo, L., Wang, J., Zuo, L., Liu, J. Y., Quan, L. and Liu, H. R. (2010). "Inhibition of iNOS protects endothelial-dependent vasodilation in aged rats." *Acta Pharmacol Sin* **31**(10): 1324-1328.
- Timimi, F. K., Ting, H. H., Haley, E. A., Roddy, M. A., Ganz, P. and Creager, M. A. (1998). "Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus." *J Am Coll Cardiol* **31**(3): 552-557.

- Ting, H. H., Timimi, F. K., Haley, E. A., Roddy, M. A., Ganz, P. and Creager, M. A. (1997). "Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia." *Circulation* **95**(12): 2617-2622.
- Tinken, T. M., Thijssen, D. H., Hopkins, N., Black, M. A., Dawson, E. A., Minson, C. T., Newcomer, S. C., Laughlin, M. H., Cable, N. T. and Green, D. J. (2009). "Impact of shear rate modulation on vascular function in humans." *Hypertension* **54**(2): 278-285.
- Tissenbaum, H. A. and Guarente, L. (2001). "Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **410**(6825): 227-230.
- Toda, N., Ayajiki, K. and Okamura, T. (2009). "Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase." *J Hypertens* **27**(10): 1929-1940.
- Todd, S., Woodward, M., Tunstall-Pedoe, H. and Bolton-Smith, C. (1999). "Dietary antioxidant vitamins and fiber in the etiology of cardiovascular disease and all-causes mortality: results from the Scottish Heart Health Study." *Am J Epidemiol* **150**(10): 1073-1080.
- Togashi, H., Sakuma, I., Yoshioka, M., Kobayashi, T., Yasuda, H., Kitabatake, A., Saito, H., Gross, S. S. and Levi, R. (1992). "A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation." *J Pharmacol Exp Ther* **262**(1): 343-347.
- Toledano, M. B. (2009). "The guardian recruits cops: the p53-p21 axis delegates prosurvival duties to the Keap1-Nrf2 stress pathway." *Mol Cell* **34**(6): 637-639.
- Tomilov, A. A., Bicocca, V., Schoenfeld, R. A., Giorgio, M., Migliaccio, E., Ramsey, J. J., Hagopian, K., Pelicci, P. G. and Cortopassi, G. A. (2010). "Decreased superoxide production in macrophages of long-lived p66Shc knock-out mice." *J Biol Chem* **285**(2): 1153-1165.
- Tong, X., Zhao, F., Mancuso, A., Gruber, J. J. and Thompson, C. B. (2009). "The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(51): 21660-21665.
- Torzewski, M., Ochsenhirt, V., Kleschyov, A. L., Oelze, M., Daiber, A., Li, H., Rossmann, H., Tsimikas, S., Reifenberg, K., Cheng, F., Lehr, H. A., Blankenberg, S., Forstermann, U., Munzel, T. and Lackner, K. J. (2007). "Deficiency of glutathione peroxidase-1 accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(4): 850-857.
- Touyz, R. M., Chen, X., Tabet, F., Yao, G., He, G., Quinn, M. T., Pagano, P. J. and Schiffrin, E. L. (2002). "Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II." *Circ Res* **90**(11): 1205-1213.
- Touyz, R. M., Yao, G. and Schiffrin, E. L. (2003). "c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(6): 981-987.
- Treasure, C. B., Klein, J. L., Weintraub, W. S., Talley, J. D., Stillabower, M. E., Kosinski, A. S., Zhang, J., Boccuzzi, S. J., Cedarholm, J. C. and Alexander, R. W. (1995). "Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease." *N Engl J Med* **332**(8): 481-487.
- Trebble, T., Arden, N. K., Stroud, M. A., Wootton, S. A., Burdge, G. C., Miles, E. A., Ballinger, A. B., Thompson, R. L. and Calder, P. C. (2003). "Inhibition of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 6 production by mononuclear cells following

- dietary fish-oil supplementation in healthy men and response to antioxidant co-supplementation." *Br J Nutr* **90**(2): 405-412.
- Trinei, M., Giorgio, M., Cicalese, A., Barozzi, S., Ventura, A., Migliaccio, E., Milia, E., Padura, I. M., Raker, V. A., Maccarana, M., Petronilli, V., Minucci, S., Bernardi, P., Lanfrancone, L. and Pelicci, P. G. (2002). "A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis." *Oncogene* **21**(24): 3872-3878.
- Troseid, M., Lappegard, K. T., Claudi, T., Damas, J. K., Morkrid, L., Brendberg, R. and Mollnes, T. E. (2004). "Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome." *Eur Heart J* **25**(4): 349-355.
- Tucci, P. (2012). "Caloric restriction: is mammalian life extension linked to p53?" *Aging (Albany NY)* **4**(8): 525-534.
- Tyner, S. D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., Hee Park, S., Thompson, T., Karsenty, G., Bradley, A. and Donehower, L. A. (2002). "p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes." *Nature* **415**(6867): 45-53.
- Uematsu, M., Ohara, Y., Navas, J. P., Nishida, K., Murphy, T. J., Alexander, R. W., Nerem, R. M. and Harrison, D. G. (1995). "Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress." *Am J Physiol* **269**(6 Pt 1): C1371-1378.
- Ungvari, Z., Bagi, Z., Feher, A., Recchia, F. A., Sonntag, W. E., Pearson, K., de Cabo, R. and Csiszar, A. (2010a). "Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**(1): H18-24.
- Ungvari, Z., Bailey-Downs, L., Gautam, T., Sosnowska, D., Wang, M., Monticone, R. E., Telljohann, R., Pinto, J. T., de Cabo, R., Sonntag, W. E., Lakatta, E. G. and Csiszar, A. (2011a). "Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF- κ B activation in the nonhuman primate *Macaca mulatta*." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **66**(8): 866-875.
- Ungvari, Z., Bailey-Downs, L., Sosnowska, D., Gautam, T., Koncz, P., Losonczy, G., Ballabh, P., de Cabo, R., Sonntag, W. E. and Csiszar, A. (2011b). "Vascular oxidative stress in aging: a homeostatic failure due to dysregulation of NRF2-mediated antioxidant response." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**(2): H363-372.
- Ungvari, Z., Csiszar, A., Sosnowska, D., Philipp, E. E., Campbell, C. M., McQuary, P. R., Chow, T. T., Coelho, M., Didier, E. S., Gelino, S., Holmbeck, M. A., Kim, I., Levy, E., Sonntag, W. E., Whitby, P. W., Austad, S. N. and Ridgway, I. (2013a). "Testing predictions of the oxidative stress hypothesis of aging using a novel invertebrate model of longevity: the giant clam (*Tridacna derasa*)." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **68**(4): 359-367.
- Ungvari, Z., Kaley, G., de Cabo, R., Sonntag, W. E. and Csiszar, A. (2010b). "Mechanisms of vascular aging: new perspectives." *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* **65**(10): 1028-1041.
- Ungvari, Z., Orosz, Z., Labinskyy, N., Rivera, A., Xiangmin, Z., Smith, K. and Csiszar, A. (2007). "Increased mitochondrial H₂O₂ production promotes endothelial NF- κ B activation in aged rat arteries." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**(1): H37-47.
- Ungvari, Z., Ridgway, I., Philipp, E. E., Campbell, C. M., McQuary, P., Chow, T., Coelho, M., Didier, E. S., Gelino, S., Holmbeck, M. A., Kim, I., Levy, E., Sosnowska, D., Sonntag, W. E., Austad, S. N. and Csiszar, A. (2011c). "Extreme longevity is

- associated with increased resistance to oxidative stress in *Arctica islandica*, the longest-living non-colonial animal." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **66**(7): 741-750.
- Ungvari, Z., Sosnowska, D., Mason, J. B., Gruber, H., Lee, S. W., Schwartz, T. S., Brown, M. K., Storm, N. J., Fortney, K., Sowa, J., Byrne, A. B., Kurz, T., Levy, E., Sonntag, W. E., Austad, S. N., Csiszar, A. and Ridgway, I. (2013b). "Resistance to genotoxic stresses in *Arctica islandica*, the longest living noncolonial animal: is extreme longevity associated with a multistress resistance phenotype?" *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **68**(5): 521-529.
- Urakami-Harasawa, L., Shimokawa, H., Nakashima, M., Egashira, K. and Takeshita, A. (1997). "Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries." *J Clin Invest* **100**(11): 2793-2799.
- Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L. and Cellarino, A. (2006). "Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate." *Curr Biol* **16**(3): 296-300.
- Valkonen, V. P., Paiva, H., Salonen, J. T., Lakka, T. A., Lehtimaki, T., Laakso, J. and Laaksonen, R. (2001). "Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine." *Lancet* **358**(9299): 2127-2128.
- van der Loo, B., Labugger, R., Skepper, J. N., Bachschmid, M., Kilo, J., Powell, J. M., Palacios-Callender, M., Erusalimsky, J. D., Quaschnig, T., Malinski, T., Gygi, D., Ullrich, V. and Luscher, T. F. (2000). "Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging." *J Exp Med* **192**(12): 1731-1744.
- Van Guilder, G. P., Westby, C. M., Greiner, J. J., Stauffer, B. L. and DeSouza, C. A. (2007). "Endothelin-1 vasoconstrictor tone increases with age in healthy men but can be reduced by regular aerobic exercise." *Hypertension* **50**(2): 403-409.
- van Haperen, R., de Waard, M., van Deel, E., Mees, B., Kutryk, M., van Aken, T., Hamming, J., Grosveld, F., Duncker, D. J. and de Crom, R. (2002). "Reduction of blood pressure, plasma cholesterol, and atherosclerosis by elevated endothelial nitric oxide." *J Biol Chem* **277**(50): 48803-48807.
- van Heemst, D., Mooijaart, S. P., Beekman, M., Schreuder, J., de Craen, A. J., Brandt, B. W., Slagboom, P. E. and Westendorp, R. G. (2005). "Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality." *Exp Gerontol* **40**(1-2): 11-15.
- Van Remmen, H., Ikeno, Y., Hamilton, M., Pahlavani, M., Wolf, N., Thorpe, S. R., Alderson, N. L., Baynes, J. W., Epstein, C. J., Huang, T. T., Nelson, J., Strong, R. and Richardson, A. (2003). "Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging." *Physiol Genomics* **16**(1): 29-37.
- Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martasek, P., Hogg, N., Masters, B. S., Karoui, H., Tordo, P. and Pritchard, K. A., Jr. (1998). "Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(16): 9220-9225.
- Vaziri, H., Dessain, S. K., Ng Eaton, E., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., Guarente, L. and Weinberg, R. A. (2001). "hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase." *Cell* **107**(2): 149-159.
- Vehkavaara, S., Seppala-Lindroos, A., Westerbacka, J., Groop, P. H. and Yki-Jarvinen, H. (1999). "In vivo endothelial dysfunction characterizes patients with impaired fasting glucose." *Diabetes Care* **22**(12): 2055-2060.
- Velasco-Miguel, S., Buckbinder, L., Jean, P., Gelbert, L., Talbott, R., Laidlaw, J., Seizinger, B. and Kley, N. (1999). "PA26, a novel target of the p53 tumor

- suppressor and member of the GADD family of DNA damage and growth arrest inducible genes." *Oncogene* **18**(1): 127-137.
- Venkatachalam, S., Tyner, S. D., Pickering, C. R., Boley, S., Recio, L., French, J. E. and Donehower, L. A. (2001). "Is p53 haploinsufficient for tumor suppression? Implications for the p53^{+/-} mouse model in carcinogenicity testing." *Toxicol Pathol* **29 Suppl**: 147-154.
- Venugopal, R. and Jaiswal, A. K. (1996). "Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14960-14965.
- Vequaud, P. and Thorin, E. (2001). "Endothelial G protein beta-subunits trigger nitric oxide-but not endothelium-derived hyperpolarizing factor-dependent dilation in rabbit resistance arteries." *Circ Res* **89**(8): 716-722.
- Vergnani, L., Hatrik, S., Ricci, F., Passaro, A., Manzoli, N., Zuliani, G., Brovkovich, V., Fellin, R. and Malinski, T. (2000). "Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production : key role of L-arginine availability." *Circulation* **101**(11): 1261-1266.
- Versari, D., Daghini, E., Viridis, A., Ghiadoni, L. and Taddei, S. (2009a). "The ageing endothelium, cardiovascular risk and disease in man." *Exp Physiol* **94**(3): 317-321.
- Versari, D., Daghini, E., Viridis, A., Ghiadoni, L. and Taddei, S. (2009b). "Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease." *Diabetes Care* **32 Suppl 2**: S314-321.
- Versari, D., Daghini, E., Viridis, A., Ghiadoni, L. and Taddei, S. (2009c). "Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension." *Br J Pharmacol* **157**(4): 527-536.
- Villareal, D. T., Fontana, L., Weiss, E. P., Racette, S. B., Steger-May, K., Schechtman, K. B., Klein, S. and Holloszy, J. O. (2006). "Bone mineral density response to caloric restriction-induced weight loss or exercise-induced weight loss: a randomized controlled trial." *Arch Intern Med* **166**(22): 2502-2510.
- Viridis, A., Colucci, R., Fornai, M., Polini, A., Daghini, E., Duranti, E., Ghisu, N., Versari, D., Dardano, A., Blandizzi, C., Taddei, S., Del Tacca, M. and Monzani, F. (2009a). "Inducible nitric oxide synthase is involved in endothelial dysfunction of mesenteric small arteries from hypothyroid rats." *Endocrinology* **150**(2): 1033-1042.
- Viridis, A., Colucci, R., Versari, D., Ghisu, N., Fornai, M., Antonioli, L., Duranti, E., Daghini, E., Giannarelli, C., Blandizzi, C., Taddei, S. and Del Tacca, M. (2009b). "Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats: role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids." *Hypertension* **53**(6): 1008-1016.
- Vivekananthan, D. P., Penn, M. S., Sapp, S. K., Hsu, A. and Topol, E. J. (2003). "Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials." *Lancet* **361**(9374): 2017-2023.
- Voghel, G., Thorin-Trescases, N., Farhat, N., Mamarbachi, A. M., Villeneuve, L., Fortier, A., Perrault, L. P., Carrier, M. and Thorin, E. (2008). "Chronic treatment with N-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients." *Mech Ageing Dev* **129**(5): 261-270.
- Voghel, G., Thorin-Trescases, N., Farhat, N., Nguyen, A., Villeneuve, L., Mamarbachi, A. M., Fortier, A., Perrault, L. P., Carrier, M. and Thorin, E. (2007). "Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by

- oxidative stress associated with cardiovascular risk factors." Mech Ageing Dev **128**(11-12): 662-671.
- Vousden, K. H. and Prives, C. (2009). "Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53." Cell **137**(3): 413-431.
- Wagner, A. H., Kohler, T., Ruckschloss, U., Just, I. and Hecker, M. (2000). "Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(1): 61-69.
- Walford, R. L., Mock, D., Verdery, R. and MacCallum, T. (2002). "Calorie restriction in biosphere 2: alterations in physiologic, hematologic, hormonal, and biochemical parameters in humans restricted for a 2-year period." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **57**(6): B211-224.
- Wallerath, T., Deckert, G., Ternes, T., Anderson, H., Li, H., Witte, K. and Forstermann, U. (2002). "Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase." Circulation **106**(13): 1652-1658.
- Wallerath, T., Li, H., Godtel-Ambrust, U., Schwarz, P. M. and Forstermann, U. (2005). "A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase." Nitric Oxide **12**(2): 97-104.
- Wang, J., Wiltshire, T., Wang, Y., Mikell, C., Burks, J., Cunningham, C., Van Laar, E. S., Waters, S. J., Reed, E. and Wang, W. (2004). "ATM-dependent CHK2 activation induced by anticancer agent, iriffulven." J Biol Chem **279**(38): 39584-39592.
- Wang, Y. C., McPherson, K., Marsh, T., Gortmaker, S. L. and Brown, M. (2011). "Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK." Lancet **378**(9793): 815-825.
- Wang, Y. X., Brooks, D. P. and Edwards, R. M. (1993). "Attenuated glomerular cGMP production and renal vasodilation in streptozotocin-induced diabetic rats." Am J Physiol **264**(5 Pt 2): R952-956.
- Warabi, E., Takabe, W., Minami, T., Inoue, K., Itoh, K., Yamamoto, M., Ishii, T., Kodama, T. and Noguchi, N. (2007). "Shear stress stabilizes NF-E2-related factor 2 and induces antioxidant genes in endothelial cells: role of reactive oxygen/nitrogen species." Free Radic Biol Med **42**(2): 260-269.
- Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." Science **123**(3191): 309-314.
- Wassmann, S., Wassmann, K. and Nickenig, G. (2004). "Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells." Hypertension **44**(4): 381-386.
- Wei, J., Xu, H., Davies, J. L. and Hemmings, G. P. (1992). "Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects." Life Sci **51**(25): 1953-1956.
- Wei, X. Q., Charles, I. G., Smith, A., Ure, J., Feng, G. J., Huang, F. P., Xu, D., Muller, W., Moncada, S. and Liew, F. Y. (1995). "Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase." Nature **375**(6530): 408-411.
- Weindruch, R., Walford, R. L., Fligiel, S. and Guthrie, D. (1986). "The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake." J Nutr **116**(4): 641-654.
- Weir, C. J., Gibson, I. F. and Martin, W. (1991). "Effects of metabolic inhibitors on endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilatation of rat and rabbit aorta." Br J Pharmacol **102**(1): 162-166.
- Weiss, E. P., Racette, S. B., Villareal, D. T., Fontana, L., Steger-May, K., Schechtman, K. B., Klein, S. and Holloszy, J. O. (2006). "Improvements in glucose tolerance and

- insulin action induced by increasing energy expenditure or decreasing energy intake: a randomized controlled trial." *Am J Clin Nutr* **84**(5): 1033-1042.
- Weitzdoerfer, R., Hoeger, H., Engidawork, E., Engelmann, M., Singewald, N., Lubec, G. and Lubec, B. (2004). "Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performance." *Nitric Oxide* **10**(3): 130-140.
- Wellen, K. E. and Hotamisligil, G. S. (2005). "Inflammation, stress, and diabetes." *J Clin Invest* **115**(5): 1111-1119.
- Wendel-Vos, G. C., Schuit, A. J., Feskens, E. J., Boshuizen, H. C., Verschuren, W. M., Saris, W. H. and Kromhout, D. (2004). "Physical activity and stroke. A meta-analysis of observational data." *Int J Epidemiol* **33**(4): 787-798.
- West, D. B., Boozer, C. N., Moody, D. L. and Atkinson, R. L. (1992). "Dietary obesity in nine inbred mouse strains." *Am J Physiol* **262**(6 Pt 2): R1025-1032.
- White, A. R., Ryoo, S., Li, D., Champion, H. C., Stepan, J., Wang, D., Nyhan, D., Shoukas, A. A., Hare, J. M. and Berkowitz, D. E. (2006). "Knockdown of arginase I restores NO signaling in the vasculature of old rats." *Hypertension* **47**(2): 245-251.
- Whittle, B. J., Moncada, S. and Vane, J. R. (1978). "Comparison of the effects of prostacyclin (PGI₂), prostaglandin E₁ and D₂ on platelet aggregation in different species." *Prostaglandins* **16**(3): 373-388.
- Widlansky, M. E., Hamburg, N. M., Anter, E., Holbrook, M., Kahn, D. F., Elliott, J. G., Keaney, J. F., Jr. and Vita, J. A. (2007). "Acute EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease." *J Am Coll Nutr* **26**(2): 95-102.
- Williamson, K., Stringer, S. E. and Alexander, M. Y. (2012). "Endothelial progenitor cells enter the aging arena." *Front Physiol* **3**: 30.
- Wilson, P. W., Garrison, R. J., Castelli, W. P., Feinleib, M., McNamara, P. M. and Kannel, W. B. (1980). "Prevalence of coronary heart disease in the Framingham Offspring Study: role of lipoprotein cholesterol." *Am J Cardiol* **46**(4): 649-654.
- Wingler, K., Wunsch, S., Kreuz, R., Rothermund, L., Paul, M. and Schmidt, H. H. (2001). "Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo." *Free Radic Biol Med* **31**(11): 1456-1464.
- Winkles, J. A., Alberts, G. F., Brogi, E. and Libby, P. (1993). "Endothelin-1 and endothelin receptor mRNA expression in normal and atherosclerotic human arteries." *Biochem Biophys Res Commun* **191**(3): 1081-1088.
- Wisloff, U., Stoylen, A., Loennechen, J. P., Bruvold, M., Rognum, O., Haram, P. M., Tjonna, A. E., Helgerud, J., Slordahl, S. A., Lee, S. J., Videm, V., Bye, A., Smith, G. L., Najjar, S. M., Ellingsen, O. and Skjaerpe, T. (2007). "Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study." *Circulation* **115**(24): 3086-3094.
- Wolf, D., Laver-Rudich, Z. and Rotter, V. (1985). "In vitro expression of human p53 cDNA clones and characterization of the cloned human p53 gene." *Mol Cell Biol* **5**(8): 1887-1893.
- Wolfum, S., Jensen, K. S. and Liao, J. K. (2003). "Endothelium-dependent effects of statins." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(5): 729-736.
- Wong, C. M., Zhou, Y., Ng, R. W., Kung Hf, H. F. and Jin, D. Y. (2002). "Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress." *J Biol Chem* **277**(7): 5385-5394.

- Wong, S. L., Leung, F. P., Lau, C. W., Au, C. L., Yung, L. M., Yao, X., Chen, Z. Y., Vanhoutte, P. M., Gollasch, M. and Huang, Y. (2009). "Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin F2alpha mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging." *Circ Res* **104**(2): 228-235.
- Wood, J. G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S. L., Tatar, M. and Sinclair, D. (2004). "Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans." *Nature* **430**(7000): 686-689.
- Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J. and Poole, L. B. (2003). "Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins." *Trends Biochem Sci* **28**(1): 32-40.
- Woods, J. A., Ccedia, M. A., Wolters, B. W., Evans, J. K., Lu, Q. and McAuley, E. (1999). "Effects of 6 months of moderate aerobic exercise training on immune function in the elderly." *Mech Ageing Dev* **109**(1): 1-19.
- Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y., Muschel, R., Hamilton, S. R., Spinner, N. B., Markowitz, S., Wu, G. and el-Deiry, W. S. (1997). "KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene." *Nat Genet* **17**(2): 141-143.
- Wu, S., Ruan, Y., Yin, M. and Lai, W. (2007). "Research on the age-related changes in the nitric oxide pathway in the arteries of rats and the intervention effect of dehydroepiandrosterone." *Gerontology* **53**(4): 234-237.
- Wu, T. C., Chao, C. Y., Lin, S. J. and Chen, J. W. (2012). "Low-dose dextromethorphan, a NADPH oxidase inhibitor, reduces blood pressure and enhances vascular protection in experimental hypertension." *PLoS One* **7**(9): e46067.
- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D. and Levine, A. J. (1993). "The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop." *Genes Dev* **7**(7A): 1126-1132.
- Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M. N. (2006). "TOR signaling in growth and metabolism." *Cell* **124**(3): 471-484.
- Xia, E., Rao, G., Van Remmen, H., Heydari, A. R. and Richardson, A. (1995). "Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction." *J Nutr* **125**(2): 195-201.
- Xie, Q. W., Whisnant, R. and Nathan, C. (1993). "Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide." *J Exp Med* **177**(6): 1779-1784.
- Xiong, Y., Yuan, L. W., Deng, H. W., Li, Y. J. and Chen, B. M. (2001). "Elevated serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and endothelial dysfunction in aged rats." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**(10): 842-847.
- Yamamori, T., White, A. R., Mattagajasingh, I., Khanday, F. A., Haile, A., Qi, B., Jeon, B. H., Bugayenko, A., Kasuno, K., Berkowitz, D. E. and Irani, K. (2005). "P66shc regulates endothelial NO production and endothelium-dependent vasorelaxation: implications for age-associated vascular dysfunction." *J Mol Cell Cardiol* **39**(6): 992-995.
- Yamamoto, E., Kataoka, K., Dong, Y. F., Koibuchi, N., Toyama, K., Sueta, D., Katayama, T., Yasuda, O., Ogawa, H. and Kim-Mitsuyama, S. (2012). "Calcium channel blockers, more than diuretics, enhance vascular protective effects of angiotensin receptor blockers in salt-loaded hypertensive rats." *PLoS One* **7**(6): e39162.
- Yanagisawa, M., Inoue, A., Ishikawa, T., Kasuya, Y., Kimura, S., Kumagaye, S., Nakajima, K., Watanabe, T. X., Sakakibara, S., Goto, K. and et al. (1988a). "Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(18): 6964-6967.

- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Goto, K. and Masaki, T. (1988b). "A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels." *J Hypertens Suppl* **6**(4): S188-191.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T. (1988c). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." *Nature* **332**(6163): 411-415.
- Yang, D., Feletou, M., Boulanger, C. M., Wu, H. F., Levens, N., Zhang, J. N. and Vanhoutte, P. M. (2002). "Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats." *Br J Pharmacol* **136**(1): 104-110.
- Yang, D., Gluais, P., Zhang, J. N., Vanhoutte, P. M. and Feletou, M. (2004a). "Endothelium-dependent contractions to acetylcholine, ATP and the calcium ionophore A 23187 in aortas from spontaneously hypertensive and normotensive rats." *Fundam Clin Pharmacol* **18**(3): 321-326.
- Yang, H., Roberts, L. J., Shi, M. J., Zhou, L. C., Ballard, B. R., Richardson, A. and Guo, Z. M. (2004b). "Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E." *Circ Res* **95**(11): 1075-1081.
- Yasari, S., Paquette, A., Charbonneau, A., Gauthier, M. S., Savard, R. and Lavoie, J. M. (2006). "Effects of ingesting a high-fat diet upon exercise-training cessation on fat accretion in the liver and adipose tissue of rats." *Appl Physiol Nutr Metab* **31**(4): 367-375.
- Yatera, Y., Shibata, K., Furuno, Y., Sabanai, K., Morisada, N., Nakata, S., Morishita, T., Toyohira, Y., Wang, K. Y., Tanimoto, A., Sasaguri, Y., Tasaki, H., Nakashima, Y., Shimokawa, H., Yanagihara, N., Otsuji, Y. and Tsutsui, M. (2010). "Severe dyslipidaemia, atherosclerosis, and sudden cardiac death in mice lacking all NO synthases fed a high-fat diet." *Cardiovasc Res* **87**(4): 675-682.
- Ye, Z. and Song, H. (2008). "Antioxidant vitamins intake and the risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies." *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **15**(1): 26-34.
- Yen, M. H., Yang, J. H., Sheu, J. R., Lee, Y. M. and Ding, Y. A. (1995). "Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation in spontaneously hypertensive rats." *Life Sci* **57**(24): 2205-2213.
- Yet, S. F., Layne, M. D., Liu, X., Chen, Y. H., Ith, B., Sibinga, N. E. and Perrella, M. A. (2003). "Absence of heme oxygenase-1 exacerbates atherosclerotic lesion formation and vascular remodeling." *FASEB J* **17**(12): 1759-1761.
- Yi, L., Lu, C., Hu, W., Sun, Y. and Levine, A. J. (2012). "Multiple roles of p53-related pathways in somatic cell reprogramming and stem cell differentiation." *Cancer Res* **72**(21): 5635-5645.
- Yildiz Akar, F., Ulak, G., Tanyeri, P., Erden, F., Utkan, T. and Gacar, N. (2007). "7-Nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, impairs passive-avoidance and elevated plus-maze memory performance in rats." *Pharmacol Biochem Behav* **87**(4): 434-443.
- Yokoyama, C., Yabuki, T., Shimonishi, M., Wada, M., Hatae, T., Ohkawara, S., Takeda, J., Kinoshita, T., Okabe, M. and Tanabe, T. (2002). "Prostacyclin-deficient mice develop ischemic renal disorders, including nephrosclerosis and renal infarction." *Circulation* **106**(18): 2397-2403.
- Yoon, K. A., Nakamura, Y. and Arakawa, H. (2004). "Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses." *J Hum Genet* **49**(3): 134-140.

- Yoshida, S., Katoh, T., Tetsuka, T., Uno, K., Matsui, N. and Okamoto, T. (1999). "Involvement of thioredoxin in rheumatoid arthritis: its costimulatory roles in the TNF-alpha-induced production of IL-6 and IL-8 from cultured synovial fibroblasts." J Immunol **163**(1): 351-358.
- Youn, J. Y., Gao, L. and Cai, H. (2012). "The p47phox- and NADPH oxidase organizer 1 (NOXO1)-dependent activation of NADPH oxidase 1 (NOX1) mediates endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling and endothelial dysfunction in a streptozotocin-induced murine model of diabetes." Diabetologia **55**(7): 2069-2079.
- Yu, B. P., Masoro, E. J. and McMahan, C. A. (1985). "Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics." J Gerontol **40**(6): 657-670.
- Yu, C. and Thorin, E. (2013). "Angiopietin like-2 knock-down improves the lipid profile of high-fat diet-fed mice and maintains vascular endothelial function." FASEB J **27**(Meeting Abstract Supplement): 1138.1110.
- Yu, J., Wang, Z., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Zhang, L. (2003). "PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1931-1936.
- Zainal, T. A., Oberley, T. D., Allison, D. B., Szweda, L. I. and Weindruch, R. (2000). "Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle." FASEB J **14**(12): 1825-1836.
- Zarzuelo, M. J., Lopez-Sepulveda, R., Sanchez, M., Romero, M., Gomez-Guzman, M., Ungvary, Z., Perez-Vizcaino, F., Jimenez, R. and Duarte, J. (2013). "SIRT1 inhibits NADPH oxidase activation and protects endothelial function in the rat aorta: implications for vascular aging." Biochem Pharmacol **85**(9): 1288-1296.
- Zeng, G. and Quon, M. J. (1996). "Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells." J Clin Invest **98**(4): 894-898.
- Zhang, Q. J., Wang, Z., Chen, H. Z., Zhou, S., Zheng, W., Liu, G., Wei, Y. S., Cai, H., Liu, D. P. and Liang, C. C. (2008). "Endothelium-specific overexpression of class III deacetylase SIRT1 decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Cardiovasc Res **80**(2): 191-199.
- Zhao, Y., Chaiswing, L., Velez, J. M., Batinic-Haberle, I., Colburn, N. H., Oberley, T. D. and St Clair, D. K. (2005). "p53 translocation to mitochondria precedes its nuclear translocation and targets mitochondrial oxidative defense protein-manganese superoxide dismutase." Cancer research **65**(9): 3745-3750.
- Zhou, L. and Zhu, D. Y. (2009). "Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications." Nitric Oxide **20**(4): 223-230.
- Zilfou, J. T. and Lowe, S. W. (2009). "Tumor suppressive functions of p53." Cold Spring Harbor perspectives in biology **1**(5): a001883.
- Zimmet, P. Z., Whitehouse, S., Jackson, L. and Thoma, K. (1978). "High prevalence of hyperuricaemia and gout in an urbanised Micronesian population." Br Med J **1**(6122): 1237-1239.
- Zmijewski, J. W., Moellering, D. R., Le Goffe, C., Landar, A., Ramachandran, A. and Darley-Usmar, V. M. (2005). "Oxidized LDL induces mitochondrially associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(2): H852-861.
- Zou, M. H., Shi, C. and Cohen, R. A. (2002). "High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H(2) receptor-mediated apoptosis and adhesion

- molecule expression in cultured human aortic endothelial cells." Diabetes **51**(1): 198-203.
- Zou, Y., Jung, K. J., Kim, J. W., Yu, B. P. and Chung, H. Y. (2004). "Alteration of soluble adhesion molecules during aging and their modulation by calorie restriction." FASEB J **18**(2): 320-322.
- Zou, Y., Yoon, S., Jung, K. J., Kim, C. H., Son, T. G., Kim, M. S., Kim, Y. J., Lee, J., Yu, B. P. and Chung, H. Y. (2006). "Upregulation of aortic adhesion molecules during aging." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **61**(3): 232-244.
- Zuckerman, V., Wolyniec, K., Sionov, R. V., Haupt, S. and Haupt, Y. (2009). "Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence." J Pathol **219**(1): 3-15.

