

Université de Montréal

**Implication des cellules Nestin⁺ dans le remodelage
vasculaire en conditions pathologiques.**

Par Kim Tardif

Département des Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté Médecine
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae Doctor*
en Sciences Biomédicales
Option générale

Octobre, 2014

© Kim Tardif, 2014

Résumé

La protéine de filament intermédiaire Nestin, marqueur de cellules souches neurales, est exprimée dans les cellules vasculaires. Il a été démontré que les cellules de la crosse aortique dérivent de la crête neurale pendant le développement. Des cellules endothéliales exprimant Nestin sont retrouvées dans les capillaires durant l'embryogénèse ainsi que durant la vascularisation de tumeurs cancéreuses. Cette protéine est impliquée dans les mécanismes de prolifération cellulaire. Récemment des cellules Nestin⁺ ont été identifiées au niveau des cellules du muscle lisse de l'aorte. La régulation de Nestin dans ces cellules, pendant le développement et en conditions pathologiques, est inconnue. Cette thèse porte sur l'analyse de la protéine Nestin dans le remodelage vasculaire en situation diabétique et d'hypertension au niveau des artères carotide et aortique. Nos travaux examinent l'hypothèse que l'expression vasculaire de Nestine joue un rôle dans l'homéostasie durant le vieillissement physiologique et participe au remodelage suite à des stimuli pathologiques.

La protéine Nestin est fortement exprimée dans les aortes de rats néonataux et cette expression diminue rapidement avec le développement. Au niveau de l'aorte l'expression de la protéine Nestin est retrouvée dans une sous-population de cellules du muscle lisse et au niveau des cellules endothéliales. L'expression de la protéine Nestin est corrélée avec sa proximité au cœur, une plus grande expression est observée dans l'arche aortique et une faible expression est détectée dans la partie thoracique. Nous avons déterminé qu'en présence de diabète de type I, il y a une perte de l'expression de la protéine Nestin dans la média de l'aorte et de la carotide. Cette perte d'expression représente un évènement précoce dans la pathologie diabétique et précède la dysfonction endothéliale. La diminution de l'expression de la protéine Nestin est également concomitante avec la perte de la capacité proliférative des cellules du muscle lisse. Dans les rats souffrant de diabète de type 1, une réduction significative de la densité des cellules du muscle lisse exprimant la protéine phosphorylée phosphohistone 3, une protéine impliquée dans un cycle cellulaire actif, est observée. De plus, cette réduction est corrélée avec la perte de l'expression de la protéine Nestin. Nous avons également démontré

in vitro qu'un traitement hyperglycémique réduit l'expression de Nestin ainsi que la prolifération des cellules du muscle lisse. Enfin, l'utilisation d'un shARN dirigé contre Nestin nous a permis de déterminer l'implication de cette protéine dans la prolifération des cellules du muscle lisse en condition basale caractérisée par la diminution de l'incorporation de [³H] thymidine.

Dans le modèle d'hypertension induite par une constriction aortique abdominale surrénale, l'augmentation de la pression sanguine est associée avec l'augmentation de l'expression de la protéine Nestin dans l'artère carotidienne. Une corrélation positive a été observée entre l'expression de la protéine Nestin dans la carotide et la pression artérielle moyenne à laquelle la paroi de la carotide est soumise. De plus, les facteurs de croissance impliqués dans le remodelage vasculaire secondaire à l'hypertension augmentent l'expression de Nestin dans les cellules du muscle lisse isolées des carotides. Puis, la réduction de l'expression de la protéine Nestin via un shARN atténue l'incorporation de [³H] thymidine, associée à la prolifération cellulaire, stimulée par ces facteurs de croissance alors que l'incorporation de [³H] leucine, associée à la synthèse protéique, demeure inchangée. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression de la protéine Nestin, secondaire à l'hypertension, pourrait représenter une réponse adaptative où il y a une augmentation de la croissance des cellules du muscle lisse afin de permettre à la paroi vasculaire de s'ajuster à l'augmentation de la pression sanguine.

Mots-clés : Nestine, Cellules musculaires lisses, Cellules endothéliales, Diabète, Hypertension, Remodelage vasculaire, Angiogenèse

Abstract

The intermediate filament protein Nestin, previously identified as a neural stem cell marker, is expressed in vascular cells. It has been shown that aortic cells expressing Nestin originate from the neural crest. Endothelial Nestin⁺ cells are found in capillaries during embryogenesis and in during tumour vascularization. Nestin expression is a characteristic feature of the proliferative endothelium. However, Nestin⁺ expression was also detected in smooth muscle cells in the vascular wall of the rat aorta. The regulation of Nestin expression in physiological development and pathological situations remain unknown. The focus of the following studies consists of analyzing Nestin expression in the carotid and aorta during vascular remodeling secondary to type I diabetes or hypertension. The present study tested the hypothesis that Nestin expression plays a role in vascular homeostasis during the physiological postnatal development and in vascular pathologies.

Nestin protein levels were strongly expressed in the neonatal rat aorta and its expression was reduced with physiological development. Nestin expression was found in endothelial cells and in a subpopulation of vascular smooth muscle cells. Nestin protein expression in vascular smooth muscle cells in the aorta correlated with the proximity of the vessel to the heart, with levels of expression greater in the aortic arch versus the thoracic region. We have determined that the intermediate filament protein was downregulated in an experimental model of type I diabetes. This loss of Nestin expression was an early event in diabetic pathology preceding endothelial dysfunction. The decreased expression of Nestin was associated with the reduced entry of vascular smooth muscle cells into the cell cycle. The density of vascular smooth muscle cells expressing phosphorylated phosphohistone 3 in type I diabetic rats was significantly decreased and correlated with the loss of Nestin expression. *In vitro* experiments recapitulated the *in vivo* findings as the exposure of VSMCs to hyperglycaemia reduced Nestin expression and concomitantly inhibited VSMCs proliferation. The proliferative role of Nestin was confirmed as shRNA-mediated depletion of the

intermediate filament protein decreased basal proliferation of vascular smooth muscle cells, as reflected by a reduced uptake of [³H] thymidine.

In a rat model of pressure-overload, the accompanying hypertensive response was associated with the increased Nestin expression in the carotid artery. A positive correlation was observed between Nestin expression in the carotid artery and mean arterial pressure. Furthermore, peptide growth factors implicated in vascular remodelling secondary to hypertension increased Nestin expression in vascular smooth muscle cells. Lastly, the depletion of Nestin expression via a shRNA attenuated peptide growth factor stimulated the uptake of [³H] thymidine, associated with cell proliferation, whereas the uptake of [³H] leucine, associated with the protein synthesis was unaffected. These data suggest that Nestin upregulation in the vasculature secondary to hypertension may represent an adaptive response to promote vascular smooth muscle cell growth to accommodate the increase in blood pressure

Keywords: Nestin, Smooth muscle cells, Endothelial cells, Diabetes, Hypertension, Vascular remodelling and Angiogenesis

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Liste des abréviations	xiii
Liste des tableaux.....	xvii
Liste des figures.....	xix
Remerciements	xxiii
Avant propos	xxvi
Introduction.....	1
1.1 Le système cardiovasculaire.....	2
1.1.1 Le cœur et les vaisseaux au cours du développement de l’embryon	3
1.1.2 Les vaisseaux sanguins	6
1.1.2.1 Structure des vaisseaux.....	7
1.1.2.1.1 Intima.....	7
1.1.2.1.2 Média.....	7
1.1.2.1.3 Adventice.....	9
1.1.3 Types d’artères.....	9
1.1.3.1 Les artères élastiques, de conduction ou de compliance.....	9
1.1.3.2 Les artères musculaires ou de distribution.....	9
1.1.3.3 Les artères de résistance.....	10
1.1.4 Les cellules vasculaires	10
1.1.4.1 Les cellules endothéliales	10
1.1.4.1.1 Fonction endothéliale	12
1.1.4.1.2 Dysfonction endothéliale	13
1.1.4.1.3 Les facteurs de risques de la dysfonction endothéliale	14
1.1.4.1.3.1 Le diabète	14
1.1.4.1.3.2 L’hypertension	14
1.1.4.1.3.3 L’hypercholestérolémie et obésité.....	15
1.1.4.1.3.4 Le tabagisme et la pollution	15

1.1.4.1.3.5 Les estrogènes	15
1.1.4.1.3.6 L'âge	16
1.1.4.2 Les cellules musculaires lisses.....	16
1.1.4.2.1 Fonction des cellules muscles lisses	20
1.1.4.2.2 La prolifération des CML et cycle cellulaire	20
1.1.4.3 Les cellules progénitrices résidentes des vaisseaux.....	22
1.1.5 Le remodelage vasculaire	23
1.1.5.1 Remodelage eutrophique.....	24
1.1.5.2 Remodelage hypertrophique.....	24
1.1.5.3 Fibrose vasculaire	25
1.1.5.4 Formation de l'athérosclérose	26
1.1.6 Le remodelage cardiaque	28
1.1.6.1 Hypertrophie concentrique	29
1.1.6.2 Hypertrophie excentrique.....	29
1.1.6.3 Fibrose ventriculaire	30
1.2 Le diabète.....	32
1.2.1 Types de diabète.....	32
1.2.1.1 Diabète de type 1.....	32
1.2.1.2 Diabète de type 2.....	33
1.2.1.3 Diabète gestationnel.....	33
1.2.2 Développement du diabète	34
1.2.2.1 Obésité et inflammation	34
1.2.2.2 Syndrome métabolique et hyperglycémie	35
1.2.2.3 Résistance à l'insuline	36
1.2.3 Dysfonction endothéliale	38
1.2.4 Complications vasculaires du diabète	39
1.2.4.1 Complication de la microvasculature.....	39
1.2.4.1.1 Neuropathie.....	39
1.2.4.1.2 Rétinopathie	40
1.2.4.1.3 Néphropathie	40
1.2.4.2 Complication de la macrovasculature.....	41
1.2.4.2.1 Maladies cardiovasculaires	41

1.2.4.2.1.1 Cardiopathie et insuffisance cardiaque.....	41
1.2.4.2.1.2 Accidents vasculaires cérébraux.....	42
1.2.4.2.1.3 Infarctus du myocarde.....	42
1.2.4.2.2 Maladies des artères périphériques	43
1.2.5 Le développement de l'hypertension en situation diabétique.....	43
1.2.6 Impact du diabète sur le remodelage vasculaire.....	44
1.2.7 Impact du diabète sur la réparation vasculaire et l'angiogenèse	47
1.3 Hypertension	49
1.3.1. Régulation de la pression sanguine	49
1.3.1.1 Le cœur.....	50
1.3.1.2 Les vaisseaux sanguins.....	51
1.3.1.2.1 Régulation par un changement de la pression sanguine	51
1.3.1.2.2 Régulation hormonale de la pression sanguine.....	52
1.3.1.2.2.1 Le système rénine-angiotensine-aldostérone.....	52
1.3.1.2.2.2 L'adrénaline et la noradrénaline.....	53
1.3.1.2.2.2.1 Les récepteurs adrénergiques.....	53
1.3.1.2.2.2.1.1 Les récepteurs adrénergiques alpha.....	53
1.3.1.2.2.2.1.2 Les récepteurs adrénergiques bêta.....	55
1.3.1.2.2.3 L'hormone antidiurétique.....	55
1.3.1.2.2.4 Le peptide natriurétique auriculaire.....	56
1.3.1.2.3 La régulation locale de la pression sanguine.....	56
1.3.2 Système rénine - angiotensine - aldostérone.....	56
1.3.2.1 Les composants du système rénine-angiotensine-aldostérone.....	57
1.3.2.1.1 L'angiotensinogène.....	57
1.3.2.1.2 La rénine.....	58
1.3.2.1.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine.....	58
1.3.2.1.4 L'angiotensine.....	59
1.3.2.1.4.1 Les récepteurs à l'angiotensine	60
1.3.2.1.4.2 Distribution des récepteurs à l'angiotensine	61
1.3.2.1.4.3 Signalisation.....	62
1.3.2.1.5 L'aldostérone.....	62
1.3.3 Conséquences de l'hypertension sur le système cardiovasculaire.....	63
1.3.3.1 Le remodelage cardiaque.....	63
1.3.3.2 Le remodelage vasculaire.....	64

1.3.3.2.1 L'hypertension sur les cellules endothéliales	64
1.3.3.2.2 L'hypertension sur les cellules musculaires lisses	65
1.3.3.2.3 Remodelage eutrophique	65
1.3.3.2.4 Remodelage hypertrophique.....	65
1.3.3.2.5 Fibrose vasculaire	66
1.3.4 L'hypertension sur la réparation vasculaire	67
1.4 Nestin.....	68
1.4.1 Le cytosquelette de la cellule eucaryote	68
1.4.1.1 Les filaments intermédiaires.....	69
1.4.1.1.1 Assemblage des protéines des filaments intermédiaires	70
1.4.1.1.2 Les filaments intermédiaires de la paroi vasculaire	72
1.4.2 La protéine de filament intermédiaire Nestin	73
1.4.2.1 Le gène <i>nestin</i>	73
1.4.2.2 La protéine Nestin.....	73
1.4.2.3 La distribution de la protéine Nestin	75
1.4.2.4 L'expression de Nestin	76
1.4.2.4.1 L'expression de Nestin dans les cellules endothéliales	76
1.4.2.4.2 L'expression de Nestin dans les cellules musculaires.....	77
1.4.2.5 Régulation de l'expression de Nestin.....	77
1.4.2.6 Les fonctions cellulaires de Nestin.....	79
1.4.2.6.1 Rôle dans la protection contre le stress oxydatif et la survie cellulaire.....	79
1.4.2.6.2 Rôle dans la régulation de la différenciation cellulaire	80
1.4.2.6.3 Rôle dans l'angiogenèse.....	81
1.4.2.6.4 Rôle dans régénération tissulaire cardiaque.....	82
1.5 Problématique et but du projet	84
2 Articles scientifiques	86
2.1 Nestin downregulation in rat vascular smooth muscle cells represents an early marker of vascular disease in experimental type I diabetes	87
2.1.2 Abstract	88
2.1.3 Background	90
2.1.4 Methods.....	92
2.1.5 Results.....	96

2.1.6 Discussion	101
2.1.7 References	107
2.1.8 Figure Legends	111
2.1.9 Figure 1	114
2.1.10 Figure 2	116
2.1.11 Figure 3	117
2.1.12 Figure 4	118
2.1.13 Figure 5	119
2.1.14 Figure 6	121
2.1.15 Table 1. Vascular remodeling of the carotid artery and aorta of normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats	123
2.1.16 Table 2. Cardiac function of normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats	124
2.1.17 Table 3. Vascular morphology of the carotid artery and aorta of normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats	125
2.1.18 Supplemental Figure Legends	126
2.1.19 Supplemental Figure 1	127
2.1.20 Supplemental Figure 2	128
2.1.21 Supplemental Figure 3	129
2.1.22 Supplemental Figure 4	130
2.2 Nestin upregulation characterizes rat carotid artery remodelling secondary to hypertension	131
2.2.1 Abstract	133
2.2.2 Introduction	135
2.2.3 Methods	137
2.2.3 Results	143
2.2.4 Discussion	149
2.2.5 References	155
2.2.6 Figure Legends	161
2.2.7 Figure 1	164
2.2.8 Figure 2	167

2.2.9 Figure 3	172
2.2.10 Figure 4	176
2.2.11 Table 1. Hemodynamics of Sham and 2-Week Suprarenal Abdominal Aortic Constricted (SAC) Rats.....	178
2.2.12 Table 2. Body and Heart Weight of Sham and 2-Week Suprarenal Abdominal Aortic Constricted (SAC) Rats.....	179
2.2.13 Table 3 Vessel morphology of sham and 2 week suprarenal abdominal aortic constricted (SAC) rats.....	180
3 Discussion.....	181
3.1 L'effet du diabète de type 1 sur la capacité proliférative des cellules vasculaires : Implication de la protéine Nestin.....	184
3.1.1 L'effet du diabète de type 1 sur la paroi vasculaire.....	184
3.1.1.1 Le remodelage et la réactivité vasculaire des artères aortique et carotidienne dans un modèle de diabète de type 1 chez le rat	185
3.1.2 Cellules vasculaires prolifératives en situations physiologiques et pathologiques. 189	
3.1.2.1 L'expression de Nestin dans les cellules endothéliales prolifératives	190
3.1.2.2 L'expression de Nestin dans les cellules musculaires lisses prolifératives	192
3.1.3 Implication de la protéine Nestin dans la régulation du cycle cellulaire	197
3.1.3.1 L'interaction de la protéine Nestin avec des protéines du cycle cellulaire	199
3.1.3.2 Les protéines Nestin, CDK5 et p35 dans les cellules musculaires lisses vasculaires en situation diabétique.....	200
3.2 Implication de la protéine Nestin dans le remodelage cardiovasculaire chez les rats hypertendus.	203
3.2.1 Effet de la constriction aortique abdominale surrénale sur le système cardiovasculaire du rat.....	203
3.2.1.1 Les vaisseaux de rat hypertendus.....	204
3.2.1.1.1 Les changements morphologiques.....	205
3.2.1.1.2 L'impact de l'angiotensine sur l'hypertrophie des vaisseaux	208
3.2.2 Effet de l'hypertension sur l'expression de Nestin dans la paroi vasculaire.	209
3.2.2.1 L'expression de Nestin dans les cellules endothéliales	210

3.2.2.2 L'expression de Nestin dans les cellules musculaires lisses <i>in vivo</i>	212
3.2.2.3 L'expression de Nestin dans les cellules musculaires lisses <i>in vitro</i>	214
3.2.3 Le cœur du rat hypertendu	217
3.2.3.1 Les changements hémodynamiques	218
3.2.3.2 Les changements morphologiques	218
3.2.3.3 L'impact de l'angiotensine sur l'hypertrophie du cœur	221
3.2.4 La protéine Nestin dans le cœur de rat hypertendu : Implication dans le remodelage ?	222
3.2.4.1 L'expression de Nestin dans le myocarde.....	222
3.2.4.2 L'expression de Nestin dans les vaisseaux du myocarde	224
4 Conclusion	227
5 Bibliographie	230
Annexe 1 : Modèles Animaux	i
Annexe 2 : Résultats complémentaires inclus dans la section 3 Discussion.....	iv

Liste des abréviations

ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADMA	Diméthylarginine asymétrique
AGEs	Produits de la fin de glycation avancée
Ang	Angiotensine
ANP	Peptide natriurétique auriculaire
ApoB	Apolipoprotéine B
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT	Récepteur à l'angiotensine
ATP	Adénosine triphosphate
AVB	Nœud auriculo-ventriculaire
AVC	Canal auriculo-ventriculaire
AVN	Nœud sinusal
AVJ	Jonction auriculo-ventriculaire
BB	Branches du faisceau
bFGF	Facteur de croissance basique des fibroblastes
BH ₄	Tétrahydrobiopterine
CDK	Cycline dépendante des protéines kinases
CE	Cellules endothéliales
CEP	Cellules endothéliales progénitrices
CML	Cellules du muscle lisse
CO ₂	Gaz carbonique
COX	Cyclooxygénase
CNS	Système nerveux central
CRBP-1	Protéine -1 liant le rétinol cellulaire

CRP	Protéine réactive C
DBB	Branches distales du faisceau
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2
EDRF	Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium
EDCF	Facteurs de constriction dérivés de l'endothélium
EGF,	Facteur de croissance épidermique
eNOS,	Oxyde nitrique synthétase endothéliale
ET-1	Endothéline-1
GFAP	Protéine gliale fibrillaire acide
GFP	Protéine fluorescente verte
HIF-1- α	Facteur induit par l'hypoxie
HMG CoA réductase	Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase
H ₂ O	Eau
ICAM	Molécules d'adhésion intravasculaires
IL	Interleukine
IFT	Voie d'entrée
IRS-1	récepteur à l'insuline-1
IVC	Veine cave inférieure
IVS	Septum inter-ventriculaire
K	Potassium
kDa	Kilo dalton
LA	Oreillette gauche
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LV	Ventricule gauche
MAPKs	Protéine mitogène à activité kinase
MCP-1	Protéine chimioattractante des monocytes
MMP	Métalloprotéinases de la matrice extracellulaire
MSC	Cellules souches mésenchymales

Na	Sodium
NFkB	Facteur nucléaire kappa B
NN	Néonataux
NO	Oxyde nitrique
OMS	Organisation mondiale de la santé
O ₂	Oxygène
ONOO-	Perroxydinitrite
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PI3K	Phosphatidylinositol 3 phosphate kinase
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PLC	Phospholipase C
PGI ₂	prostacycline
PHH3	Phosphohistone 3
PKC	Protéine kinase C
PF	Fibres de Purkinje
OFT	Voie de sortie
RA	Oreillette droite
RAGE	Récepteurs des produits de la fin de glycation avancée
RI	Résistance à l'insuline
ROS	Espèces réactives oxygénées
RV	Ventricule droit
SAN	Faisceau auriculo-ventriculaire
SERCA	Pompe ATPase calcique du réticulum sarco-endoplasmique
SDF-1	Facteur dérivé du stroma -1
shARN	Petit ARN en épingle à cheveux (ARN hairpin)
SMA	Actine du muscle lisse
SM-22- α	Protéine 22-alpha du muscle lisse
SM-MHC	Chaîne lourde de la myosine du muscle lisse
SRAA	Système rénine-angiotensine-aldostérone

SVC	Veine cave supérieure
TGF- β	Facteur de croissance transformant bêta
TNF- α	Facteur nécrosant des tumeurs α
VCAM	Molécules d'adhésion des cellules vasculaires
VEGFR-2	Récepteur 2 du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité
vWf	Facteur de Van Willebrand

Liste des tableaux

Chapitre 1

Table 1. Le cytosquelette des cellules eucaryotes.....69

Table 2. Les catégories de filaments intermédiaires70

Chapitre 2.1

Table 1. Vascular remodelling of the carotid artery and aorta of normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats123

Table 2. Cardiac function of normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats.....124

Table 3. Vascular morphology of the carotid artery and aorta of normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats125

Chapitre 2.2

Table 1. Hemodynamics of sham and 2 week suprarenal abdominal aortic constricted (SAC) rats.....178

Table 2. Body and heart weight of sham and 2 week suprarenal abdominal aortic constricted (SAC) rats179

Table 3 Vessel morphology of sham and 2 week suprarenal abdominal aortic constricted (SAC) rats.....180

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1. Anatomie du cœur.	3
Figure 2. Changements morphologiques du cœur et remodelage des vaisseaux au cours du développement chez les vertébrés.	5
Figure 3. Morphologie des vaisseaux sanguins.	8
Figure 4. Morphologie des cellules endothéliales <i>in vitro</i>	11
Figure 5. Origine des cellules musculaires lisses formant les vaisseaux sanguins.	17
Figure 6. Morphologie des cellules musculaires lisses <i>in vitro</i>	19
Figure 7. Distribution des cellules progénitrices dans la paroi vasculaire.	23
Figure 8. Remodelage vasculaire	25
Figure 9. Formation et développement de la plaque d'athérosclérose.	27
Figure 10. Le remodelage cardiaque.	30
Figure 11. Les récepteurs adrénergiques	53
Figure 12. Le système rénine-angiotensine- aldostérone.	54
Figure 13. Structure et assemblage des protéines des filaments intermédiaires.	57
Figure 14. Structure de la protéine Nestin	74
Figure 15. Régulation de l'expression de Nestin par le EGF et son récepteur.	78
Figure 16. Rôle régulateur de Nestin dans le cycle cellulaire des myocytes	81

Chapitre 2.1

Figure 1. Nestin expression in neonatal and adult rat vessels.	114
---	-----

Figure 2. Phenotype of cultured VSMCs.	116
Figure 3. Nestin depletion and DNA synthesis.	117
Figure 4. Nestin ⁽⁺⁾ - VSMCs were actively involved in the cell cycle; impact of type I diabetes	118
Figure 5. Endothelial reactivity and Nestin expression in type I diabetic rats.....	119
Figure 6. Hyperglycaemia, Nestin expression and DNA synthesis in VSMCs.	121
Suppl Figure 1. Lentivirus-sHRNAmir directed against Nestin.....	127
Suppl Figure 2. Vascular morphology.....	128
Suppl Figure 3. Hyperglycaemia downregulated Nestin protein expression in aortic VSMCs.....	129
Suppl Figure 4. The impact of hyperglycaemia on vascular smooth muscle cells.....	130

Chapitre 2.2

Figure 1. Nestin Protein Expression in the Vasculature of Suprarenal Abdominal Aorta Constricted Adult Male Rats.....	164
Figure 2. Nestin Expression in the Rat Vasculature and isolated Rat and Human Vascular Smooth Muscle Cells.....	167
Figure 3. Peptide Growth Factor Mediated DNA and Protein Synthesis and Nestin expression in Rat Carotid Artery- and Aortic- Derived Vascular Smooth Muscle Cells.....	172
Figure 4. Rat Carotid Artery-derived Vascular Smooth Muscle Cells Depleted of Nestin and Subsequent Impact on DNA and Protein Synthesis.....	176

Annexe 1

Figure 1. Modèle de diabète induit par injection de streptozotocin.....	ii
Figure 2. Modèle d'hypertension induite par une constriction aortique abdominale surrénale chez le rat.	iii

Annexe 2

Figure 1. Diminution de l'expression des cellules Nestin ⁺ <i>in vivo</i>	v
Figure 2. Expression de CDK5 dans les cellules du muscle lisse vasculaire.	vi
Figure 3 L'hyperglycémie inhibe la translocation de p35 dans les cellules du muscle lisse vasculaire.....	vii
Figure 4. Changements morphologiques des artères carotidiennes et aortiques suite à une constriction aortique abdominale surrénale.....	viii
Figure 5. Analyse de la fibrose vasculaire.....	ix
Figure 6. Hypertrophie du cœur.....	xi
Figure 7. Formation de la fibrose dans les cœurs des rats ayant subi une constriction aortique abdominale surrénale.....	xii
Figure 8 Expression de la protéine Nestin dans les cœurs.....	xiii
Figure 9 Expression de la protéine Nestin dans les cardiomyocytes et les fibroblastes du myocarde.....	xiv
Figure 10. Analyse de l'expression de Nestin dans la fibrose du myocarde.....	xv
Figure 11. Analyse de l'expression de Nestin dans zones périvasculaires.....	xvi

Je dédie ce travail à tous ceux qui croient en l'impossible.

*Aller au bout de ses rêves peut être un long chemin
parsemé d'épreuves. Cependant, la détermination et
la volonté nous permettent de faire tout ce que nous
voulons, même l'impossible si nous y croyons !*

Alors foncez !

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier les membres du jury, Stéphanie Lehoux, Jean-Philippe Gratton, Guy Rousseau et Éric Thorin, qui ont accepté de juger mon travail.

J'aimerais remercier le Dr. Jean-François Tanguay de m'avoir encouragé à poursuivre mes études doctorales et d'avoir toujours cru en mon potentiel. Ces années n'ont pas toujours été faciles, mais aujourd'hui en regardant le chemin parcouru, je constate que j'ai appris énormément tant sur le plan scientifique que personnel. Je me sens mieux outillée pour faire face aux épreuves de la vie !

J'aimerais remercier le Dr. Angelo Calderone de m'avoir prise en codirection pour les deux dernières années de mon doctorat. Je vous remercie pour cette franchise qui vous caractérise. Je n'ai pas toujours eu envie d'entendre ce que vous aviez à me dire, mais ce retour à la réalité m'a grandement aidée dans mon parcours difficile. Je vous remercie de m'avoir donné la chance de mener à terme un projet de recherche dans votre laboratoire.

J'aimerais remercier mes collègues au sein du laboratoire du Dr. Tanguay. Geneviève Morin, Émilie Cossette, Corinne St-Denis et Geneviève DonPierre. Le temps passé à vous côtoyer durant mes années de maîtrise et de doctorat a filé trop vite et je me suis sentie bien seule quand vous avez tour à tour terminé vos études. Vous étiez des collègues géniales et vous êtes devenues des amies inestimables.

J'aimerais remercier le personnel de recherche du laboratoire du Dr. Tanguay. L'assistante de recherche, Pascale Geoffroy, comme une mère qui couvre ses petits. Les techniciennes de recherche Sandra Guilligan, Julie Lebel et Marie-Élaine Clavet, toujours

prêtes à nous aider. Enfin, l'associée de recherche Isabelle Cloutier, pour son soutien tout au long de mon parcours dans le laboratoire du Dr. Tanguay. Me séparer de vous tour à tour dans les circonstances que nous avons connues fut douloureux. Merci d'avoir fait partie de cette belle aventure qui se termine par la rédaction de cette thèse !

J'aimerais remercier mes collègues au sein du laboratoire du Dr. Calderone qui ont su m'accueillir, Andréanne Chabot, Vanessa Hertig et Marc-André Méus. Un merci spécial à Andréanne qui m'a soutenue avant ainsi que durant la transition de projet et qui est devenue une amie précieuse. Un merci spécial également à Vanessa pour son support technique et moral indéfectible. Tu as mis du soleil dans mes journées !

J'aimerais remercier les stagiaires que j'ai côtoyés durant mon doctorat dans les laboratoires du Dr. Tanguay et du Dr. Calderone, dont Nicolas Mercure-Corriveau, Bétina Émile, Félix Chagnon, Allisar Jaber, Naussicca Lakena Hour, Justine Dehedin et Camille Dumais qui m'ont procuré leur aide et qui m'ont permis de m'accomplir d'une autre façon soit celle d'enseigner et de transmettre mes savoirs.

J'aimerais remercier mes parents, qui ont été un support inconditionnel dans les moments les plus difficiles que j'ai eus à vivre jusqu'à présent dans ma courte existence. Papa ta grande sagesse et tes précieux conseils ont été et seront toujours appréciés. Merci d'avoir été là à chaque fois que j'ai eu besoin de toi. Ta force et ton courage dans la maladie me donnent de l'énergie pour continuer et mettre en perspective les difficultés de la vie. Maman, merci d'avoir été là pour moi. Nos longues conversations, ton support et ton réconfort de maman m'ont fait du bien même à mon âge ! Et rassure-toi maintenant, c'est vraiment la fin de mes études !!

Enfin, j'aimerais remercier mon mari. Tes conseils avisés, ton support indéfectible et ta présence m'ont rendu les moments difficiles tellement plus faciles. Sache que moi aussi je suis ta plus grande fan ! Depuis 10 ans maintenant tu partages ma vie, nous avons traversé

ensemble la distance, le stress, les angoisses mais surtout les moments magiques, les voyages et le bonheur d'avoir trouvé l'amour, le vrai. J'espère vivre encore beaucoup de moments de bonheur à deux et bientôt

Avant propos

La fonction endothéliale et la réactivité vasculaire sont grandement altérées en situations pathologiques et mènent à des atteintes vasculaires plus sévères comme en situation de diabète de type 1. En effet, il est suggéré que la perte de la fonction endothéliale résulte en une altération des mécanismes d'adaptation de la paroi vasculaire.

Le remodelage vasculaire est primordial dans la réponse d'adaptation aux changements hémodynamiques qui s'opèrent en situation diabétique ou d'hypertension. La prolifération cellulaire et le développement d'une fibrose vasculaire sont des phénomènes importants pour le maintien des fonctions vasculaires durant ces changements. La protéine Nestin est observée dans l'endothélium de nouveaux vaisseaux lors de la cicatrisation du cœur ainsi que lors de la vascularisation d'une tumeur. Cette protéine peut être impliquée dans la prolifération des cellules endothéliales, mais quand est-il de la population de cellules du muscle lisse présente dans les vaisseaux de plus gros calibres comme l'aorte et la carotide ? L'expression de Nestin ainsi que sa régulation dans la paroi vasculaire de l'aorte et de la carotide pendant le développement ainsi qu'en conditions pathologiques sont inconnues. Est-ce que cette protéine est exprimée au niveau vasculaire pendant le développement physiologique ? Est-ce que son expression peut être affectée par la présence de facteurs de risque des maladies cardiovasculaires comme le diabète de type 1 et l'hypertension ? Quel rôle la protéine Nestin joue-t-elle dans la réponse d'adaptation vasculaire suite à ces changements métaboliques et hémodynamiques ?

Les études présentées dans cette thèse ont été élaborées afin de répondre à ces questions. Elles soulignent l'importance de l'expression de la protéine Nestin dans le remodelage vasculaire en situation pathologique. Elles démontrent que Nestin joue un rôle dans la prolifération cellulaire physiologique dans la paroi vasculaire. Elles établissent également que l'expression de la protéine Nestin est altérée en situations pathologiques et qu'elle est impliquée dans le remodelage de la paroi vasculaire. Ces études démontrent globalement que la protéine Nestin est importante dans les mécanismes d'adaptation de la paroi vasculaire.

Introduction

1.1 Le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire se compose du sang, du cœur et de l'ensemble des vaisseaux sanguins.

Le sang se compose des cellules sanguines (globules blancs et rouges), des plaquettes et du plasma. Il est responsable du transport de l'oxygène (O_2) et du gaz carbonique (CO_2), des hormones et des nutriments. Il régule le pH de l'organisme et assure sa protection par la mise en place de mécanismes tels que la coagulation, impliquant les plaquettes, et l'immunité, impliquant les globules blancs. Les globules rouges ont comme fonction l'acheminement de l'oxygène aux différents tissus. Ils sont dépourvus de noyau, mais contiennent de l'hémoglobine, la protéine responsable du transport de l'oxygène. [1]

Responsable de la circulation sanguine [1], le cœur est une pompe musculaire autonome dotée d'un réseau de cellules auto-excitables, les cellules cardionectrices. Ces cellules régulent et rythment les potentiels d'action qui génèrent les contractions du cœur. [1] (Voir Figure 1. Anatomie du cœur)

Les vaisseaux sanguins diffèrent en taille et en composition comprenant notamment les coronaires qui irriguent le cœur ainsi que les artères et les veines qui conduisent le sang à travers tout l'organisme. (Voir Figure 3. Morphologie des vaisseaux sanguins). À chaque battement, le sang est dirigé dans deux directions simultanément, et ce, en circuit fermé. La circulation systémique représente la circulation sanguine débutant par le ventricule gauche et l'artère aortique pour atteindre les tissus alors que la circulation pulmonaire passe par le ventricule droit et les artères pulmonaires pour se diriger vers les poumons. Cette dernière permet l'acheminement du sang riche en CO_2 provenant des tissus vers les poumons. C'est à cet endroit que se produisent les échanges gazeux où le sang échange le CO_2 pour de l'oxygène par diffusion des gaz à travers les parois alvéolaires. [1]

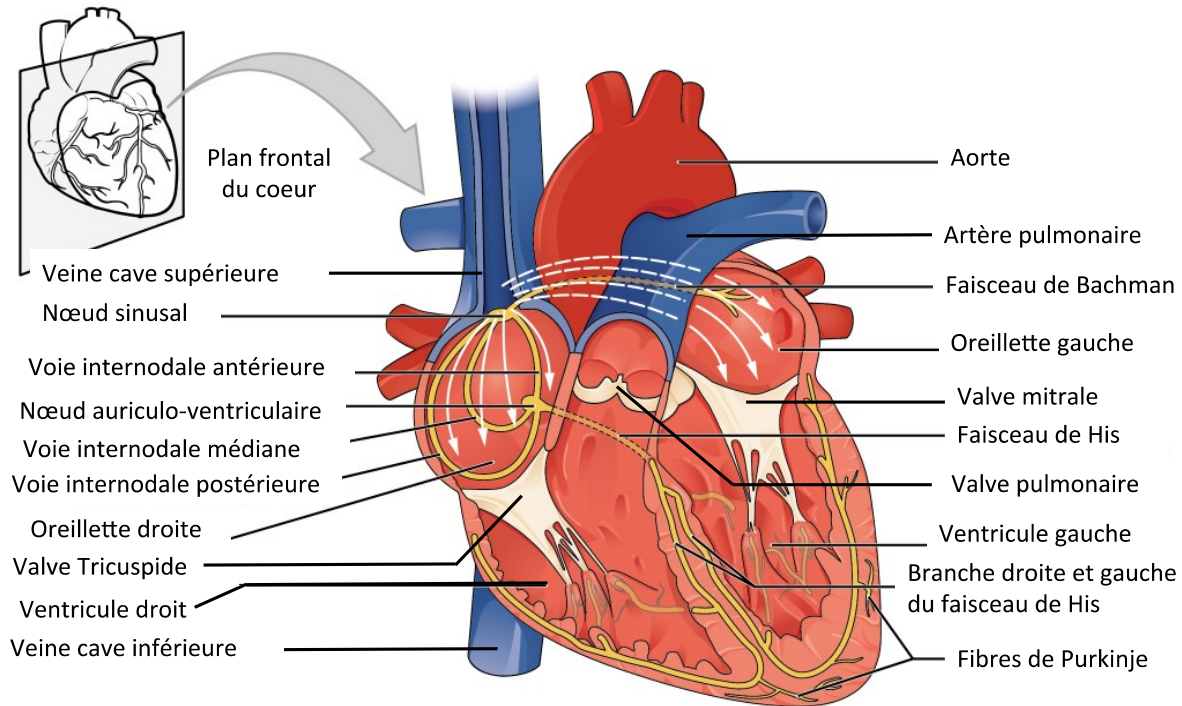


Figure 1. Anatomie du cœur. Le sang passe par le ventricule gauche puis par l'arche aortique pour se propager vers les tissus de l'ensemble du corps humain. Le sang oxygéné atteint les tissus où il se charge en CO_2 . Puis, le sang retourne au cœur par les veines caves supérieure et inférieure. Elles permettent au sang d'entrer dans le ventricule droit et d'être dirigé vers les poumons où il y a échange de CO_2 pour de l' O_2 . Le cœur contient également un réseau de fibres responsables d'acheminer le potentiel d'action qui induit la contraction des ventricules. Le potentiel d'action est produit par les cellules cardionectrices situées dans le nœud sinusal. Le potentiel d'action est par la suite dirigé vers le nœud auriculo-ventriculaire puis par le faisceau de His pour atteindre les fibres de Purkinje et provoquer la contraction du cœur. La pression systolique est la pression dans les vaisseaux quand le cœur se contracte et la pression diastolique est la pression dans les vaisseaux quand le cœur se relaxe. (Modifiée de [2]).

1.1.1 Le cœur et les vaisseaux au cours du développement de l'embryon

Le système circulatoire et le cœur sont respectivement le premier système et le premier organe fonctionnel de l'embryon. Les cellules qui forment le cœur primitif, au cours du développement des vertébrés, sont issues de la migration de cellules de la crête neurale. [3] Ces cellules forment deux tubes qui fusionnent au cours du développement pour former le

cœur primitif. [4] (Voir Figure 2A. Changements morphologiques du cœur et remodelage des vaisseaux au cours du développement chez les vertébrés) La région terminale de cette crête est appelée la crête cardiaque. Il fut démontré que ces cellules sont spécifiquement programmées pour former le cœur primitif composé de l'endothélium de la crosse aortique ainsi que du septum entre l'aorte et l'artère pulmonaire et qu'elles ne peuvent pas être substituées. [3, 5-8] D'ailleurs, des études d'ablation et de transplantation tissulaire de cette région de la crête neurale ont démontré des anomalies dans le développement cardiovasculaire comme une mauvaise séparation l'aorte et de l'artère pulmonaire du tronc artériel. [9, 10]

Les battements cardiaques débutent avant que la fusion des deux tubes ne soit achevée. Suite à cette fusion, le cœur primitif est un conduit composé de deux chambres, une oreillette et un ventricule, qui pompe le sang selon un axe antéro-postérieur. Par la suite, le cœur primitif subi une boucle cardiaque qui polarise le tube cardiaque dans un axe droite-gauche. [4] (Voir Figure 2B et C. Changements morphologiques du cœur et remodelage des vaisseaux au cours du développement chez les vertébrés). Le cœur adulte comprend alors quatre chambres soit deux oreillettes et deux ventricules ainsi qu'un réseau de fibres permettant la contraction du muscle cardiaque. (Voir Figure 1. Anatomie du cœur et Figure 2D. Changements morphologiques du cœur et remodelage des vaisseaux au cours du développement chez les vertébrés) Le reste du système de conduction n'est pas dérivé de la crête neurale, mais plutôt des précurseurs myogéniques cardiaques. [11] De plus, la différenciation des cardiomyocytes est associée avec un précurseur commun des cellules endothéliales (CE) et des cellules du muscle lisse (CML). [12]

Le cœur commence à pomper le sang uniquement lorsque le système vasculaire de l'embryon a établi ses premiers circuits. [4] Les vaisseaux sanguins se forment indépendamment du cœur et viennent s'y rattacher plutôt que d'en émerger. Les cellules dérivées de la crête neurale cardiaque jouent également un rôle dans la formation de l'arche aortique. Une population de cellules dérivées de la crête neurale cardiaque reste associée aux arches aortiques formées. (Voir Figure 2E. Changements morphologiques du cœur et remodelage des vaisseaux au cours du développement chez les vertébrés). Elle constitue une couche de CML qui entoure les vaisseaux lorsque ceux-ci commencent à s'organiser pour

devenir l'arche aortique, le tronc artériel ainsi que le segment proximal de l'artère carotidienne. [5, 8, 13]

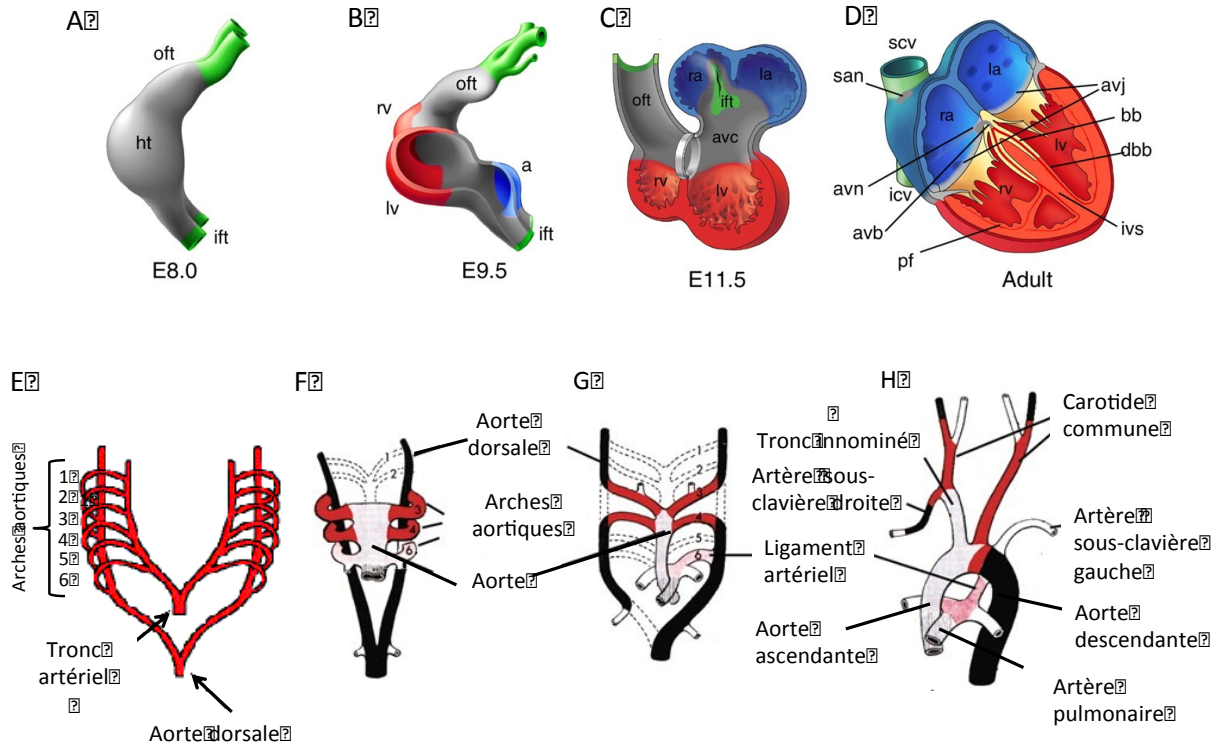


Figure 2. Changements morphologiques du cœur et remodelage des vaisseaux au cours du développement chez les vertébrés. (A) Le cœur primitif est formé d'un seul conduit qui subit une boucle cardiaque (B et C) formant ainsi les quatre chambres qui sont retrouvées dans (D) le cœur adulte. Les composants du cœur primitif sont retrouvés dans le cœur adulte : le myocarde en gris, les chambres ventriculaires en rouge, les chambres auriculaires en bleu et les vaisseaux en vert. Le myocarde en développement forme les éléments du système de conduction du cœur incluant le nœud sinusal (san), le nœud auriculo-ventriculaire (avn), le faisceau auriculo-ventriculaire ou le faisceau de His (avb), les branches du faisceau (bb) mais également de la jonction auriculo-ventriculaire (avj). Les branches distales du faisceau (dbb) et les fibres de Purkinje (pf) sont formées à partir septum interventriculaire (ivs) et des ventricules respectivement. Les parties en jaune dérivent du canal auriculo-ventriculaire incluant les éléments isolants formés à partir du myocarde ainsi que les valves formées à partir de l'endocarde. (Oreillette droite (ra), oreillette gauche (la), ventricule droit (rv), ventricule gauche (lv), voie d'entrée (ift, «inflow tract»), voie de sortie (oft, «outflow tract»), veine cave supérieure (scv), veine cave inférieure (icv), canal auriculo-ventriculaire (avc)) (Modifiée de [14]) Les vaisseaux en développement subissent également un important remodelage. (E) L'aorte primitive est formée de 6 arches qui relient l'aorte descendante au tronc artériel. (F) seul les arches 3, 4, et 6 subsistent pour former les vaisseaux matures. (G) Les arches 1, 2, et 5 dégèrent alors que (H) l'aorte ascendante et descendante ainsi que les artères pulmonaires sont formées avec les arches qui ont subsisté. (Modifiée de [15]).

Pendant le développement normal du cœur, le sang quittant le cœur par le tronc artériel passe par des vaisseaux qui contournent le tube digestif pour atteindre l'aorte dorsale. L'aorte est alors composée de six paires d'arches symétriques qui s'enroulent transitoirement autour du pharynx. (Voir Figure 2E. Changements morphologiques du cœur et remodelage des vaisseaux au cours du développement chez les vertébrés.) Ces arches subissent un remodelage pour former l'arche aortique unique. Le remodelage de ces artères de transition en l'aorte adulte définitive implique la régression asymétrique programmée et la persistance spécifique d'arches artérielles. Ainsi, les artères des troisièmes arches deviennent les artères carotides communes, les artères des quatrièmes arches contribuent à la formation de la partie distale de l'arche aortique finale, l'artère brachiale céphalique et à une partie proximale de l'artère sous-clavière droite et les artères des sixièmes arches contribuent à la formation des artères du tronc artériel et la partie proximale des artères pulmonaires. [16, 17] (Voir Figure 2G-H. Changements morphologiques du cœur et remodelage des vaisseaux au cours du développement chez les vertébrés.) Simultanément, l'aorte se connecte avec le ventricule gauche et l'artère pulmonaire avec le ventricule droit. (Révisé dans [17]) L'arrangement final et la morphologie de ces grands vaisseaux requièrent une signalisation réciproque entre les CE des arches aortiques de transition [18], les CML dérivées des cellules neurales et du mésenchyme [19, 20] ainsi que de l'endoderme. [21]

1.1.2 Les vaisseaux sanguins

La formation des vaisseaux sanguins et l'initiation de la circulation sanguine par le battement du cœur au cours du développement de l'embryon induisent l'apparition d'une hiérarchie de vaisseaux sanguins qui dès leur formation, irriguent les tissus en développement. (Voir Figure 3. Morphologie des vaisseaux sanguins) La formation des vaisseaux durant le développement embryonnaire à partir du mésoderme se nomme la vasculogénèse. [4] Le terme angiogénèse réfère plutôt à la formation de vaisseaux par l'expansion de vaisseaux sanguins pré-existants. L'angiogénèse a lieu au cours du développement de l'embryon, mais également chez les organismes matures lors de la régénération tissulaire ou lors de la formation de

tumeurs. [22] l'angiogenèse est un processus complexe qui implique des interactions entre les médiateurs pro-et anti- angiogéniques, des facteurs de croissance, les cellules vasculaires et la matrice extracellulaire. [23] L'hypoxie est le premier stimulus qui induit l'angiogenèse qu'elle soit physiologique ou pathologique. [24]

1.1.2.1 Structure des vaisseaux

La paroi d'une artère comprend trois couches qui sont de la plus interne à la plus externe : l'intima (tunique interne), la média (tunique moyenne) et l'adventice (tunique externe). [1]

1.1.2.1.1 Intima

L'intima, ou tunique interne, est composée d'une couche unique de CE formant l'endothélium vasculaire et d'une membrane basale aussi appelée la limitante élastique interne. L'endothélium forme une couche continue de CE servant de barrière perméable et sélective qui régule le passage de substances présentes dans le sang, avec lequel elle est directement en contact, et les tissus. [1] L'endothélium est critique dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. (Voir section 1.1.4.1.1 Fonctions endothéliales)

1.1.2.1.2 Média

Partie centrale des vaisseaux, la média ou tunique moyenne est la section la plus épaisse. Elle est composée de fibres élastiques et de CML, ayant un phénotype contractile, disposées en anneaux autour de la lumière du vaisseau. (Voir section 1.1.4.2.1 Fonction des cellules musculaires lisses) La forte teneur en fibres élastiques leur confère une grande compliance, soit la capacité de se distendre en fonction de la pression sanguine. Les parois peuvent donc se contracter ou se dilater sans se déchirer pour s'ajuster à la pression sanguine

ou à certaines substances chimiques comme l'oxyde nitrique (NO pour *nitric oxide*) et l'endothéline-1 (ET-1).

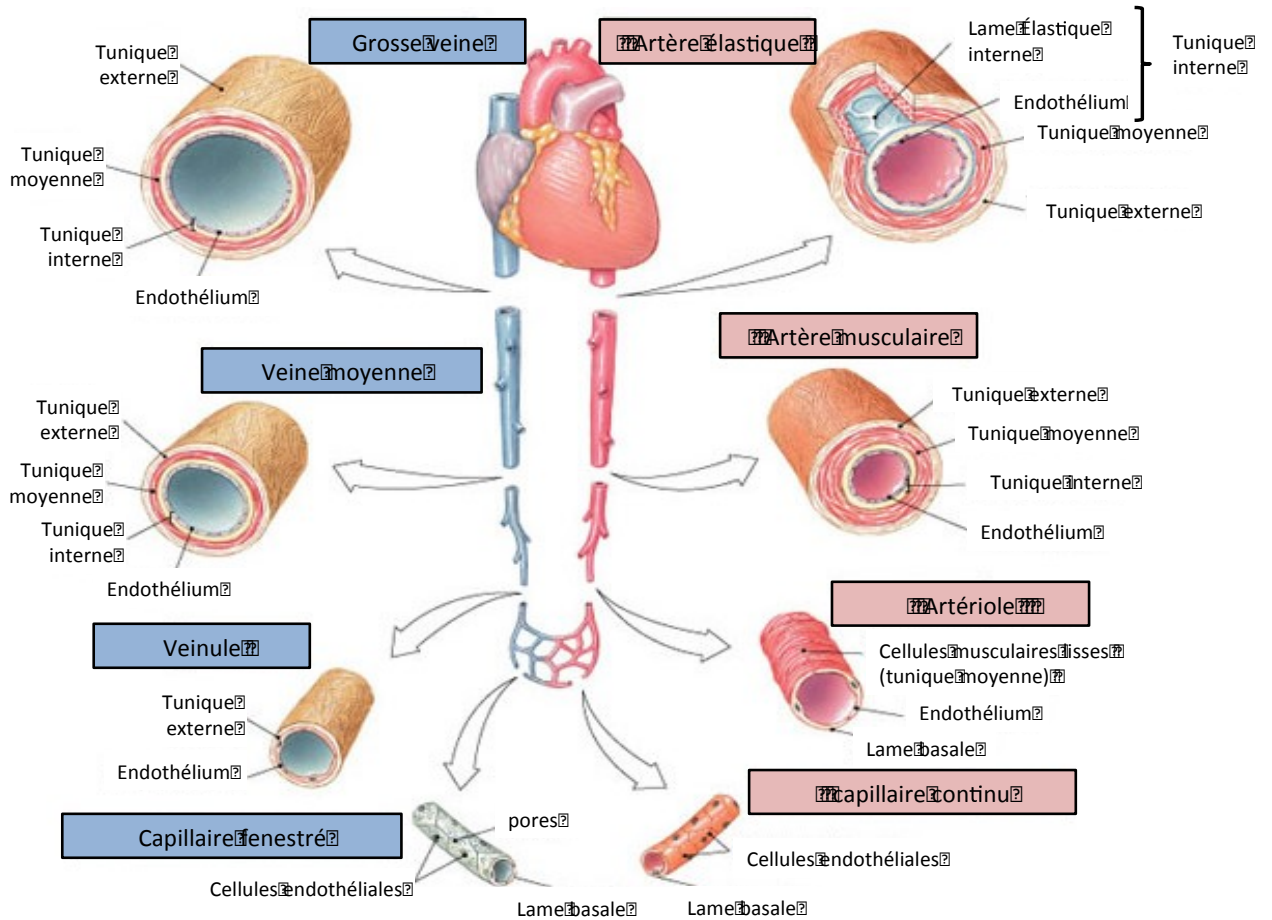


Figure 3. Morphologie des vaisseaux sanguins. Parmi les vaisseaux sanguins, il est possible de distinguer les artères (rectangles rouges) qui acheminent le sang du cœur vers les tissus et les veines (rectangles bleus) qui ramènent le sang des tissus vers le cœur. Les artères possèdent une média plus importante ainsi qu'une limitante élastique interne qui est absente dans les veines. Une hiérarchie de vaisseaux est établie au cours du développement chez l'humain afin de répondre à l'augmentation de la pression sanguine. Ceci permet donc la génération de vaisseaux avec des morphologies différentes assurant des fonctions différentes telles les artères élastiques qui sont des vaisseaux de conduction du sang et les capillaires (diamètre de moins de 1µm) siège d'échanges entre le sang et les tissus. (Modifiée de [25])

1.1.2.1.3 Adventice

L'adventice ou tunique externe est composé principalement de fibres élastiques, de fibres de collagène et de neurofibres. Les plus gros vaisseaux disposent d'un petit système vasculaire intégré à leur adventice : les *vasa-vasorum* signifiant la « vascularisation des vaisseaux ». [1] Ce système leur permet de recevoir de l'oxygène et des nutriments. [1] Il a été démontré qu'il existait une interaction fonctionnelle directe entre l'adventice et l'intima puisque chacune des deux parties de la paroi vasculaire répond aux dommages associés à l'autre partie. [26] Par exemple, en réaction à un stress mécanique sur l'intima, les cellules de l'adventice migrent vers la média pour participer au remodelage vasculaire. [27] (Voir section 1.3.3.3 Le remodelage vasculaire)

1.1.3 Types d'artères

1.1.3.1 Les artères élastiques, de conduction ou de compliance

Ces artères possèdent un grand diamètre (diamètre de 2 à 3 cm) [28] et leur média contient une forte proportion de fibres élastiques alors que leur paroi est relativement mince par rapport à leur diamètre total. (Voir Figure 3. Morphologie des vaisseaux sanguins) Ces artères favorisent la propulsion du sang éjecté du ventricule gauche. Leurs parois, très souples, s'étirent sous l'effet du sang sous pression. L'aorte et les artères carotides communes en sont des exemples. [1]

1.1.3.2 Les artères musculaires ou de distribution

Les artères de tailles moyennes (diamètre de 1 à 40 mm) [28] sont appelées les artères musculaires, car leur média contient plus de CML et moins de fibres élastiques que les artères élastiques. (Voir Figure 3. Morphologie des vaisseaux sanguins) Leur plus grande capacité de

vasoconstriction et de vasodilatation leur permet de régler la vitesse d'écoulement du sang. Elles distribuent le sang dans le reste de l'organisme par exemple les artères brachiales et fémorales. [1]

1.1.3.3 Les artères de résistance

Le siège principal de la résistance vasculaire se trouve dans les artérioles (diamètre de 20 à 30 μm) [28], ces petites artères à paroi très musculaire. Elles peuvent faire varier fortement leur diamètre, jouant directement sur la résistance vasculaire et la pression sanguine. (Voir Figure 3. Morphologie des vaisseaux sanguins) Les grosses artères n'opposent qu'une faible résistance au flot sanguin. [1]

1.1.4 Les cellules vasculaires

1.1.4.1 Les cellules endothéliales

Durant l'embryogenèse, des cellules appelées hémagioblastes se regroupent pour former des îlots sanguins représentant le premier système sanguin de l'embryon. [29] Ces îlots se divisent en deux parties soit la couche externe d'où provient les CE et la couche interne d'où dérive les cellules souches hématopoïétiques. [30] L'endothélium est un composant vital de la paroi vasculaire, il comprend un total d'environ 10^{13} CE et couvre une surface approximative de 7m^2 chez un adulte. [31] Sous la force du flot sanguin les CE s'orientent uniformément dans la direction de ce flot. [32] Dans les gros vaisseaux, tels que les artères et les veines, elles ont une forme ellipsoïdale. Dans les capillaires les plus petits, elles forment un petit tube à l'intérieur duquel le sang circule. [31] Les CE ont un faible taux prolifératif *in vivo* en raison d'une inhibition de contact alors que les CE isolées en culture peuvent proliférer rapidement. [31] Le taux basal de réplication des CE dans un vaisseau sain est bas, mais peut être plus élevé dans certaines régions vasculaires. [33] Les CE peuvent également former des

capillaires *in vitro*, une organisation associée avec la capacité à incorporer un vaisseau en formation. [34] Les CE sont identifiées par l'expression de certains marqueurs comme CD31, CD141, CD105, CD146, CD144, le facteur de Van Wilbrand (vWF pour *Van Wilbrand factor*) et le récepteur 2 du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR-2, pour *vascular endothelial growth factor receptor -2*) [31] (Voir Figure 4. Morphologie des cellules endothéliales *in vitro*)

Les CE disposent d'une période d'activité limitée dans la paroi vasculaire, soit environ 12 mois lorsque le flot sanguin est laminaire. Cependant, les CE des zones où le flot sanguin est perturbé peuvent être fonctionnelle moins d'une semaine. [35] Ceci indique que les forces de cisaillement qui sont exercées sur les parois des vaisseaux peuvent entraîner des taux variables dans le remplacement des CE dans les différentes parties de l'arbre vasculaire. [36] Initialement, il a été établi que le remplacement des CE dans la paroi vasculaire était effectué exclusivement par la prolifération et la migration des CE environnantes. [37] Toutefois, il est maintenant suggéré que des cellules progénitrices/souches présentes dans la circulation sanguine sont impliquées dans la réparation vasculaire. Ces cellules sont nommées les cellules endothéliales progénitrices (CEP) et participent, entre autres, à la réendothélialisation vasculaire suite à une dénudation. [38]

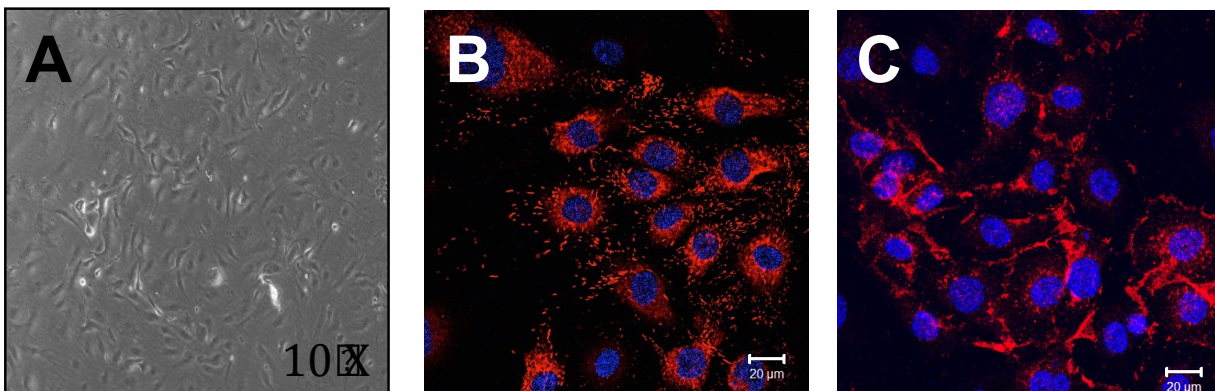


Figure 4 Morphologie des cellules endothéliales *in vitro*. Isolation primaire de CE de l'aorte murine. (A) Les CE adoptent une morphologie caractéristique en forme de pavé. Grossissement 10X. Les CE expriment plusieurs marqueurs dont (B) le facteur de Van Wilbrand (VwF, rouge) et (C) CD31 (rouge). Les noyaux sont marqués avec le 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI, bleu). (Résultats non publiés obtenus par Kim Tardif)

1.1.4.1.1 Fonction endothéliale

Étant en contact avec le sang, l'endothélium joue un rôle d'interface entre ce dernier et les tissus. Un endothélium sain est une surface lisse et quiescente qui bloque le transfert de particules lipidiques à travers la paroi vasculaire, inhibe la relâche de chemokines, cytokines ou facteurs de croissance et prévient l'adhésion des monocytes induite par l'expression de molécules d'adhésion. [39] L'endothélium maintient la structure et les fonctions vasculaires en régulant le tonus vasculaire et en contrôlant la prolifération des CML. Il régule également l'équilibre entre l'état antithrombotique, par la production de NO et de prostacycline (PGI₂), et prothrombotique, par la sécrétion de VwF (qui induit l'agrégation plaquettaire) et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène -1 (PAI-1 pour *plasminogen activator inhibitor-1*; qui inhibe la fibrinolyse). [40] Par exemple, lors de la cascade menant à la coagulation, le NO produit par les CE diffuse vers les CML qui se relaxent, permettant ainsi aux agrégats en formation d'être emportés par la circulation sanguine et sous l'effet de la PGI₂ d'être défaits évitant la formation de thrombus. [41]

Les premières observations de l'implication de l'endothélium dans la régulation du tonus vasculaire ont été rapportées par Robert Furchgott en 1980 lors d'expériences de dénudation de vaisseaux qui devenaient incapables de vasodilatation en présence d'acétylcholine. [42] L'endothélium est donc responsable de la relaxation artérielle par la relâche de substances vasoactives puissantes qui sont nommées les facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF pour *endothelium-derived relaxing factor*). Le premier EDRF identifié fut le NO produit par l'oxyde nitrique synthétase endothéliale (eNOS pour *endothelial nitric oxide synthase*) lors de la conversion de son substrat la L-arginine en citrulline. [43-45] La eNOS est une enzyme dimérique dont l'activité physiologique dépend de plusieurs cofacteurs, dont le tétrahydrobioptérine (BH₄). La eNOS est retrouvée, dans un état inactif dans les calvéoles des CE, liée à la calvéoline-1. L'augmentation cytoplasmique de calcium (Ca²⁺) induit la liaison de la calmoduline à la eNOS entraînant sa libération de la calvéoline et son activation. [46] Le NO possède une demi-vie de 4 secondes. Il agit donc très rapidement, et ce, de façon endocrine. Le NO est un vasorégulateur capable de moduler le flot sanguin dans la microcirculation. [47] En plus des EDRF, les CE sécrètent des facteurs de

constriction dérivés de l'endothélium (EDCF pour *endothelium-derived contracting factors*) telles l'ET-1 [48] et les prostaglandines produites par les cyclooxygénases. [49]

La fonction de chaque vaisseau ainsi que le rôle de son endothélium varient selon leur emplacement dans le corps humain. En effet, dans les vaisseaux de résistance l'endothélium aide à réguler le débit et la pression sanguine, alors que dans les capillaires il joue un rôle de transport et de distribution des nutriments et d'hormones, incluant le glucose, les lipides et l'insuline. [50]

1.1.4.1.2 Dysfonction endothéliale

Les facteurs de risque conventionnels des maladies cardiovasculaires (tabagisme, obésité, hypertension, diabète, cholestérol élevé) agissent en combinaison avec les facteurs hémodynamiques (forces de cisaillement élevées) dans l'induction de la dysfonction endothéliale. D'ailleurs, la dysfonction endothéliale est l'étape initiale de la pathologie de l'athérosclérose, menant à des complications cardiovasculaires. [51] (Voir Figure 8. Formation et développement de la plaque d'athérosclérose)

En réponse aux agressions biochimiques ou physiques, l'endothélium subit des changements importants. La perméabilité membranaire augmente en raison d'un changement morphologique des CE en réponse à la perturbation du flot sanguin. [52] La dysfonction endothéliale est une conséquence de la diminution de la production et de la disponibilité du NO ainsi qu'un déséquilibre entre les vasoconstricteurs et vasodilatateurs comme le NO et l'ET-1. [39] La diminution de l'expression de eNOS, des concentrations insuffisantes de son substrat (L-arginine) ou des cofacteurs (BH₄), une diminution de l'activité de eNOS ou encore une augmentation de la dégradation du NO peuvent expliquer cette diminution. De plus, l'augmentation des espèces réactives oxygénées (ROS pour *reactive oxygen species*) va séquestrer le NO disponible pour former de la peroxynitrite (ONOO⁻) pouvant inhiber l'activité de la eNOS. [53] La présence des facteurs de risque associés aux maladies cardiovasculaires mène à l'activation de l'endothélium, ce qui se caractérise par un état pro-inflammatoire et prothrombogénique. [54] La dysfonction endothéliale est un marqueur de

maladies cardiovasculaires et un prédicteur d'évènements cardiovasculaires tel que l'infarctus du myocarde. [39, 55]

1.1.4.1.3 Les facteurs de risques de la dysfonction endothéliale

Les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires mènent tous à une dysfonction endothéliale. Cela inclut les maladies cardiovasculaires et métaboliques comme le diabète de type II (résistance à l'insuline) [56], l'hypertension [57], l'hyperlipidémie [58] ainsi que les habitudes de vie néfastes comme le tabagisme [59], l'alcoolisme [60], une mauvaise alimentation [61], la sédentarité [62], le stress [63] et finalement l'âge. [64]

1.1.4.1.3.1 Le diabète

Les mécanismes responsables de la dysfonction endothéliale en situation diabétique regroupent le découplage enzymatique de eNOS [65], l'augmentation de l'activité de l'arginase qui entre en compétition avec la eNOS pour leur substrat commun l'arginine [66], l'augmentation de diméthylarginine asymétrique (ADMA), un inhibiteur de la eNOS [67] et l'augmentation d'anions superoxydes (O_2^-) qui séquestrent le NO disponible. [53] Une plus grande production de EDCF et de ROS est également observée. [68] (Voir la section 1.2.3 pour les détails de la dysfonction endothéliale en situation diabétique)

1.1.4.1.3.2 L'hypertension

L'hypertension active le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et augmente la production d'angiotensine II (ang II) [69] Dans les CE, l'ang II régule la production de NO par la eNOS. [70] Une diminution de la production de NO et une augmentation de la production de ROS se produisant durant l'hypertension entraînent la dysfonction endothéliale

et induisent un remodelage vasculaire. Cela provoque la perte de la vasodilatation, l'augmentation de l'agrégation plaquettaire, de l'inflammation et de la croissance des CML. [71] Les ROS inhibent directement l'activité du NO en le transformant en peroxynitrite (ONOO^-). [72] (Voir la section 1.3.3.2 pour les détails de la dysfonction endothéliale en situation d'hypertension)

1.1.4.1.3.3 L'hypercholestérolémie et obésité

L'hypercholestérolémie, caractérisée par des concentrations élevées de lipides circulants, est associée avec une augmentation du stress oxydatif menant à une réduction de la biodisponibilité du NO et une activité anormale de la eNOS. [73] L'obésité est associée avec une plus grande production de EDCF. D'ailleurs, une perte de poids seule ou en combinaison avec de l'exercice physique améliore la réponse dépendante de l'endothélium. [74, 75]

1.1.4.1.3.4 Le tabagisme et la pollution

Le tabagisme et l'exposition à la pollution entraînent une augmentation de la production d'anions superoxydes (O_2^-) réduisant ainsi la disponibilité du NO et la vasodilatation dépendante de l'endothélium. [59, 76, 77]

1.1.4.1.3.5 Les estrogènes

Les récepteurs aux estrogènes ont le potentiel d'influencer la vasodilatation/relaxation dépendante de l'endothélium. [78] De plus, l'estrogène induit la phosphorylation de eNOS et par conséquent en augmente l'activité et induit une relaxation des vaisseaux. [79] Les effets sur la relaxation dépendante de l'endothélium impliquent autant la voie génomique et que la

voie non génomique de l'estrogène. (Révisé dans [80])

1.1.4.1.3.6 L'âge

Autant dans les modèles animaux que chez l'humain, le vieillissement réduit l'habileté de l'endothélium à contrôler la vasodilatation dépendant de l'endothélium. [81, 82]. Ceci est dû à l'augmentation de l'activité de l'arginase qui entre en compétition avec la eNOS pour leur substrat commun (l'arginine) [83], une augmentation de la production de ROS qui réduit la biodisponibilité du NO [84], une réduction de l'expression et de l'activité de eNOS [81, 85] et ultimement une diminution de la quantité de NO relâchée. [86]

1.1.4.2 Les cellules musculaires lisses

Il a été démontré que même si les vaisseaux contiennent tous des CML, ces dernières proviennent d'origines diverses. En effet, les CML forment un tissu en mosaïque provenant d'au moins sept origines uniques et sans chevauchement chez l'embryon de vertébré. [27] (Voir Figure 5. Origine des cellules musculaires lisses formant les vaisseaux sanguins) Les analyses ont démontré que les CML dérivant de la crête neurale contribuent à la formation de l'aorte ascendante et de l'arche aortique, du tronc artériel, des artères sous-clavières innominée et droite, aussi bien que des artères carotides communes droite et gauche. (Voir Figure 2. Changements morphologiques du cœur et remodelage des vaisseaux au cours du développement chez les vertébrés) De plus, il a été démontré que les CML de l'aorte thoracique descendante, de l'aorte abdominale, des artères coronaires, des artères pulmonaires, de l'artère sous-clavière gauche et de la partie distale des artères carotides internes ne sont pas dérivées de la crête neurale. [8] Il est ainsi possible de faire une distinction entre les différentes CML. En effet, les CML des artères élastiques issues des cellules de la crête neurale expriment la molécule Connexine 43 contrairement aux CML des artères musculaires qui n'expriment pas cette molécule. La Connexine 43 est la protéine principale composant les

jonctions *gaps* des CML. Elle est responsable de la régulation des mouvements ioniques et de la croissance des CML. [87] Par exemple, les artères mammaires internes humaines présentent des segments qui sont élastiques et musculaires. Ces segments présentent une corrélation inverse des taux de Connexine 43 (élastique) et de Desmine (musculaire) dans les CML des différents segments. [88] La variation entre les CML des différents vaisseaux, comprenant l'expression de marqueurs cellulaires ainsi que des caractéristiques fonctionnelles et morphologiques suggèrent qu'une composante génétique serait impliquée dans cette diversité. [27]

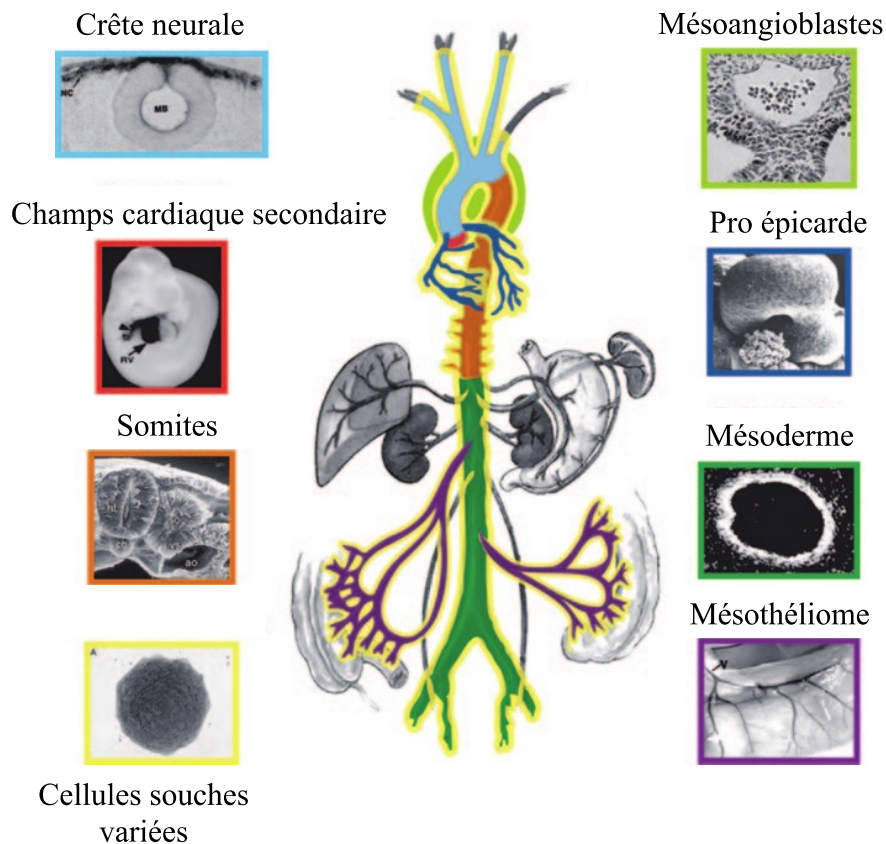


Figure 5. Origine des cellules musculaires lisses formant les vaisseaux sanguins. Les différentes couleurs représentent différentes origines correspondant aux images de part et d'autre du schéma de l'arbre vasculaire. Les lignes jaunes externes indiquent une contribution locale et systémique de cellules souches de sources variées durant la formation de ces vaisseaux. (Modifiée de [27])

Les CML vasculaires peuvent adopter deux phénotypes : contractile et synthétique. Dans un vaisseau sain, les CML prolifèrent très lentement et expriment des protéines contractiles comme la chaîne lourde de la myosine du muscle lisse (SM-MHC pour *smooth muscle myosine heavy chain*). Ce marqueur est considéré comme étant le marqueur le plus spécifique pour les CML contractiles et n'a jamais été identifié dans les cellules non musculaires *in vivo*. De plus, c'est le seul marqueur des CML qui est spécifique durant l'embryogenèse. [89]) Les CML expriment également l' α -Actine du muscle lisse (α -SMA pour *smooth muscle alpha actin*), la Protéine du muscle lisse 22 alpha (SM22- α pour *smooth muscle protein 22-alpha*), la Calponine, la Smootheline et la Chaîne lourde de la Caldesmone. [90] (Voir Figure 6. Morphologie des cellules musculaires lisses *in vitro*)

En situation pathologique comme l'athérosclérose ou lorsqu'elles sont isolées *in vitro*, les CML adoptent un phénotype dit synthétique. [91, 92] Les cellules normalement contractiles subissent une conversion vers un phénotype moins différencié. [93] Les CML synthétiques sont alors capables de proliférer plus rapidement, de migrer et de sécréter des protéines de la matrice extracellulaire, par exemple le collagène, en plus grande quantité que les CML contractiles. [94] La morphologie des cellules change également, les CML contractiles sont allongées et fusiformes alors que les CML synthétiques sont moins allongées et ont une morphologie rhomboïde. [95] Cette conversion réfère au phénomène de plasticité des CML. [92, 94, 96] Les CML qui, progressivement présentent le phénotype synthétique, perdent graduellement leur fonction contractile, une conséquence de la perte d'expression des protéines contractiles, comme α -SMA et SM-MHC. [97] Les CML subissent une réorganisation de leur cytosquelette et une augmentation de la quantité de protéines non contractiles comme la Chaîne légère de la caldesmone, la Chaîne lourde B de la myosine non-musculaire, la Tropomyosine 4 et la Protéine 1 liant le rétinol cellulaire (CRBP-1, pour *cellular-retinol binding-protein-1*). (Révisé dans [98]) Ces dernières protéines servent de marqueur pour identifier les cellules synthétiques. Par exemple, la CRBP-1 est rapidement régulée à la hausse dans les CML prolifératives. [99]

L'environnement des CML peut moduler leur phénotype ainsi que leur conversion en CML synthétiques. Il a été démontré que chez les rongeurs, les CML subissent cette conversion en réponse à différents stimuli pro-athérogéniques comme la composition de la

matrice extracellulaire [100], les cytokines [101, 102], les forces de cisaillement [103], les ROS [104] et les lipides. [105] De plus, les CML synthétiques expriment une plus grande proportion de récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (LDL pour *low density lipoprotein*) et aux lipoprotéines de très faible densité (VLDL (pour *very low density lipoprotein*.) Ces récepteurs rendent plus efficace l'incorporation de lipides dans la cellule et plus rapide la transformation des CML en cellules spumeuses impliquées dans le développement de la plaque d'athérosclérose. [106] (Voir section 1.1.5.4 Formation de plaque d'athérosclérose)

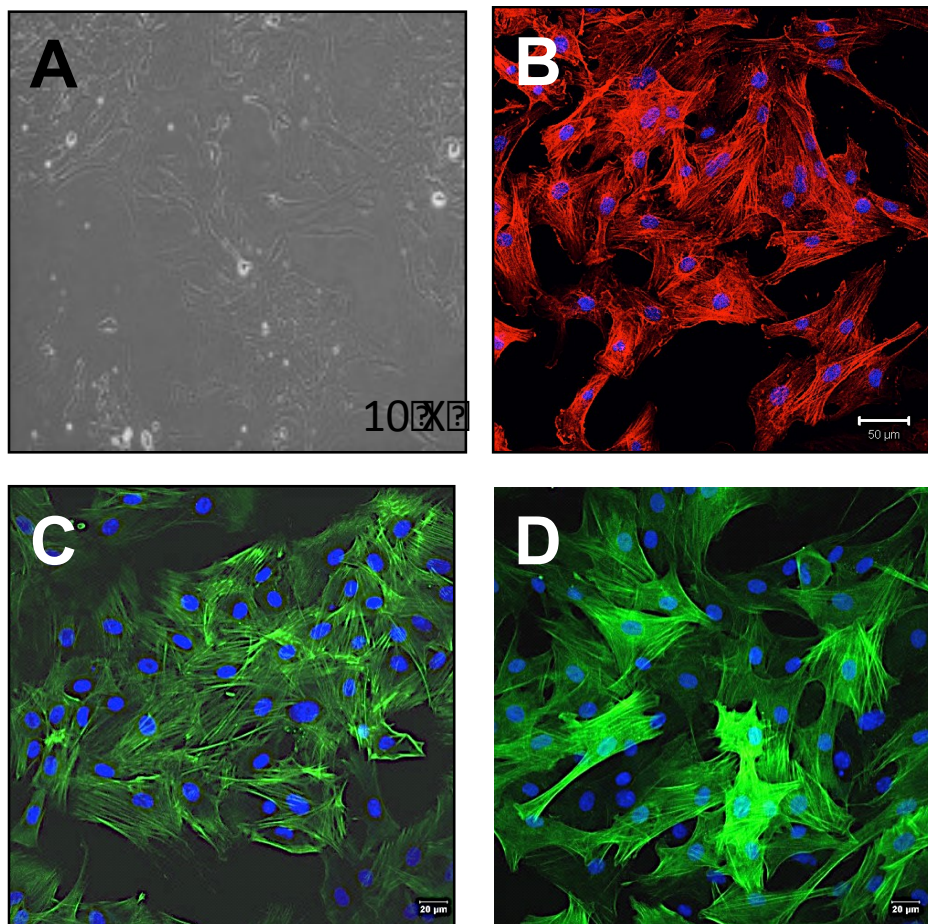


Figure 6. Morphologie des cellules musculaires lisses *in vitro*. Isolation primaire de CML de l'aorte de rat. (A) Les CML adoptent une morphologie caractéristique étendue et fusiforme. Grossissement 10X. Les CML expriment (B) l' α -actine du muscle lisse (α -SMA) (rouge) et (C) la caldesmone (vert) et (D) SM-22 α (vert). Les noyaux sont marqués avec le DAPI (bleu). (Résultats non publiés obtenus par Kim Tardif)

1.1.4.2.1 Fonction des cellules muscles lisses

Les CML assurent différentes fonctions au cours du développement de l'embryon. Durant les phases précoces de la vasculogénèse les CML prolifèrent et migrent rapidement. [107] Au cours du développement, les CML produisent une grande quantité protéines de la matrice extracellulaire qui composent les vaisseaux comprenant le collagène, l'élastine, les protéoglycans et les molécules d'adhésion. [107] Les CML forment des jonctions serrées avec les CE et participent à la maturation des vaisseaux nouvellement formés. [90, 94] Enfin, dans les organismes adultes, les CML composant la média régulent le tonus vasculaire des vaisseaux matures. Le NO et les EDHF ainsi que les EDCF produits par les CE entraînent une relaxation ou une contraction des CML permettant aux vaisseaux de s'adapter aux changements de pression sanguine. [108] De plus, d'autres stimuli peuvent entraîner une hyperpolarisation des CML de façon indépendante du NO comme les forces de cisaillements, les hormones circulantes, (les catécholamines, la vasopressine, l'aldostérone), la sérotonine produite par les plaquettes, l'histamine, la bradykinine, la prostaglandine et la thrombine. (Révisé dans [108]) Dans les vaisseaux matures, la plasticité des CML est importante pour la réparation vasculaire suite à une blessure ou durant les processus d'angiogénèse. [90]

1.1.4.2.2 La prolifération des CML et cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases : G1, S, G2 et M. Les phases G1 et G2 sont des phases de transition (gap) qui permettent à la cellule de se préparer à l'étape suivante. Durant la phase G1 la cellule est au repos. [109] Durant la phase S (synthèse), les chromosomes se répliquent. Par la suite, la cellule subit une division cellulaire durant la phase M (mitose), elle-même divisée en plusieurs phases nommées : interphase, prophase, métaphase, anaphase et la télophase. C'est pendant la prophase que l'acide désoxyribonucléique (ADN) se condense pour la division. Pour ce faire, l'ADN enroulé autour de protéines nommées histones va se condenser en chromosomes. Le niveau de condensation de l'ADN pendant la mitose dépend de la présence de ces molécules. Elles sont associées pour former des nucléosomes autour

desquels s'enroule l'ADN. Il faut 8 histones (4 types différents: H2A,H2B,H3,H4) pour former un nucléosome. [110] La progression du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M) est réalisée par l'activité des cyclines dépendantes des protéines kinases (CDK pour *cyclin-dependent kinases*). S'il apparaît un problème au cours de l'étape précédente, un système de surveillance interrompt le cycle cellulaire pour permettre à la cellule de terminer correctement cette étape. [109]

Durant la myogenèse et la régénération des muscles, les myoblastes prolifèrent, migrent puis leur cycle cellulaire s'arrête. Les cellules s'alignent sur les autres cellules et fusionnent pour former des myotubes multinucléés. (Révisé dans [111]) La réactivation de la prolifération cellulaire survient rapidement suite à une blessure vasculaire, par exemple suite à un étirement de la paroi vasculaire lors de l'apposition d'une endoprothèse vasculaire. Les changements dans l'expression des gènes peuvent être détectés très rapidement après la blessure. Les CML subissent une ré-entrée dans le cycle cellulaire. Les marqueurs précoces de l'activation, les oncogènes nucléaires, sont détectables aussitôt que 30 minutes suivant la blessure. [112] L'augmentation de l'expression de c-jun (requis pour la progression de toutes les phases du cycle cellulaire), c-fos et c-myc (progression G2/S) représentent une transition vers l'activité mitogénique. Les onco-protéines se lient avec des séquences spécifiques sur l'ADN de gènes cibles pour stimuler leurs transcriptions et sont impliquées dans la phase G1 du cycle cellulaire. [113] D'ailleurs, l'utilisation d'anticorps ou d'acide ribonucléique (ARN) anti-sens contre ces oncogènes prévient l'entrée dans la phase S *in vitro*. [114] L'utilisation d'oligonucléotides anti-sens contre ces oncogènes réduit l'hyperplasie et l'épaisseur de la néointima *in vivo* suite à une blessure. [115] Ceci suggère que l'inhibition de cette phase précoce peut affecter la cascade d'évènements menant à l'hyperplasie de la néointima.

1.1.4.3 Les cellules progénitrices résidentes des vaisseaux

La composition cellulaire de la paroi vasculaire n'est pas limitée aux CE et aux CML. Plusieurs études ont révélé la présence de cellules progénitrices, diverses, mais interconnectées, dans la paroi vasculaire. Ces études suggèrent la présence d'une niche spécialisée dans la paroi des vaisseaux pouvant aider à maintenir l'intégrité et l'homéostasie vasculaire. (Révisé dans [116]) Cette niche, qui serait une source de cellules progénitrices, est identifiée comme étant la zone vasculogénique et se situe dans l'adventice, plus spécifiquement en bordure de la média. (Voir Figure 7. Distribution des cellules progénitrices dans la paroi vasculaire) Plusieurs études ont corroboré les résultats indiquant que la zone interne de l'adventice est enrichie de cellules progénitrices avec un haut taux prolifératif et un potentiel de différenciation diversifiée. [117] [118] Il y a également une symbiose apparente entre les cellules souches mésenchymales, les myofibroblastes, les cellules progénitrices endothéliales, musculaires et hématopoïétiques. [117-119] Les données préliminaires indiquent que ces populations résident de façon constitutive dans l'adventice et qu'elles s'établissent à cet emplacement durant le développement prénatal. [120] La zone vasculogénique est stratégiquement placée près des *vasa-vasorum* qui confèrent une interface avec la circulation périphérique, où des signaux bidirectionnels peuvent être interconnectés entre les parois vasculaires et les niches de cellules souches.

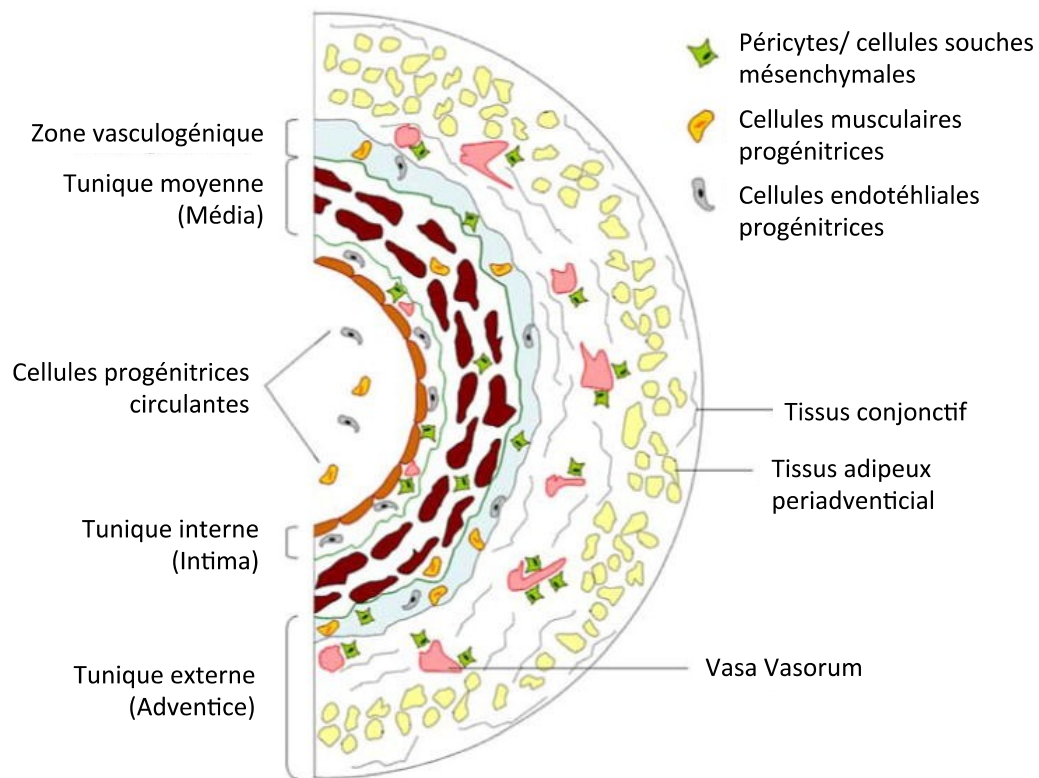


Figure 7. Distribution des cellules progénitrices dans la paroi vasculaire. Différentes populations de progénitrices cellulaires sont présentes dans la paroi vasculaire. Les cellules progénitrices endothéliales occupent l'espace sous-endothélial de l'intima et de la région interne de l'adventice, la zone vasculogénique, qui est riche en cellules musculaires progénitrices et en cellules mésenchymales multipotentes/péricytes. Ces cellules ont le potentiel de se différencier en CML ou en CE et sont localisées dans la média des vaisseaux. (Modifiée de [116]).

1.1.5 Le remodelage vasculaire

Les pathologies qui se développent en présence des facteurs de risque des maladies cardiaques comme l'hypertension ou le diabète induisent un remodelage des vaisseaux sanguins qui implique toutes les cellules vasculaires. Les vaisseaux subissent d'importantes altérations structurelles et fonctionnelles menant progressivement à une incapacité à se distendre ou à se contracter. Le remodelage vasculaire peut être eutrophique ou hypertrophique. Le remodelage peut également comprendre un réarrangement et/ou une

accumulation des protéines de la matrice extracellulaire nommé la fibrose ainsi que le réarrangement des composants de la paroi vasculaire lors du développement de plaques d'athérosclérose.

1.1.5.1 Remodelage eutrophique

Le remodelage eutrophique est caractérisé par une augmentation du diamètre extérieur. La lumière du vaisseau est réduite, mais l'épaisseur de la média demeure inaltérée, résultant en un ratio média-lumière plus grand. [121] La paroi vasculaire est réorganisée, les CML sont alignées plus étroitement les unes avec les autres et encerclent la lumière du vaisseau de façon plus serrée sans changer l'aire de la média. (Voir Figure 8. Remodelage vasculaire) Ce phénomène peut être expliqué par une prolifération cellulaire à l'intérieur des vaisseaux induisant une réduction de la lumière vasculaire ainsi que par l'activation des processus apoptotiques localisés à la périphérie externe du vaisseau. [122]

1.1.5.2 Remodelage hypertrophique

Le remodelage hypertrophique implique l'épaississement de la média qui réduit la lumière vasculaire. (Voir Figure 8. Remodelage vasculaire) Le rétrécissement de la lumière est associé avec une augmentation du ratio média-lumière et de l'aire de la média en section transversale. La croissance de la média d'un vaisseau sanguin résulte en une réduction importante de sa lumière. Cette hypertrophie peut impliquer une augmentation du nombre [123] [124] ou de la taille des CML [125] ou encore une combinaison des deux [126], aussi bien qu'une augmentation du dépôt de matrice extracellulaire.

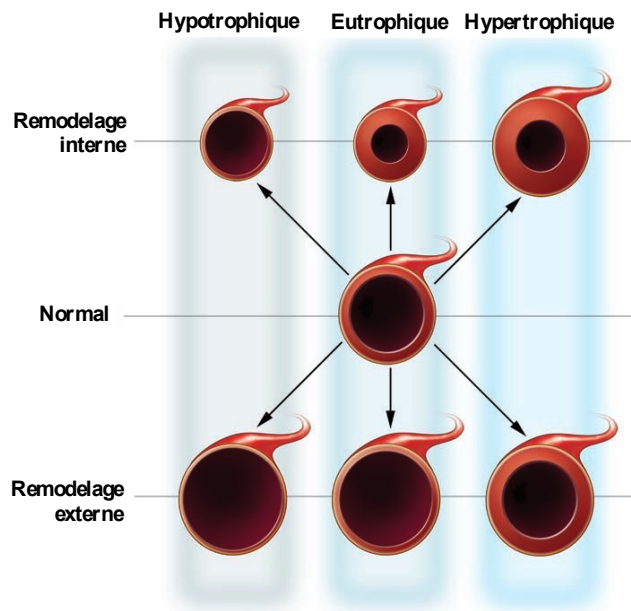


Figure 8. Remodelage vasculaire. Représentation transversale du développement du remodelage vasculaire artériel. Le vaisseau au milieu représente une artère saine. Le remodelage vasculaire peut être un remodelage hypotrophique qui réduit la lumière du vaisseau (gauche), eutrophique sans changement du diamètre de la lumière du vaisseau (centre) ou hypertrophique caractérisé par un épaississement de la média (droite). Ces formes de remodelage peuvent se faire vers l'intérieur (haut) se traduisant par une réduction du diamètre des vaisseaux ou vers l'extérieur (bas) se traduisant par une augmentation du diamètre des vaisseaux. (Modifiée de [127] et [128])

1.1.5.3 Fibrose vasculaire

Dans les vaisseaux normaux, la matrice extracellulaire est composée de collagènes de type I et III, d'élastine et de protéoglycans. Ces protéines jouent un rôle dans le maintien de la structure des vaisseaux, mais également dans la résistance à la traction ainsi qu'à l'élasticité. [1] En situation pathologique, comme lors de l'hypertension, les CML adopte un phénotype synthétique, ce qui augmente le dépôt de protéines de matrice extracellulaire. [129-131] Le remodelage est facilité par la production de métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMP pour *matrix metalloproteinase*) qui dégradent le collagène et facilitent la migration des CML. [132] Au niveau vasculaire, les MMP incluent les collagénases qui digèrent le collagène sous forme de fibres (collagène I en collagène III), les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) qui

dénaturent le collagène IV et V retrouvé dans la membrane sous-endothéliale et finalement les stromelysines (MMP-3) qui digèrent les molécules adhésives comme la laminine et la fibronectine [133], et les protéoglycans [134]. Ce remodelage résulte en une paroi vasculaire plus rigide dont la compliance est grandement réduite. [135]

1.1.5.4 Formation de l'athérosclérose

L'excès de LDL circulants favorise l'accumulation de lipides puis leur oxydation dans la média des artères. Cette accumulation, appelée strie lipidique, initie une réponse inflammatoire et permet l'activation des CE. Les CE expriment alors des molécules d'adhésion comme les sélectines, les molécules d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM pour *Vascular Cell Adhesion Molecule*) et les molécules d'adhésion intracellulaire (ICAM pour *Intracellular Cell Adhesion Molecule*). Ces molécules permettent le recrutement des monocytes qui entrent dans la paroi vasculaire. Les CE et les CML sécrètent la protéine chimioattractante des monocytes (MCP-1 pour *monocyte chemoattractant protein-1*) qui accroît l'entrée des monocytes à travers les tissus. Les monocytes deviennent ensuite des macrophages et internalisent les particules lipidiques oxydées. [51]

Les macrophages accumulent tant de particules lipidiques qu'ils se transforment en cellules spumeuses. Elles sécrètent alors des cytokines permettant l'instauration d'une réaction inflammatoire qui deviendra chronique. Les cellules spumeuses initient également la migration et la prolifération des CML par la sécrétion du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF pour *platelet derived growth factor*). Ces CML accumulent des particules lipidiques oxydées contribuant à l'augmentation du nombre de cellules spumeuses ainsi qu'à la formation de la capsule fibreuse qui entoure la plaque d'athérosclérose. (Voir Figure 9. Formation et développement de la plaque d'athérosclérose) Les CML sécrètent aussi du collagène contribuant à la stabilisation de la plaque. La plaque peut par la suite se fragiliser en raison de la réduction du nombre de CML survenant à la suite de leur apoptose ainsi que d'une diminution de la quantité de collagène sous l'action des MMP. La rupture de la plaque suite à sa fragilisation ou par l'érosion des CE à sa surface entraîne l'occlusion du vaisseaux et une

ischémie des tissus comme lors d'un infarctus du myocarde dans le cœur ou lors d'un accident vasculaire cérébral dans le cerveau. [51]

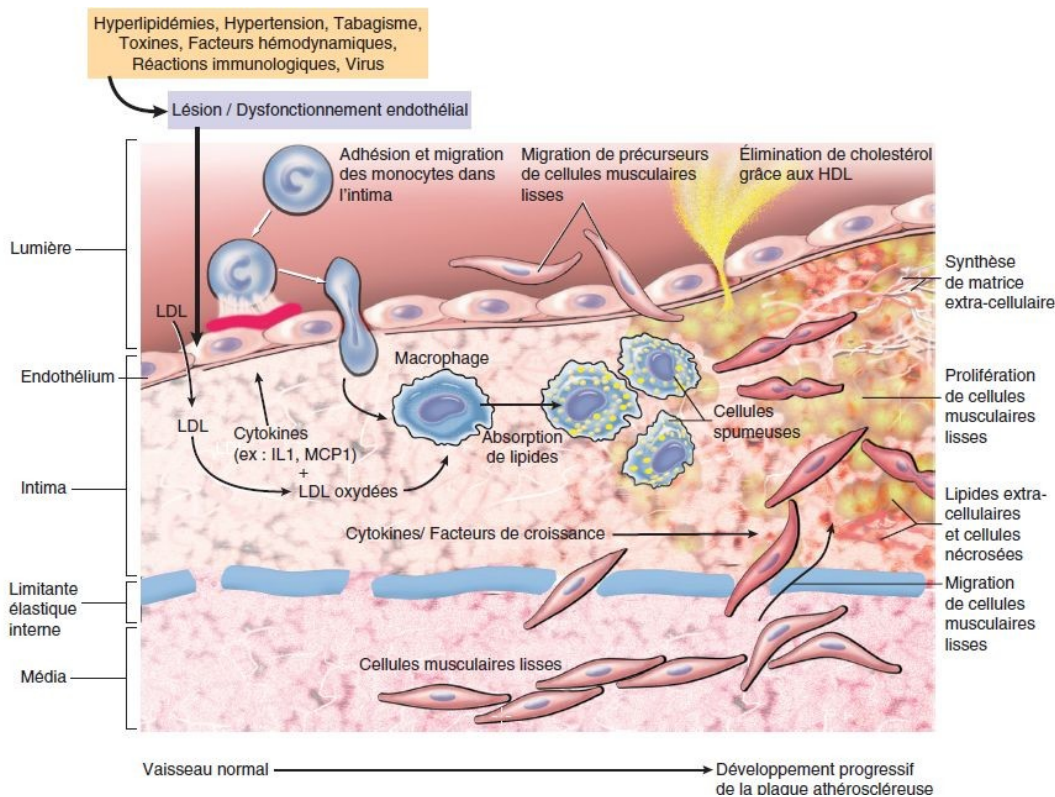


Figure 9. Formation et développement de la plaque d'athérosclérose. Les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires activent l'endothélium. Les molécules d'adhésion qui sont exprimées à la surface des CE participent au recrutement des monocytes. Dans l'espace sous-endothélial, ils deviennent des macrophages et ingèrent les lipides qui sont présents dans la paroi vasculaire. Les macrophages se transforment en cellules spumeuses et sécrètent diverses cytokines qui stimulent la prolifération et la migration des CML. Elles produisent des constituants de la matrice extracellulaire, notamment le collagène. Les CML ingèrent des lipides et se transforment également en cellules spumeuses. Les cellules de la plaque d'athérosclérose en développement sécrètent des cytokines proinflammatoires menant à l'instauration de processus inflammatoires chroniques. Finalement, l'apoptose des CML et la réduction du contenu en collagène fragilisent la plaque d'athérosclérose. Sa rupture mène à l'occlusion du vaisseau. (modifiée de [136])

1.1.6 Le remodelage cardiaque

Une pression sanguine élevée est le facteur de risque le plus important pour l'insuffisance cardiaque. En effet, 75% des patients souffrants d'insuffisance cardiaque ont des antécédents d'hypertension. [137] Le cœur est constamment sous l'influence de facteurs de stress internes et externes. Afin de compenser ses facteurs de stress, certains mécanismes sont activés afin de réduire leurs effets néfastes. Cette balance entre les facteurs de stress et la capacité du cœur à induire des mécanismes compensatoires définit la structure, la forme et la fonction du cœur. Pour s'ajuster aux changements dans le volume ou de la pression sanguine, la paroi ventriculaire subit un remodelage. [138] Ce processus est le résultat d'une série d'évènements transcriptionnels, signalétiques, structurels, électrophysiologiques et fonctionnels se produisant parmi les cardiomyocytes. Ultiment, les cardiomyocytes subissent une hypertrophie qui mène à un épaississement de la paroi du ventricule. En plus des cardiomyocytes, les fibroblastes, les CML, les CE et les leucocytes sont également impliqués dans le remodelage cardiaque en induisant la fibrose, le durcissement de la paroi ventriculaire, la dysfonction endothéliale ainsi que l'inflammation chronique. [139]

Le remodelage cardiaque est considéré comme une adaptation physiologique aux facteurs de stress qui accroissent le travail du myocarde. [140] L'hypertrophie du myocarde est caractérisée par une réduction de la contractilité et une augmentation de la rigidité du myocarde. L'insuffisance cardiaque survient lorsque le myocarde est incapable de fonctionner avec la charge de travail qui lui est imposée en raison de la demande augmentée en oxygène et de la réduction de la contractilité ou de l'élasticité du myocarde. [141] L'imposition d'une surcharge hémodynamique chronique sur le cœur induit une réponse hypertrophique des cardiomyocytes pour préserver les fonctions ventriculaires. Il y a alors une synthèse *de novo* des sarcomères, l'unité contractile du myocyte, composés de filaments d'actine et de myosine. [1] Cette addition peut se faire de façon concentrique ou excentrique. (Figure 10. Le remodelage cardiaque.)

1.1.6.1 Hypertrophie concentrique

Une surcharge de pression sanguine chronique, secondaire à une sténose aortique ou à de l'hypertension, induit la synthèse *de novo* ainsi que l'alignement parallèle des sarcomères. Cette formation conduit à une augmentation de la largeur des cardiomyocytes dans le ventricule gauche et initie l'hypertrophie concentrique. Ce type d'hypertrophie est caractérisé par l'épaississement important de la paroi ventriculaire et d'une réduction du rayon de chambre du ventricule. (Voir figure 10. Le remodelage cardiaque) L'hypertrophie concentrique représente une normalisation de la réponse adaptative élevée au stress élevé que subit la paroi artérielle au moment de la systole. [142]

Pendant le développement post-natal, des changements spécifiques dans l'expression des gènes cardiaques ont été identifiés. Les protéines cardiaques contractiles du fœtus (par exemple, *alpha*-actine squelettique et la chaîne lourde *bêta* de la myosine) et le peptide natriurétique auriculaire (ANP) sont régulés à la baisse dans le myocarde pendant la maturation. [143] La réponse hypertrophique concentrique du cœur adulte qui accompagne une surcharge de pression chronique conduit à la récapitulation de leur expression. [144]

1.1.6.2 Hypertrophie excentrique

Une surcharge de volume sanguin chronique, secondaire à la régurgitation valvulaire mitrale ou après un infarctus du myocarde, induit la synthèse *de novo* de sarcomères et de leur alignement dans un motif en série conduisant à une augmentation de la longueur des cardiomyocytes. [142] (Voir figure 10. Le remodelage cardiaque) Il y a également une modeste augmentation de l'épaisseur de la paroi ventriculaire. Dans ce type hypertrophie, la réponse engendrée n'est pas en mesure de normaliser le stress élevé à la paroi lors de la diastole. [142]

Analogue à l'hypertrophie cardiaque concentrique, l'ANP est ré-exprimée dans le myocarde. [145] Cependant, le développement de l'hypertrophie excentrique ne conduit pas à

la récapitulation de l'*alpha*-actine squelettique et de la chaîne lourde *bêta* de la myosine.
[145]

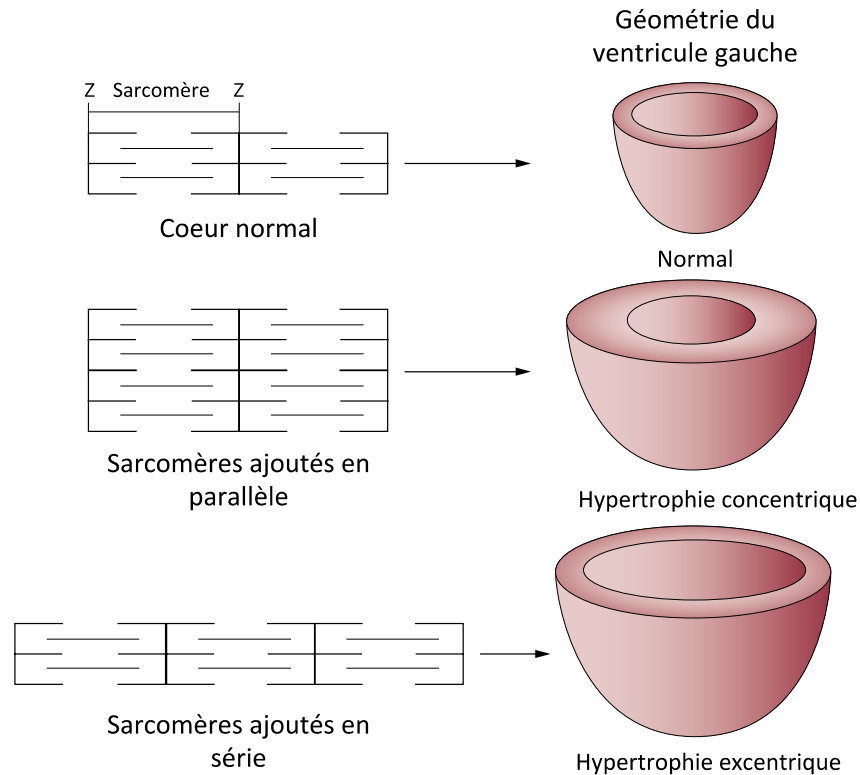


Figure 10. Le remodelage cardiaque. Représentation du développement du remodelage ventriculaire. Le ventricule du haut représente un ventricule normal. Les sarcomères, l'unité contractile des myocytes cardiaques sont ajoutés en parallèle pour induire une hypertrophie concentrique (image du centre) ou en série pour induire une hypertrophie excentrique (image du bas) (Image modifiée de [140])

1.1.6.3 Fibrose ventriculaire

Le remodelage ventriculaire est également caractérisé par un dépôt excessif de matrice extracellulaire qui entraîne une altération dans la contractilité du muscle cardiaque ainsi qu'une perturbation du rythme cardiaque. [146] Les fibroblastes cardiaques sont responsables de la sécrétion de la matrice extracellulaire. Or, en situation pathologique, ceux-ci prolifèrent et se différencient en myofibroblastes. Ainsi différenciés, ils acquièrent la capacité de sécréter

du collagène I et III ainsi que de la fibronectine. [146] Il existe deux types de fibrose. La fibrose réactive qui se forme en présence d'hypertension et la fibrose réparatrice qui se forme suite à un infarctus du myocarde. La fibrose réactive est caractérisée par un dépôt de collagène parmi les fibres musculaires. Cette accumulation réduit la compliance et diminue la capacité de la diffusion de l'oxygène dans la paroi ventriculaire. [139] La fibrose réparatrice est caractérisée par un remodelage des protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène, mais elle fait également intervenir des processus inflammatoires. [147]

1.2 Le diabète

Le diabète est considéré comme la grande épidémie du 21^e siècle en raison du nombre croissant de personnes souffrant de cette maladie. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'il y a 347 millions de personnes diabétiques dans le monde. En 2010, l'OMS estimait que 3,4 millions de personnes étaient décédées des conséquences d'une hyperglycémie à jeun. D'ailleurs, l'OMS prévoit que ce chiffre doublera d'ici 2030 si la progression de la maladie se maintient. [148]

Le diabète est une maladie chronique qui survient lorsqu'une quantité insuffisante d'insuline, l'hormone qui régule la concentration de glucose dans le sang, est produite par le pancréas ou qu'elle n'est pas utilisée correctement. [148] L'hyperglycémie, une concentration anormalement élevée de glucose dans le sang, est un effet fréquent du diabète non contrôlé et conduit à de graves atteintes, particulièrement au niveau des vaisseaux sanguins. [149]

1.2.1 Types de diabète

1.2.1.1 Diabète de type 1

Le diabète de type 1 (DT1) ou diabète juvénile ou encore diabète insulino-dépendant est caractérisé par une production insuffisante d'insuline et exige une administration quotidienne de cette dernière. Le DT1, qui compte pour 5 % des cas de diabètes diagnostiqués, se développe lorsque le système immunitaire détruit les cellules *bêta* des îlots de Langerhans dans le pancréas. Ces cellules sont les uniques responsables de la production et la sécrétion d'insuline, l'hormone qui régule la glycémie. Ce type de diabète survient principalement chez les enfants et les jeunes adultes. Les facteurs de risque peuvent être immunitaires, génétiques

ou environnementaux. [150] Chez les personnes atteintes de DT1, l'incidence de l'athérosclérose est plus précoce, les plaques sont plus diffuses et mènent à une incidence de mortalité plus élevée ainsi que des chances de survie plus faible après un infarctus du myocarde. [148]

1.2.1.2 Diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2), précédemment appelé diabète non insulino-dépendant ou diabète de la maturité, résulte d'une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme. Le DT2 débute par l'apparition d'une résistance cellulaire à l'insuline, les cellules ne sont plus capables d'utiliser l'insuline convenablement. Les besoins en insuline augmentent, alors que le pancréas perd graduellement sa capacité à en produire. Le DT2 représente 90% des diabètes rencontrés dans le monde et est exclusivement dû à de mauvaises habitudes de vie. Il est en grande partie le résultat d'une surcharge pondérale et de la sédentarité, mais est également influencé par l'âge, les antécédents familiaux et l'apparition d'un diabète gestationnel. [148, 150] Le DT2 est généralement observé chez l'adulte, mais il est désormais de plus en plus présent chez les adolescents. [151]

1.2.1.3 Diabète gestationnel

Le diabète gestationnel est une hyperglycémie qui peut apparaître ou être décelée pour la première fois pendant la grossesse. Ce type de diabète requiert un traitement pour optimiser la glycémie maternelle afin de réduire les complications chez l'enfant. [150] Les femmes qui développent un diabète gestationnel ont de 35 à 60% plus de risque de développer un DT2 dans les 10 à 20 ans suivant l'accouchement. [150].

1.2.2 Développement du diabète

La fréquence élevée de facteurs de risque des maladies cardiovasculaires chez les patients avec le diabète, comme l'obésité, la dyslipidémie et l'hypertension, peut expliquer la sévérité de leurs atteintes cardiovasculaires. L'instauration de l'état diabétique résulte d'une série d'altérations métaboliques débutant par l'accumulation de tissu adipeux abdominal, puis l'instauration d'un état hyperglycémique chronique et finalement l'apparition d'une résistance à l'insuline.

1.2.2.1 Obésité et inflammation

Le surplus de poids, principalement l'accumulation abdominale autour des viscères, contribue au développement de la résistance à l'insuline. [152] L'augmentation de la taille des adipocytes réduit l'apport de sang aux cellules du tissu adipeux qui se retrouvent dans un état hypoxique. [153] L'hypoxie a été proposée comme mécanisme initiant l'infiltration de macrophages dans le tissu adipeux menant à une surproduction d'adipocytokines, les cytokines sécrétées par les adipocytes, et à l'initiation d'un stade inflammatoire chronique. [154] L'adiponectine, une adipocytokine, régule le métabolisme des lipides et du glucose, augmente la sensibilité à l'insuline, régule la consommation d'aliments ainsi que le poids chez l'individu sain. [154] L'adiponectine possède également des propriétés anti-athérogéniques comme l'inhibition de l'activation des CE, une réduction de la conversion des macrophages en cellules spumeuses, l'inhibition de la prolifération des CML et le remodelage artériel qui caractérise les plaques d'athéroscléroses matures. [155] Toutefois, la concentration d'adiponectine est inversement corrélée au nombre de facteurs de risque cardiovasculaires. [156]

Le stade inflammatoire associé à l'obésité et la résistance à l'insuline a été décrit pour la première fois en 1993 par Hotamisligil *et al.*. [157] Dans cette étude, l'expression de cytokines pro-inflammatoires telle que le Facteur nécrosant des tumeurs (TNF- α pour *tumor*

necrosis factor alpha), était augmentée de façon marquée dans des souris obèses et la neutralisation du TNF- α a mené à une amélioration de la résistance à l'insuline. Depuis, il a été démontré que le tissu adipeux est capable de sécréter plusieurs cytokines pro-inflammatoires dont le TNF- α [158], la Protéine réactive C (CRP pour *C-reactive protein*) [159], l'Interleukine-6 (IL-6) [160] (qui module la production de CRP par le foie [161]) et le PAI-1 [162]. Ces facteurs sont associés à un indice de masse corporel élevé ou un tour de taille élevé. [163] [164]

L'inflammation locale induite par le tissu adipeux se propage de façon systémique et est associée à la comorbidité liée à l'obésité. [165] Ceci incluant la sensibilité à l'insuline [166], le stress oxydatif [167], le métabolisme énergétique, la coagulation sanguine et la réponse inflammatoire [168] qui accélèrent la formation ainsi que la progression de l'athérosclérose, la rupture de la plaque et l'athérombose. L'inflammation induite par le tissu adipeux ressemble à celle retrouvée dans l'athérosclérose et est amplifiée par la présence du syndrome métabolique, de la résistance à l'insuline et d'une dérégulation du profil lipidique. [169]

1.2.2.2 Syndrome métabolique et hyperglycémie

Le syndrome métabolique ou stade prédiabétique est un état physiologique qui réunit les différents facteurs suivants : une résistance à l'insuline, une adiposité viscérale, une dyslipidémie athérogénique, une dysfonction endothéliale, une pression sanguine élevée et un état d'hypercoagulation. [154] De plus, il a été démontré que certains facteurs comme un statut socioéconomique élevé, un style de vie sédentaire, un indice de masse corporel élevé, l'hérédité, l'alimentation, le tabagisme, un historique familial de diabète ainsi que l'éducation peuvent influencer la prévalence du syndrome métabolique. [170]

La glycémie est mesurée en gramme de glucose par litre de sang. Pris à jeun, le taux normal de glucose dans le sang est compris entre 0,74 g/l et 1,06 g/l. Cependant, une personne est considérée en hyperglycémie et diabétique lorsqu'elle obtient une valeur de glycémie au-dessus de 1,26 g/l à jeun. [148] L'hyperglycémie non contrôlée exerce des effets néfastes sur

le système cardiovasculaire. En effet, elle mène à l'augmentation de la formation intracellulaire des produits terminaux de la glycation avancée (AGE pour *advanced glycation end products*) en plus de l'augmentation de l'expression et de l'activation de leurs récepteurs (RAGE pour *receptor of advanced glycation end products*). [171] La liaison des AGE avec leur récepteur accroît la production intracellulaire d'anions surperoxydes [172], stimule l'inflammation médiée par les macrophages présents dans la paroi vasculaire [173] et mène à l'activation des CE. Ces dernières expriment alors des molécules d'adhésion (VCAM) et sécrètent de l'IL-6 ainsi que la MCP-1. [174] L'impact de l'activation de ces mécanismes se traduit par une augmentation du stress oxydatif, de l'apoptose et de la perméabilité vasculaire. [171] Ils diminuent la biodisponibilité du NO ainsi que l'expression de eNOS [175] tout en augmentant l'expression de ET-1 dans les CE. [176] L'augmentation des AGE altère ainsi la balance entre le NO et l'ET-1, favorisant la vasoconstriction et la dysfonction endothéliale. L'hyperglycémie favorise aussi le développement de l'athérosclérose en affectant les CML de la paroi vasculaire et en activant les MMP, les enzymes impliquées dans la rupture de la plaque d'athérosclérose et dans le remodelage vasculaire. [177]

1.2.2.3 Résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline (RI) est définie comme une perturbation du métabolisme de l'insuline stimulée par le glucose et/ou les lipides. [50] Elle réfère à la diminution de la capacité de l'insuline à stimuler l'incorporation du glucose par le muscle squelettique et le tissu adipeux ainsi que de la suppression de la production de glucose par le foie. [178] La glycogénèse (formation du glucose par hydrolyse du glycogène contenu dans le foie et les muscles) et la glycolyse (dégradation du glucose lors du métabolisme énergétique) ne sont plus contrôlées adéquatement et le glucose reste en circulation. [154] Afin de compenser la résistance des tissus à l'action de l'insuline, les cellules *bêta* du pancréas augmentent leur sécrétion d'insuline ce qui provoque une hyperinsulinémie. [154] Après une certaine période de temps, les cellules *bêta* s'épuisent et ne sont plus capables de produire d'insuline. Le diabète survient alors qu'une faible quantité d'insuline est produite en réponse à une

concentration donnée de glucose.

Normalement, l'insuline se lie à son récepteur (IRS-1 pour *insulin receptor signaling* -1) et son autophosphorylation active la voie de signalisation de l'insuline. [179] Les effets métaboliques et hémodynamiques issus de l'activation du IRS-1 sont médiés par les voies de la protéine kinase phosphatidylinositol 3 phosphate (PI3K pour *phosphatidylinositol 3 phosphate kinase*) et les protéines mitogéniques à activités kinases (MAPK pour *mitogen activated protein kinase*) activées par la protéine Ras. Ces voies sont impliquées dans la régulation de l'expression génique, la prolifération et la différenciation cellulaire. [180] Normalement, l'insuline facilite la vasodilatation dépendante du NO *in vivo* [181] et augmente l'expression de la eNOS dans les CE *in vitro*. [182] Lorsqu'il y a de la RI, la voie PI3K est altérée, la production de NO est diminuée puis la dysfonction endothéliale s'installe. [183] La RI stimule aussi la production d'ET-1 qui stimule la vasoconstriction, l'augmentation du PAI-1 et l'expression des molécules d'adhésion. [184] En plus de ces effets directs sur les CE, la RI induit la prolifération et la migration des CML qui participent au remodelage vasculaire ainsi qu'à la formation de plaque d'athérosclérose.

Dans le tissu adipeux, l'insuline stimule la relâche excessive d'acides gras libres participant au développement de la dyslipidémie et à l'apparition d'un profil lipidique proathérogénique qui comprend une forte concentration de VLDL. [185] La présence des acides gras libres en grande quantité réduit la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans les modèles animaux ainsi que chez l'humain et contribue aux maladies cardiovasculaires. [149]

L'inflammation chronique induite par le tissu adipeux peut avoir des répercussions sur la signalisation de l'insuline. En effet, il y a des changements dans la transcription des molécules de la voie de signalisation de l'insuline, en particulier l'expression du récepteur IRS-1 ainsi que du transporteur de glucose Glut4, en réponse à la sécrétion de TNF α . [186, 187]

1.2.3 Dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale apparaît dans les stades précoces du syndrome métabolique et de la RI. En effet, elle précède le diagnostic clinique du DT2 de plusieurs années. [188] L'apparition de la dysfonction endothéliale conduit à l'instauration d'un cercle vicieux d'évènements caractérisés par l'augmentation du stress oxydatif, des processus inflammatoires chroniques et de l'hyperactivité plaquettaire. [189]

En temps normal, l'insuline influence la vasodilatation par l'activation de la eNOS à travers la voie de signalisation PI3K/AKT et par la modulation de son cofacteur, le BH₄. [190] Cependant, cette vasodilatation est compromise en situation de RI. [191] Réciproquement, la eNOS joue un rôle dans la sensibilité cellulaire à l'insuline. [192] D'ailleurs, un modèle murin eNOS^{-/-} a permis de démontrer que l'absence de ce facteur accélère le développement de la RI. [193]

L'exposition des CE à l'hyperglycémie chronique mène à la dysfonction endothéliale et à une perte de réactivité vasculaire. (Révisé dans [108]) Les mécanismes impliqués dans la réduction de la vasodilatation dépendante du NO dans un contexte de diabète incluent : 1- la réduction de la biodisponibilité de cofacteur (BH₄) et la diminution de l'activité de la eNOS; 2- l'augmentation de l'activité de l'arginase qui compétition avec la eNOS pour l'arginine; 3- des taux élevés de ADMA, un inhibiteur de eNOS; 4- l'augmentation de la production d'anions superoxydes (O₂⁻) et de la transformation du NO en peroxynitrite; 5- la réduction du NO par les AGE et 6- une réponse anormale des CML. (Révisé dans [108])

Dans les artères de résistance, le NO, la protacycline (PIG2), et les EDRF sont impliqués dans la médiation de la fonction endothéliale. [194] Des altérations dans la réponse médiée par les EDRF ont été rapportées dans un modèle de rat diabétique et chez des patients atteints de diabète. [195, 196] Ainsi, la relaxation dépendante de l'endothélium induite par l'acétylcholine est abolie dans les artères diabétiques chez les modèles animaux. [197] Ceci est dû à une relâche de EDCF suite à l'exposition des CE à de fortes concentrations de glucose, provoquant une augmentation du stress oxydatif ainsi que l'expression de COX-1 et de COX-2 qui résultent en une vasoconstriction accrue. [68, 198]

1.2.4 Complications vasculaires du diabète

Autant le DT1 que le DT2 représentent un facteur de risque important des maladies cardiovasculaires, des accidents vasculaires cérébraux et des maladies des artères périphériques. [189] En effet, le diabète augmente de 2 à 4 fois le risque de maladies cardiovasculaires par l'accélération du développement de lésions athérosclérotiques. [199] Le diabète est associé à une variété de complications liées à la microvasculature (rétinopathies, neuropathies) et à la macrovasculature (maladies cardiovasculaires, maladies des artères périphériques). [200] Les complications sont liées à des modifications structurelles et fonctionnelles des vaisseaux sanguins.

1.2.4.1 Complication de la microvasculature

Les microvaisseaux ont un rôle spécifique dans la régulation de la pression sanguine et la livraison de nutriments. Les perturbations de la fonction de la microvasculature peuvent se produire bien avant l'apparition de l'hyperglycémie et des changements vasculaires pathologiques. [201]

1.2.4.1.1 Neuropathie

Les neuropathies diabétiques sont définies par la présence de symptômes résultant de la dysfonction des nerfs périphériques. Cette pathologie est caractérisée par une douleur ressentie comme des chocs électriques, comme des brûlures ou encore par une perte de sensation. Elles affectent près de 50% des patients diabétiques et diminuent leur qualité de vie. [202] Les conséquences des neuropathies incluent également la dépression, une susceptibilité aux fractures des pieds ou des chevilles, des ulcérations et des amputations au niveau des jambes. [203, 204] Les atteintes directes aux axones, résultant des altérations métaboliques en

combinaison avec l'hyperglycémie chronique, la résistance à l'insuline et la dysfonction endothéliale et fonctionnelle des microvaisseaux, entraînent une ischémie au niveau des nerfs et ultimement au développement des neuropathies. [205]

1.2.4.1.2 Rétinopathie

La rétinopathie diabétique est un défaut dans la vision des patients atteint de DT1 et de DT2. Elle est caractérisée par une dysfonction vasculaire, par des oedèmes à la rétine, par des hémorragies oculaires ainsi qu'une croissance inappropriée de vaisseaux sanguins (angiogenèse). [206] De plus, il a été constaté une augmentation marquée du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF pour *vascular endothelial growth factor*) dans le liquide vitré (à l'intérieur de l'oeil) de patients atteints de rétinopathie diabétique. [207] En effet, le VEGF provoque une désorganisation des jonctions des CE et agit comme un puissant agent mitogène. Le VEGF serait le principal facteur de croissance impliqué dans la pathologie. Il y a également des indications claires que la fonction de la rétine est affectée peu de temps après l'apparition du diabète et que cette dégénération est une composante de la rétinopathie diabétique. [206] Les altérations biochimiques caractéristiques du diabète, dont la réduction des récepteurs à l'insuline [208], la diminution de l'activité de Akt [209] et l'augmentation du stress oxydatif [210], surviennent de 1 à 6 mois après l'apparition du diabète. Ces événements précoces suggèrent la possibilité que la réponse d'adaptation de la rétine change en présence de l'hyperglycémie ou autres perturbations métaboliques induites par le diabète. De plus, une courte exposition à l'hyperglycémie réduit la vasodilatation vasculaire oculaire. Toutefois, cette réponse est réduite lorsque l'hyperglycémie est contrôlée. [211]

1.2.4.1.3 Néphropathie

Le DT1 et le DT2 sont des causes majeures des néphropathies. La néphropathie diabétique est la principale cause d'insuffisance rénale terminale et de mortalité suite à un

évènement cardiovasculaire. [212] Elle est caractérisée par une hypertrophie des glomérules, un épaississement des membranes du glomérule ainsi que des tubules suite à l'accumulation de matrice extracellulaire. D'ailleurs, cette accumulation cause une fibrose, une sclérose des glomérules ainsi qu'une altération dans la structure des podocytes. [213, 214] Ceux-ci sont des cellules épithéliales composant la capsule de Bowman au niveau du glomérule rénal. Les podocytes s'enroulent autour des capillaires glomérulaires en ne laissant à découvert que de petits espaces de filtration. [1, 215] L'hyperglycémie serait responsable de l'apparition de la néphropathie diabétique en induisant des changements métaboliques comme la génération des AGE, l'activation anormale de la protéine kinase C (PKC) et une augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation. [213, 214]

1.2.4.2 Complication de la macrovasculature

1.2.4.2.1 Maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont la cause majeure de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de DT2, avec plus de la moitié des patients diabétiques qui meurent de ces maladies. D'ailleurs, les maladies des artères coronaires sont plus fréquentes et plus sévères chez les patients diabétiques en comparaison avec les non-diabétiques. [216] Parmi les maladies cardiovasculaires développées chez les patients souffrant de diabète, notons les cardiopathies diabétiques, les accidents vasculaires cérébraux et les infarctus du myocarde liés au développement de l'athérosclérose.

1.2.4.2.1.1 Cardiopathie et insuffisance cardiaque

La cardiopathie diabétique est définie comme une insuffisance cardiaque résultant d'une dysfonction ventriculaire indépendante de l'hypertension ou des maladies des artères coronaires. [217] La prévalence de cardiopathie chez les patients avec un DT2 bien contrôlé

est estimée à 60% et se détecte par la présence d'une hypertrophie ventriculaire et d'une dysfonction diastolique. [218, 219] Les hommes et les femmes avec un DT2 sont respectivement 2,4 et 5 fois plus à risque de développer de l'insuffisance cardiaque en comparaison avec des sujets non diabétiques de même sexe et d'âge équivalent. [220]

1.2.4.2.1.2 Accidents vasculaires cérébraux

Le DT2 est un facteur de risque majeur dans l'apparition des accidents vasculaires cérébraux. [221] Les patients avec un DT2 souffrent d'accidents vasculaires cérébraux plus sévères et avec de pires pronostiques de réhabilitation que les sujets sans DT2. [221] Une augmentation de l'incidence d'évènements cardiovasculaires chez les patients avec un DT2 n'est pas seulement due à l'hyperglycémie, mais également à la résistance à l'insuline, une faible inflammation chronique ainsi qu'une activation de la cascade de coagulation. [221]

1.2.4.2.1.3 Infarctus du myocarde

Le diabète, particulièrement en présence d'une hyperglycémie chronique et incontrôlée, contribue à la sévérité de l'athérosclérose. [222] Les patients diabétiques avec un historique de tabagisme et d'hypertension sont 8 fois plus à risque d'être victime un infarctus du myocarde en comparaison avec un sujet non diabétique. [223] Les patients diabétiques ont des risques plus élevés de développer de l'insuffisance cardiaque suite à un infarctus du myocarde que les sujets non-diabétiques. [224, 225] Les maladies cardiovasculaires sont fréquentes chez les patients souffrants de DT2 dû à l'accélération du développement et à une progression plus rapide de l'athérosclérose. Cette incidence plus élevée est aussi associée avec les facteurs de risque et les désordres métaboliques tels que l'obésité viscérale, l'hypertension, la dyslipidémie, l'hyperglycémie et la présence de facteurs pro-thrombotiques. [224]

1.2.4.2.2 Maladies des artères périphériques

En plus d'avoir des atteintes au niveau des artères de gros calibres [226], les patients diabétiques présentent aussi des maladies des vaisseaux de petits calibres. Ces maladies se caractérisent par l'épaississement de la membrane basale des vaisseaux, la raréfaction des capillaires et l'altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. [227] Les maladies des artères périphériques sont caractérisées par une occlusion des artères des extrémités inférieures chez l'humain. [228] Elles peuvent ainsi causer de la claudication intermittente [229] et de la douleur qui entraîne un handicap fonctionnel. [230] Les patients diabétiques ayant des maladies des artères périphériques sévères peuvent également souffrir d'ulcérations, qui sont difficiles à guérir au niveau des pieds et pouvant mener à des amputations des membres inférieurs. [231] D'ailleurs, les gens atteints de diabète sont 15 fois plus à risque d'avoir une amputation des membres inférieurs que les sujets non-diabétiques. [232]

1.2.5 Le développement de l'hypertension en situation diabétique

La coexistence de l'hypertension et du diabète semble être corrélée avec la diminution de la réponse vasculaire à la pression sanguine. [233] D'ailleurs, l'hypertension est également associée avec les désordres métaboliques tels que l'obésité, l'intolérance au glucose et la dyslipidémie. [234] Des études suggèrent que l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie activent le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) en augmentant l'expression de l'angiotensinogène, de l'angiotensine II (ang II), ainsi que celle du récepteur à l'ang II. Ces éléments contribueraient au développement de l'hypertension, chez les patients qui présentent de la RI [235], et de la vasoconstriction des artères. [236] Il a récemment été démontré que les adipocytes sécrètent de l'aldostérone en réponse à ang II. [237] De cette façon, les adipocytes peuvent être considérés comme un système rénine-angiotensine local dans le tissu adipeux.

1.2.6 Impact du diabète sur le remodelage vasculaire

L'endothélium joue un rôle dans la régulation de l'intégrité, de l'homéostasie et du remodelage vasculaire et de l'angiogenèse. [41] Le diabète entraîne une dysfonction endothéliale et exacerbe le développement de l'athérosclérose. Les CML sont également directement influencées par le diabète. En effet, le glucose peut stimuler la prolifération, la migration et l'altération de la réactivité des CML via l'activation du système rénine-angiotensine. [215] Chez les patients atteints du DT2, la réponse vasodilatatrice au NO exogène est diminuée. [238] Par ailleurs, la réponse aux vasoconstricteurs exogènes est également altérée. [239] Le diabète accroît l'activité des PKC, de la production de NF-kB et la génération de ROS dans les CML vasculaires. Cette dérégulation des CML est comparable à la dysfonction des CE qui se produit chez les patients atteints de diabète. [240] De plus, le diabète favorise la migration des CML dans la plaque athérosclérotique en formation, où elles prolifèrent et sécrètent de la matrice extracellulaire, une étape importante dans la maturation de la plaque. [241] L'apoptose des CML est également accrue dans les plaques athérosclérotiques des patients souffrants de DT2. Cette perte cellulaire fragilise la plaque et mène à une rupture plus rapide de celle-ci. Ultiment, il y aura une occlusion du vaisseau causant un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral dépendamment du vaisseau touché. [242] Chez les personnes diabétiques, la relâche de cytokines diminue la synthèse de collagène et accroît la production de MMP contribuant également à la déstabilisation de la plaque d'athérosclérose. [243]

Le diabète peut exercer différents effets sur la paroi vasculaire dépendamment du type de vaisseaux et de sa localisation dans la microvasculature ou de la macrovasculature. Dans les microvaisseaux, comme les artères de résistance, les artérioles et les capillaires [244], le remodelage se traduit par un épaississement de la membrane basale, observé dans les artérioles glomérulaires, de la rétine, du myocarde, de la peau et des muscles. Cet épaississement altère les fonctions des vaisseaux et est directement lié à l'hypertension, à la diminution de la réparation vasculaire et à l'hypoxie. Il existe une relation linéaire entre l'hyperglycémie et les complications microvasculaires. [245] L'hyperglycémie induit la production de VEGF via

l'activation de la PKC résultant en une augmentation de la perméabilité membranaire et de l'inflammation. [246] Les artères de résistance sont des éléments clés dans le contrôle de la pression sanguine [247], leur altération structurelle a de grandes répercussions sur la pression sanguine. Aucun changement n'a été observé dans les artères sous-cutanées de patients souffrants de DT1 contrairement au remodelage important ayant été constaté chez ceux atteints de DT2. [248] Une augmentation marquée de l'aire de la média est observée suggérant la présence d'un remodelage hypertrophique (hyperplasie ou hypertrophie des CML). [248, 249] D'ailleurs, une corrélation existe entre le niveau d'insuline circulante et le ratio média/lumière dans les artères sous-cutanées chez les patients diabétiques, suggérant ainsi un rôle possible de l'insuline dans la genèse du remodelage hypertrophique chez ces patients. [248] Un stimulus possible pour le remodelage hypertrophique peut être l'augmentation du stress sur la paroi vasculaire pouvant résulter d'une réponse myogénique altérée. En effet, la réponse myogénique est induite par une augmentation de la pression résultant de la vasoconstriction, laquelle est la clé de l'autorégulation de la circulation sanguine et de la stabilisation de la pression dans les capillaires. L'absence d'une telle réponse chez les patients diabétiques peut être responsable du développement du remodelage hypertrophique des petites artères. [249] Il y a également des altérations dans la matrice extracellulaire, comme le suggère l'augmentation du ratio collagène/élastine dans les petites artères. [248] Dans la microvasculature, les petites artères de résistance et les artérioles subissent un remodelage et l'apparition de la fibrose, les capillaires subissent une raréfaction structurelle et fonctionnelle menant à la réduction de la densité des capillaires dans les tissus. Ceci est observé chez les patients DT2, en particulier dans les muscles squelettiques. [250]

Les pathologies de la macrovasculature touchent les vaisseaux de moyens et de gros calibres. Elles sont caractérisées par l'apparition de l'athérosclérose ainsi que par la présence de thromboses et mènent à l'occlusion de ces vaisseaux comme dans le cas des pieds diabétiques. [226] Le remodelage vasculaire comprend des modifications chimiques et biologiques de la matrice extracellulaire, une altération des fonctions des CE et CML ainsi que des altérations des interactions entre les CE et les cellules circulantes via les molécules d'adhésion et les protéases. Au niveau macrovasculaire, ces altérations se traduisent par un épaississement de l'intima et de la média qui, avec l'augmentation de la rigidité et la réduction

de la vasoréactivité, augmente le risque de maladies cardiovasculaires. [251] Les patients souffrant de DT2 ainsi que d'hypertension présentent des altérations vasculaires dont l'augmentation du ratio média/lumière du vaisseau est appelée le remodelage hypertrophique. Les artères de gros calibres chez les patients diabétiques sont plus propices au remodelage vasculaire pathologique ainsi qu'au développement et à la déstabilisation des plaques athérosclérotiques. L'hyperglycémie active les MMP qui dégradent plus rapidement la matrice extracellulaire et provoquent la rupture de plaques athérosclérotiques. Une augmentation de la calcification des artères survient plus rapidement chez les patients diabétiques. [252] Ce dépôt de calcium ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire contribuent à l'augmentation de la rigidité des artères. La glycoxydation des protéines, la dégradation de la matrice extracellulaire par les MMP et l'altération de la vasorelaxation par les CML, contribuent à l'augmentation de la rigidité vasculaire en situation diabétique. [253] L'accumulation des AGE à l'intérieur comme à l'extérieur de la paroi vasculaire induit des changements de structure cytoplasmique et nucléaire aussi bien que des composants de la matrice extracellulaire. [254] D'ailleurs, l'augmentation du dépôt des protéines de la matrice extracellulaire en situation diabétique est bien documentée. [255, 256] Ceci contribue également à l'augmentation de la rigidité des parois vasculaires. [257] De plus, la composition vasculaire change avec le diabète, et, ce, en raison de la présence de macrophages, l'augmentation de la prolifération des CML ainsi que du déséquilibre des protéines de la matrice extracellulaire qui résulte de l'activation des MMP. [258] L'hyperglycémie stimule également la prolifération et la migration des CML ainsi qu'une altération de leur réactivité via le système rénine-angiotensine. [259] La contractilité et la survie des CML sont également contrôlées par le système SRAA. En situation hyperglycémique, la réponse à l'ang II est accrue via une l'augmentation des récepteurs AT1 ainsi que de la production des ROS. [260] La digestion de la lame élastique interne par les MMP facilite la migration/invasion des CML dans l'intima et mènent au développement et à la progression de la plaque d'athérosclérose. [261]

1.2.7 Impact du diabète sur la réparation vasculaire et l'angiogenèse

Les patients souffrants de diabète démontrent une capacité réduite de réparation vasculaire suite l'apposition d'une endoprothèse vasculaire ainsi qu'une capacité angiogénique grandement altérée. [262] Il a été démontré que les CEP participent à la réparation vasculaire. Cependant, les patients atteints de DT1 et de DT2 montrent des taux réduits de CEP circulantes ainsi qu'une dysfonction de ces dernières. [263, 264] De plus, il a été démontré que le nombre de CEP décroît proportionnellement à la sévérité de l'atteinte vasculaire. [265] La diminution de la capacité de régénération vasculaire est liée à la difficulté de mobilisation des CEP en situation diabétique. Une diminution de la relâche du facteur dérivé du stroma 1 (SDF-1 pour *stromal derived factor*), du VEGF et une incapacité à accroître la production musculaire du facteur induit par l'hypoxie (HIF-1 α pour hypoxia-inducible factor-1 α) expliquent l'incapacité des CEP à répondre efficacement suite à une lésion vasculaire. [266] Durant une ischémie, les tissus lésés recrutent des cellules proangiogéniques qui sont impliquées dans la restauration de la vasculature, dont les CEP qui participent à l'angiogenèse. En effet, l'injection de CEP, dans un modèle murin de ligature des membres inférieurs, a amélioré la récupération de la circulation sanguine et la capacité de former des capillaires que chez les sujets sains. [266] Cependant, chez les sujets diabétiques les CEP n'étaient pas mobilisées aussi efficacement. [266] L'angiogenèse dépend de l'efficacité des CEP et de CE à répondre à différents stimuli. D'ailleurs, l'expression de nombreux facteurs proangiogéniques est altérée dans les tissus ischémiques en situation diabétique. [266] Ces facteurs comprennent le VEGF, l'élastine et les MMP qui sont également impliqués dans la croissance et le maintien de l'intégrité de la paroi vasculaire. [267] À l'inverse de ces facteurs, les protéines anti-angiogéniques comme l'angiostatine et l'endostatine sont significativement élevées dans le myocarde diabétique. [268] Ainsi, il y a une diminution de la formation des vaisseaux collatéraux du cœur chez les patients diabétiques. [269] Toutefois, en situation diabétique, il existe un paradoxe angiogénique indiquant que le microenvironnement local des organes joue un rôle important dans les processus d'angiogenèse. [270] Par exemple, la rétinopathie où il y

a une réponse angiogénique exagérée et les maladies des artères périphériques où il y a une raréfaction des capillaires.

1.3 Hypertension

L'hypertension se définit par une tension artérielle élevée où la paroi des vaisseaux sanguins subit en permanence une pression. Plus la tension artérielle est élevée, plus le cœur doit s'ajuster et augmenter l'intensité des contractions. La tension artérielle normale d'un adulte est établie à 120 mmHg quand le cœur se contracte (pression systolique) et à 80 mmHg quand le cœur se relaxe (pression diastolique). [271] Quand la tension artérielle systolique est supérieure ou égale à 140 mmHg et/ou que la tension artérielle diastolique est supérieure ou égale à 90 mmHg, la tension artérielle est considérée élevée. Si cette tension demeure élevée de façon chronique, la personne est dite hypertendue. [271] L'hypertension peut être dite essentielle ou secondaire. L'hypertension essentielle est due à la présence de facteurs de risque des maladies cardiovasculaires, comme l'obésité. Alors que l'hypertension secondaire survient suite d'autres problèmes de santé comme une dysfonction rénale. [272]

1.3.1. Régulation de la pression sanguine

Plusieurs mécanismes homéostatiques interreliés régulent la tension artérielle en modulant la fréquence cardiaque, la résistance périphérique et le volume sanguin. Toutefois, la tension artérielle reste constante, le sang s'écoule selon un gradient de pression de l'aorte jusqu'aux veines. [1] Le cœur, comme les vaisseaux sanguins, a des mécanismes qui lui est propres pour ajuster la tension artérielle.

1.3.1.1 Le cœur

Tout d'abord, le centre cardiovasculaire situé dans le bulbe rachidien est la partie du cerveau qui reçoit les influx nerveux des divers récepteurs sensoriels et des centres nerveux supérieurs comme les barorécepteurs et le cortex cérébral respectivement. Ce centre fait intervenir les parties sympathiques et parasympathiques du système nerveux autonome. Dans le cœur, plusieurs facteurs vont intervenir afin de rétablir une tension artérielle normale. Tout d'abord, la pré-charge qui est un facteur modulant le degré d'étirement du cœur pendant la contraction. Un autre facteur concerne la contractilité du cœur ou la force de contraction de chaque fibre musculaire du ventricule. Enfin, il y a la post-charge définie comme la pression qui doit être dépassée pour que le sang soit éjecté du cœur. Ainsi, une plus grande pré-charge augmente la force de contraction du ventricule. [1] Selon la loi de Starling, la force de la contraction du muscle cardiaque est déterminée par la longueur des fibres musculaires cardiaques avant la contraction à l'intérieur des limites physiologiques. Ainsi, plus le cœur se remplit de sang à la diastole, plus les fibres seront fortement étirées par l'arrivée de sang et plus la contraction sera grande à la systole. [1]

La fréquence cardiaque ainsi que la force de contraction peuvent être régulées par le système nerveux sympathique. Les nerfs cardiaques innervent le nœud sinusal, le nœud auriculo-ventriculaire et la majeure partie du myocarde. (Voir Figure 1. Anatomie du cœur) Ces influx stimulent la relâche de la noradrénaline qui se lie aux récepteurs bêta adrénergiques (Voir section 1.3.1.2.2.1.2 Les récepteurs adrénergiques) des fibres musculaires cardiaques. Cette liaison engendre une augmentation de la fréquence cardiaque ainsi que de la contractilité du cœur. Les influx nerveux parasympathiques atteignent le cœur par les nerfs vagues droit et gauche dont les fibres nerveuses innervent le nœud sinusal, le nœud auriculo-ventriculaire et le myocarde auriculaire. [1] (Voir Figure 1. Anatomie du cœur) Ces nerfs libèrent l'acétylcholine qui réduit la fréquence cardiaque.

Le cœur contient des propriocepteurs, des récepteurs qui surveillent la position des membres, qui permettent d'ajuster la fréquence ainsi que la force de contraction cardiaque durant l'exercice physique. De plus, le cœur peut également subir les effets d'hormones et

d'ions. Par exemple, l'adrénaline et la noradrénaline produite par les glandes médullosurrénales augmentent la fréquence et la contractilité du cœur. Finalement, le sodium (Na^+) et le potassium (K^+) sont essentiels à la production du potentiel d'action. Cependant, des concentrations élevées en potassium ou en sodium diminuent la fréquence cardiaque, la contractilité du cœur et compromettent le déclenchement des potentiels d'action. [1]

1.3.1.2 Les vaisseaux sanguins

La tension artérielle peut également être régulée par les vaisseaux sanguins. Le tonus vasculaire est défini comme l'état de contraction qui établit la résistance périphérique au repos au niveau des artérioles. [1] La paroi vasculaire contient des chimiorécepteurs, qui surveillent les modifications chimiques dans le sang, et des barorécepteurs, qui surveillent les changements de pression sanguine.

1.3.1.2.1 Régulation par un changement de la pression sanguine

Les barorécepteurs sont les sentinelles qui détectent les changements de pression du sang. Les barorécepteurs se trouvent dans la paroi de certaines artères et veines. Les principales zones où se retrouvent les barorécepteurs sont dans le sinus carotidien et l'arche aortique. Le sinus carotidien est une petite dilatation des artères carotides internes droite et gauche situées sous leur jonction avec la carotide commune. Lorsque la pression sanguine augmente, les parois des carotides s'étirent et stimulent les barorécepteurs. Les barorécepteurs de l'aorte régissent la pression artérielle systémique et sont situés dans la paroi de l'aorte ascendante et de l'arche aortique. [1] Les barorécepteurs de l'arche aortique et des artères carotides détectent les changements de pression et relaient des influx nerveux au centre cardiovasculaire. Ces récepteurs transmettent continuellement des influx aux CML de la paroi vasculaire par l'intermédiaire de fibres nerveuses sympathiques appelées nerfs vasomoteurs présents dans l'adventice des vaisseaux. La régulation autonome du diamètre des vaisseaux est

principalement assurée par la partie sympathique du système nerveux autonome. [1] Ainsi, si la pression sanguine diminue, la stimulation sympathique du cœur augmente et il y a sécrétion d'adrénaline et de noradrénaline par la glande médullosurrénale. Cette activation augmente la fréquence cardiaque et la force de contraction, en plus de favoriser la vasoconstriction. À mesure que le cœur bat plus vite, la résistance périphérique augmente de même que la tension artérielle pour atteindre une valeur normale. [1] Au contraire, si la pression augmente, le centre cardiovasculaire réagit en augmentant la stimulation parasympathique ce qui diminue la fréquence cardiaque ainsi que la force de contraction menant à la diminution du débit cardiaque. Le centre cardiovasculaire diminue la vitesse des influx sympathiques, qui normalement stimulent la vasoconstriction, ce qui réduit la résistance périphérique. La réduction du débit cardiaque et de la résistance périphérique induit donc la diminution de la tension artérielle systémique. [1]

1.3.1.2.2 Régulation hormonale de la pression sanguine

Les chimiorécepteurs surveillent la composition chimique du sang et sont situés près des barorécepteurs du sinus carotidien et de l'arche aortique. Ils détectent la variation d'oxygène, de CO₂, d'ions H⁺ ainsi que de certaines hormones qui ont une influence sur la pression artérielle. [1]

1.3.1.2.2.1 Le système rénine-angiotensine-aldostérone

Lorsque le volume sanguin diminue ou lorsque le débit sanguin vers les reins est réduit, les cellules juxtaglomérulaires des reins libèrent une plus grande quantité de rénine et de ce fait, engendre une plus grande production d'ang II. L'ang II élève la pression sanguine de deux façons. Tout d'abord, elle accroît la résistance périphérique par une augmentation de la vasoconstriction. Puis, elle augmente la pression sanguine par la stimulation de la sécrétion d'aldostérone, une hormone qui favorise la réabsorption du sodium et de l'eau. Cela augmente

le volume sanguin total et augmente la pression artérielle. [1] (Voir section 1.3.1.2.2.1 Le système rénine-angiotensine-aldostérone)

1.3.1.2.2.2 L'adrénaline et la noradrénaline

L'adrénaline et la noradrénaline sont deux hormones produites par les glandes médullosurrénales. Elles augmentent le débit sanguin en augmentant la fréquence et la force de la contraction cardiaque. [1] Elles stimulent également la vasoconstriction des artérioles et des veines de la peau et des viscères abdominales. L'adrénaline cause la vasodilatation des artérioles du muscle cardiaque et squelettique. La noradrénaline entraîne une vasoconstriction et une vasodilatation des CML à faible dose et à forte dose respectivement. [273] Elles exercent leurs actions en se liant à leurs récepteurs nommés les récepteurs adrénergiques. [1]

1.3.1.2.2.2.1 Les récepteurs adrénergiques

Les récepteurs adrénergiques sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G stimulante ou inhibitrice. Deux types de récepteurs adrénergiques ont été identifiés et appelés alpha (α) et bêta (β) selon leur affinité pour l'adrénaline et la noradrénaline. Les récepteurs α et β sont également divisés en plusieurs classes dont α_1 et α_2 ainsi que β_1 , β_2 et β_3 . Leurs distributions dépendent des lits vasculaires et des espèces animales étudiées. [273] Toutefois, les récepteurs adrénergiques α et β coexistent dans les vaisseaux, le cœur et les reins.

1.3.1.2.2.2.1.1 Les récepteurs adrénergiques alpha

L'activation des voies propres aux récepteurs adrénergiques α_1 - (activation d'une protéine Gq et activation de la voie du phosphatidyl inositol) et α_2 (activation d'une protéine

Gi inhibitrice et inhibition de la voie de l'adénylate cyclase) est entièrement différente, mais se termine dans les deux cas par l'augmentation du calcium intracellulaire et par une constriction du muscle lisse. [273] (Voir Figure 9. les récepteurs adrénériques.) La vasoconstriction est surtout médiée par les récepteurs α_1 au niveau des artères et des récepteurs α_2 au niveau des veines. Les récepteurs adrénériques α_1 et α_2 sont présents au niveau des cardiomyocytes chez l'humain où leur stimulation augmente la force de contraction du cœur. [274] Enfin, au niveau du rein, l'activation des récepteurs adrénériques mène à l'augmentation de la sécrétion de la rénine. [275]

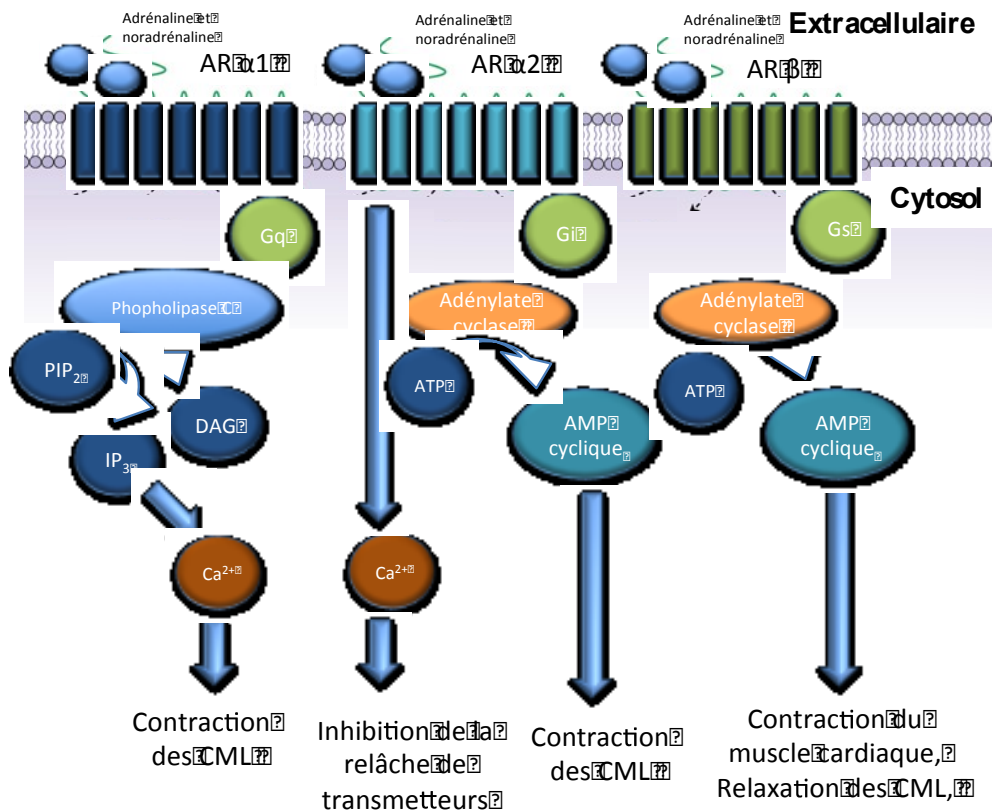


Figure 11. Les récepteurs adrénériques. Les récepteurs adrénériques (AR) alpha (α) et bêta (β). La stimulation des récepteurs adrénériques α_1 et α_2 par l'adrénaline ou le noradrénaline mène à une contraction des CML par des processus différents. Les récepteurs adrénériques α_1 sont couplés à une protéine Gq qui active la voie du phosphatidyl inositol alors que les récepteurs adrénériques α_2 sont couplés à une protéine Gi qui inhibe la voie de l'adénylate cyclase pour induire une contraction des CML. Les récepteurs adrénériques β sont couplés à une protéine Gs qui active la voie de l'adénylate cyclase qui mène à une relaxation des CML. (Adaptée de [276])

1.3.1.2.2.1.2 Les récepteurs adrénérgiques bêta

L'activation des récepteurs adrénérgiques β permet la formation d'AMP cyclique suite à l'activation de l'adénylate cyclase. Trois sous-classes de récepteurs adrénérgiques ont été identifiées soit β_1 , β_2 et β_3 . (Voir Figure 9 les récepteurs adrénérgiques.) Les récepteurs β_1 sont principalement retrouvés au niveau cardiaque alors que les récepteurs β_2 sont prédominants au niveau vasculaire. [277]

Bien que les deux sous-types de récepteurs adrénérgiques β_1 et β_2 coexistent physiologiquement au niveau du myocarde, l'analyse de ces récepteurs montre qu'il y a environ de 14 à 40 % et de 20 à 55 % de récepteurs adrénérgiques β_2 au niveau du ventricule et du tissu auriculaire respectivement. [278] D'ailleurs, une stimulation des récepteurs adrénérgiques β_1 accélère la relaxation cardiaque et augmente la sécrétion de rénine par l'appareil juxta-glomérulaire du rein. La stimulation des récepteurs adrénérgiques β_2 entraîne, quant à elle, une stimulation cardiaque de moindre intensité. [279]

Au niveau vasculaire, des récepteurs adrénérgiques β_1 contribue à la vasodilatation et sont présents au niveau des coronaires [280] et des artères cérébrales [281] Toutefois, dans les vaisseaux sanguins ce sont généralement les récepteurs adrénérgiques β_2 qui dominent et leur stimulation entraîne une vasodilatation par la relaxation des CML augmentant la perfusion cardiaque ainsi que la fréquence du cœur. [280, 282]

Les récepteurs adrénérgiques β_3 sont également présents dans les CML de l'utérus, de la vessie et des vaisseaux sanguins. Leur stimulation influence la vasodilatation des vaisseaux périphériques, mais leur rôle précis demeure indéterminé. [283]

1.3.1.2.2.3 L'hormone antidiurétique

L'hormone antidiurétique est produite par l'hypothalamus et libérée par la neurohypophyse. Elle cause une vasoconstriction et est aussi appelée vasopressine. [1] Elle permet une régulation osmotique du sang et contrôle l'excrétion d'eau dans l'urine. [284] Elle

est régulée à la fois par la pression osmotique dans les vaisseaux et par le système nerveux suite à une stimulation des récepteurs adrénergiques. [275]

1.3.1.2.2.4 Le peptide natriurétique auriculaire

Le peptide natriurétique auriculaire (ANP) est libéré par les cellules des oreillettes du cœur pour abaisser la pression artérielle par vasodilatation et favoriser l'excrétion de sodium dans l'urine, ce qui réduit le volume sanguin. [1]

1.3.1.2.3 La régulation locale de la pression sanguine

Les vaisseaux sanguins sont également capables d'autorégulation locale de la vasoconstriction et la vasodilatation. Suite à un changement physique comme un changement de la température ou par l'intervention de médiateurs chimiques, les vaisseaux régulent le tonus vasculaire. Les globules blancs, les plaquettes, les macrophages, les CML et les CE sécrètent une variété de facteurs vasoactifs : les EDRF et EDCF qui modifient le diamètre des vaisseaux. [44, 48] (Voir section 1.1.4.1.1 Fonction endothéliale)

1.3.2 Système rénine - angiotensine - aldostérone

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) joue un rôle majeur dans la physiopathologie du système cardiovasculaire, tant du point de vue de la régulation de la pression artérielle que du remodelage vasculaire, cardiaque et néphrologique. Ce système endocrine peut également a des fonctions paracrines et autocrines locales dans les tissus et les organes, par exemple, dans le tissu adipeux. [237] (Voir section 1.2.5 Le développement de l'hypertension en situation diabétique)

1.3.2.1 Les composants du système rénine-angiotensine-aldostérone

1.3.2.1.1 L'angiotensinogène

L'angiotensinogène est une protéine et une hormone précurseur de l'angiotensine. Elle est synthétisée par les cellules du foie, les hépatocytes, puis est sécrétée dans la circulation. [285] Elle est par la suite clivée par la rénine en angiotensine I (ang I) (Voir Figure 12. Le système rénine-angiotensine) La production d'angiotensinogène est stimulée par l'angiotensine II, mais également par les glucocorticoïdes, les œstrogènes et les hormones thyroïdiennes. [286]

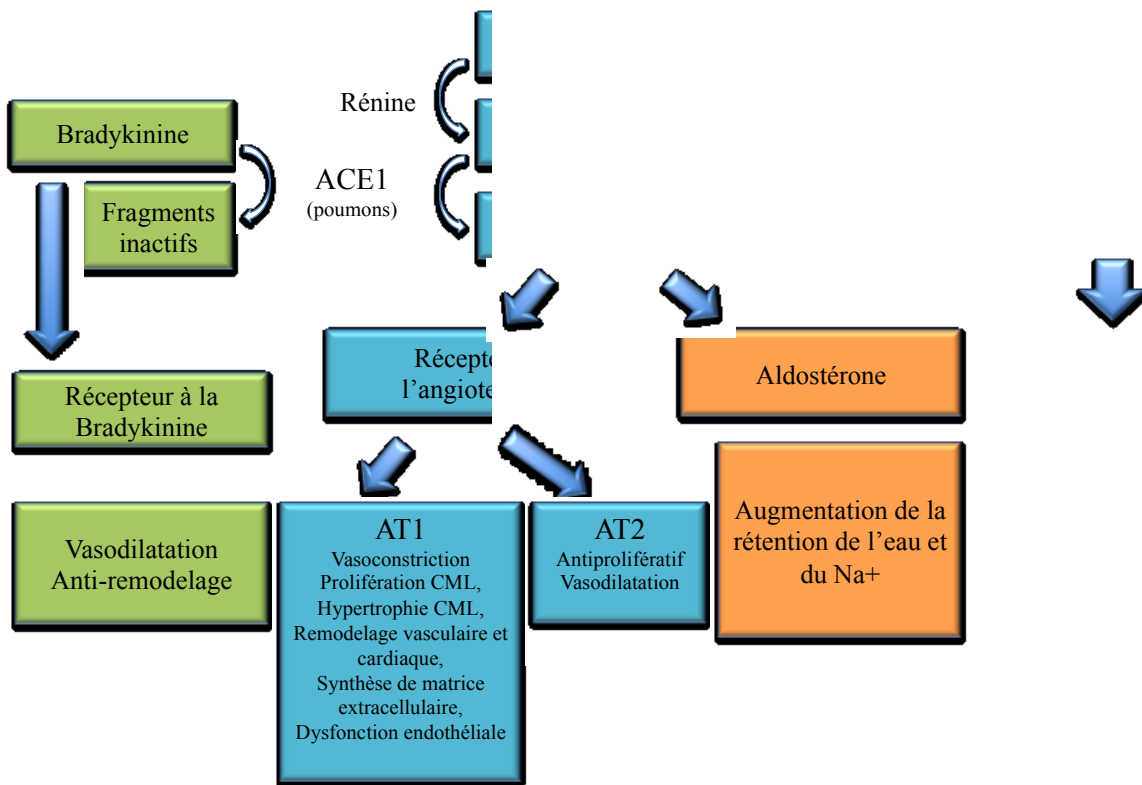


Figure 12. Le système rénine-angiotensine- aldostérone. L'angiotensinogène sécrétée par le foie et est clivée en angiotensine I par la rénine, produite par les reins. L'angiotensine I est convertie en angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine-1 (ACE). L'angiotensine II se fixe au récepteur à l'angiotensine I et II (AT1 et AT2) et exerce de

multiples effets sur les cellules vasculaires et le cœur. L'enzyme de conversion de l'angiotensine II produit deux fragments nommés angiotensine (1 - 7) et angiotensine (1 -9) qui exercent des effets positifs sur la vasculaire. L'enzyme de conversion de l'angiotensine-1 clive également la bradykinine en fragments inactifs qui est alors incapable d'induire une vasodilatation des CML. (Adaptée de [287])

1.3.2.1.2 La rénine

La rénine est synthétisée par le rein plus précisément par les cellules myoépithéliales de l'artériole afférente du glomérule rénal sous la forme de pré-pro-rénine. (Révisé dans [288]) La pré-pro-rénine est par la suite glycosylée (ajout d'un groupement glucide) par une protéase pour former la pro-rénine qui sera sécrétée dans le sang. [289] La pro-rénine est par la suite transformée en rénine pour être stockée dans des grains de sécrétion à l'intérieur des cellules myoépithéliales. La rénine active est alors sécrétée dans la circulation sanguine et diffusée dans les tissus, notamment dans la paroi artérielle, le rein et le cœur. [290] D'ailleurs, un taux élevé d'ARN messager correspondant au récepteur de la rénine est présent dans le cœur et a été détecté dans l'espace sous-endothélial des artères coronaires et rénales. [291] La sécrétion de rénine est augmentée suite à la baisse de la pression sanguine dans l'artère rénale, la stimulation des récepteurs *bêta* adrénergiques des cellules juxtaglomérulaires et la baisse de la concentration de sodium sanguin qui est détectée dans le tube contourné distal du rein. La rénine est une enzyme qui coupe l'angiotensinogène en ang I.

1.3.2.1.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE pour *angiotensin converting enzyme*) est une enzyme de la classe des carboxypeptidases qui est produite au niveau des poumons. [292] Elle clive l'ang I en ang II en hydrolysant les deux derniers acides aminés de l'extrémité carboxy-terminale du peptide. [293] L'ACE peut également interagir avec d'autres molécules, entre autre la bradykinine dont elle diminue la production. [292] (Voir Figure 12. Le système rénine-angiotensine- aldosterone)

Une autre isoforme de ACE a été découverte et nommée ACE2. Elle partage approximativement 42 % d'homologie avec la première ACE identifiée et est fortement exprimée dans le cœur, les vaisseaux et les reins. [294] [295] ACE2 possède également une activité carboxypeptidase en coupant les résidus carboxy-terminaux de ang I et ang II et produit l'angiotensine 1-9 (ang-1-9) et l'angiotensine 1-7 (ang-1-7) respectivement. [295, 296] (Voir la section 1.3.2.1.4 L'angiotensine)

1.3.2.1.4 L'angiotensine

L'ang II est synthétisée à partir de l'ang I par l'enzyme ACE 1. L'ang II présente une affinité pour deux récepteurs nommés récepteur à l'angiotensine 1 et 2 (AT1 et AT2). L'utilisation d'antagonistes spécifiques pour AT1 et AT2 dans les pathologies cardiovasculaires ont démontré que la plupart des effets de l'Ang II seraient liés au récepteur AT-1. (Révisé dans [297]) En effet, l'ang II est un vasoconstricteur puissant qui mène à l'augmentation de la production d'ET-1. [298] Une augmentation de la pression sanguine induit le remodelage de la paroi vasculaire par la prolifération des CML et une production de collagène. [298] Or, l'ang II induit la dysfonction endothéliale par une perturbation de la balance de NO et une augmentation du stress oxydatif. [298] L'ang II accélère également le développement des plaques d'athéroscléroses par la stimulation de production de cytokines inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion et l'adhésion des monocytes. [299] L'activation de cette enzyme augmente donc les risques de thrombose et d'agrégation plaquettaire par l'augmentation de la production de PAI-1. [300] Celle-ci est également responsable du remodelage cardiaque en induisant l'hypertrophie des cardiomyocytes ainsi que de l'apparition de la fibrose. Enfin, l'ang II active le système nerveux sympathique et augmente la relâche de la norépinephrine ainsi que de la vasopressine. (Révisé dans [301, 302]) [297]

D'autres formes d'angiotensine soit l'ang 1-7 et l'ang 1-9 ont également des affinités pour les récepteurs AT1 et AT2 mais davantage pour AT2. [303] [304] Au départ, ces formes d'angiotensine étaient considérées comme étant inactives, contribuant seulement à

contrebalancer les effets de l'ang II par compétition pour le site actif de ACE1. [305] Des études *in vitro* ont démontré que l'ang 1-7 inhibe la prolifération cellulaire et la production de collagène par les fibroblastes cardiaques de rats adultes et néonataux. [306, 307] Ainsi, l'ang 1-7 a des effets positifs sur le système cardiovasculaire en réduisant la prolifération et la migration des CML. [308] L'ang 1-7 réduit également la formation de la néointima après une blessure vasculaire par ballon [309], après l'implantation d'une endoprothèse chez le rat ou après une angioplastie. [310] Cette isoforme est aussi associée à une diminution de la taille de plaques athérosclérotiques dans un modèle murin ApoE ^{-/-}. [311] En effet, l'ang 1-7 est impliquée dans l'amélioration de la fonction vasculaire par l'augmentation de la relâche de NO. [312] Enfin, l'ang 1-7 a un rôle antithrombotique par son action inhibitrice sur l'agrégation plaquettaire. [313]

L'ang 1-9 exerce également des effets positifs sur le système cardiovasculaire. Au niveau de l'aorte, l'augmentation de l'activité et de l'expression de ACE2 mène à une augmentation de l'ang 1-9, ce qui réduit la pression sanguine et le remodelage vasculaire. [109]. L'ang 1-9 contribue indirectement à l'amélioration de la fonction vasculaire en stimulant la relâche de bradykinine par les CE cexc qui augmente la relâche de NO et d'acide arachidonique. [296]

1.3.2.1.4.1 Les récepteurs à l'angiotensine

Les récepteurs AT1 et AT2 sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G qui sont elles-mêmes couplées à d'autres protéines cytoplasmiques telles que l'adénylate cyclase et la phospholipase C. Les récepteurs AT1 et AT2 ont une large distribution tissulaire et semblent avoir des effets opposés. Ces effets peuvent être dus à la faible homologie (34%) que les deux récepteurs partagent. [314] Le récepteur AT1 est retrouvé en deux isoformes AT1_A et AT1_B dont l'isoforme AT1_B est le plus important dans la régulation de la pression sanguine. [315] L'expression de ces protéines dépend du type cellulaire (CML, cardiomyocytes, CE), ce qui explique les actions diversifiées que peut exercer l'ang II. [316] Les récepteurs AT1 et AT2 stimulés par ang II sont rapidement

désensibilisés et internalisés. Ainsi une stimulation aiguë d'ang II augmente les niveaux d'activation de AT1 alors qu'une exposition chronique à l'angII diminue le nombre de ses récepteurs. [317, 318] D'ailleurs, le récepteur AT1 est internalisé par endocytose dans les 10 minutes suivant son activation. [317] Approximativement 25 % des récepteurs internalisés sont recyclés à la membrane, les autres seront dégradés par les lysosomes. [317] Ainsi, l'ang II, en stimulant le récepteur AT1, augmente la pression artérielle par plusieurs mécanismes dont la vasoconstriction des artérioles, la stimulation de la rétention du sodium par la sécrétion d'aldostérone, la limitation de la perte d'eau dans l'urine suite à la stimulation de la sécrétion de vasopressine ainsi qu'à la stimulation de la sensation de soif, qui permet l'augmentation de l'ingestion d'eau contribuant à l'augmentation du volume sanguin et donc la pression artérielle. [319] [320] Les LDL [321], l'insuline [322], la progestérone [323] et l'érythropoïétine [324] augmentent l'expression des récepteurs AT1 alors que l'ang II [325], le EGF [326], le PDGF [327] et le NO [328] diminuent l'expression de ces récepteurs. La stimulation des récepteurs AT2 a des effets vasodilatateur, antiprolifératif et antidiurétique. [320]

1.3.2.1.4.2 Distribution des récepteurs à l'angiotensine

Les récepteurs à l'angiotensine sont présents dans la plupart des organes incluant le foie, les glandes surrénales, le cerveau, les reins, le cœur et les vaisseaux. [297] Le récepteur AT1 est fortement exprimé dans le foie, les reins et les surrénales, mais peu exprimé dans le cœur et les vaisseaux. L'isoforme AT1_A est retrouvé dans le foie, les reins, les poumons, les ovaires, le cœur alors que AT1_B est retrouvé majoritairement dans les glandes surrénales, les glandes pituitaires antérieures et dans l'utérus. Au niveau du cerveau, le récepteur AT1_B est exprimé dans le cervelet alors que le récepteur AT1 est exprimé dans l'hypothalamus. [319]

Le récepteur AT2 est fortement exprimé dans les tissus fœtaux incluant l'aorte, le mésenchyme gastro-intestinal, les tissus conjonctifs, les os, le cerveau et les glandes médullaires surrénales. L'expression du récepteur AT2 décroît après la naissance suggérant qu'il joue un rôle important principalement durant le développement. [329]

1.3.2.1.4.3 Signalisation

La signalisation issue de l'activation des récepteurs par ang II est complexe et permet l'activation directe ou indirecte de plusieurs voies de signalisation. La liaison de ang II à son récepteur peut activer les voies couplées à une protéine G mais peut également participer à la transactivation d'autres protéines tyrosine kinases telles que EGFR, PDGF et le récepteur à l'insuline. L'ang II peut également permettre l'activation indirecte de d'autres voies de signalisation par des récepteurs non-tyrosine kinase comme les protéines à activité kinase de la famille c-Src, et Janus (JAK). (Révision dans [297]) La stimulation du récepteur AT1 active également des protéines kinases serine/thréonine comme les PKC et les MAPKs incluant ERK1/2, p38 MAPK et c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), qui sont impliquées dans la croissance cellulaire et l'hypertrophie. [297] Jusqu'à maintenant, peu d'informations sont disponibles concernant les cascades d'activation du récepteur AT2 au niveau cardiovasculaire. Cependant, il a été démontré que la liaison de l'ang à son répéteur AT2 entraîne l'activation des voies du NO, de la phospholypase A₂ (PLA₂), de la protéine phosphatase tyrosine (PTP), de la phosphatase SHP qui mènent à l'activation de la voie de la protéine kinase qui régule les signaux extracellulaires. (ERK). [330]

1.3.2.1.5 L'aldostérone

L'aldostérone est une hormone synthétisée à partir du cholestérol principalement dans la zone glomérulée de la glande surrénale, mais également dans différents organes tels que le cœur, le cerveau et les gros vaisseaux. Dans les vaisseaux sanguins, l'aldostérone est produite par les CE et les CML. [331] La fonction principale de l'aldostérone est de maintenir l'homéostasie corporelle en sodium; donc lorsque la concentration en sel (NaCl) est forte il y a peu d'aldostérone de produit. Son récepteur est appelé le récepteur des minéralocorticoïdes et a une localisation intracellulaire. L'aldostérone joue un rôle d'hormone endocrine de régulation de l'homéostasie du sodium au niveau des reins et un rôle d'hormone autocrine

responsable d'une grande part des effets néfastes sur le myocarde au niveau du cœur. [332] Ainsi, l'aldostérone participe aux processus inflammatoires vasculaires, au remodelage ventriculaire, à la fibrose myocardique et périvasculaire, à l'activation du système sympathique, à l'inhibition du système parasympathique et au dysfonctionnement des baroréflexes. Cette hormone agirait également sur le stress oxydatif, sur la dysfonction endothéliale, et sur l'activation des métalloprotéases. L'inhibition de l'aldostérone serait responsable d'une grande part des effets bénéfiques observés dans les essais cliniques chez les patients ayant subi un infarctus [333] et souffrant d'insuffisance cardiaque. [334]

En effet, un taux élevé d'aldostérone résulte en une dysfonction endothéliale, une vasculopathie, un remodelage vasculaire et ventriculaire ainsi que des dommages rénaux. La vasculopathie induite par l'aldostérone est caractérisée par une réduction de la synthèse et de la disponibilité du NO par les CE [335] ainsi que par la production d'anions superoxydes qui dégradent le NO. L'aldostérone induit également la promotion de la vasoconstriction des CML par des effets non-génomiques rapides. [336]

1.3.3 Conséquences de l'hypertension sur le système cardiovasculaire

L'hypertension induit des effets néfastes tant au niveau du cœur qu'au niveau des vaisseaux. Elle mène à une hypertrophie cellulaire et à une augmentation de la fibrose cardiaque et vasculaire. Ces changements morphologiques entraînent de l'insuffisance cardiaque ainsi qu'une dysfonction vasculaire importante.

1.3.3.1 Le remodelage cardiaque

Comme mentionné dans la section 1.1.6 Le remodelage cardiaque, l'hypertension entraîne un remodelage de la paroi ventriculaire afin de compenser les changements

hémodynamique qui surviennent. La surcharge de pression sanguine chronique, secondaire à l'hypertension, induit la synthèse *de novo* ainsi que l'alignement parallèle des sarcomères menant à une hypertrophie concentrique. Cette hypertrophie est caractérisée par l'épaississement important de la paroi ventriculaire ainsi qu'une réduction du rayon de chambre du ventricule. (Voir figure 10. Le remodelage cardiaque) En situation d'hypertension, le remodelage du tissu cardiaque est également caractérisé par un dépôt accru de protéine de la matrice extracellulaire dont le collagène (voir section 1.1.6.3 Fibrose ventriculaire) La fibrose observée en réponse à l'hypertension est une fibrose réactive et est un processus distinct au point de vue morphologique de celui qui survient lors du remplacement des myocytes morts par nécrose. [147]

1.3.3.2 Le remodelage vasculaire

L'hypertension induit également un remodelage important des vaisseaux sanguins avec l'implication des CE et des CML. Ce remodelage vasculaire, caractérisé par l'épaississement de la média ainsi que par la dysfonction endothéliale, se développe en présence de pression sanguine élevée de façon chronique. Les vaisseaux subissent d'importantes altérations structurelles et fonctionnelles menant progressivement à une incapacité à se distendre ou à se contracter.

1.3.3.2.1 L'hypertension sur les cellules endothéliales

La dysfonction endothéliale induite par l'hypertension est grandement médiée par l'ang II. Dans les CE, l'ang II régule la production de NO par l'activité de la eNOS. [70] L'ang II augmente également le stress oxydatif qui affecte la relaxation ainsi que la fonction des CE. [337] En effet, les ROS induisent l'apoptose, augmentent l'état thrombotique [338], en plus d'induirent l'expression des molécules d'adhésion. [339] L'ang II active aussi le facteur de transcription NF- κ B, qui induit la production de molécules d'adhésion comme VCAM-1,

ICAM-1, and E-selectine, les récepteurs aux LDL et les chemokines pro-inflammatoires comme le MCP-1, l'IL-6, and l'IL-8. [340, 341]

1.3.3.2.2 L'hypertension sur les cellules musculaires lisses

La fonction majeure de l'ang II est d'induire une vasoconstriction. La stimulation, *in vitro*, de CML par l'ang II conduit à une réponse hypertrophique et/ou hyperplasique. Plusieurs études *in vivo* ont montré les effets de l'ang II sur les CML. Effectivement, la perfusion d'ang II, chez des rats ayant subi une lésion vasculaire avec un ballon, entraîne une prolifération néointimale plus importante. [342] L'ang II est un facteur de croissance important qui entraîne la prolifération, la différenciation et la diminution de l'apoptose des CML. [298] Les récepteurs AT1 et AT2 sont exprimés chez les CML. [273] L'activation du récepteur AT2 a des effets antiprolifératif et pro-apoptotique sur les CML qui peuvent être contrés par l'activation du récepteur AT1. [343]

1.3.3.2.3 Remodelage eutrophique

En situation d'hypertension, la pression exercée sur la paroi du vaisseau peut mener à l'augmentation du diamètre extérieur. La lumière du vaisseau se réduit, mais l'épaisseur de la média demeure inaltérée. [121] (Voir Figure 8. Remodelage vasculaire) Le remodelage eutrophique a été observé dans les modèles animaux chez les rats hypertendus sel-DOCA [344] et chez les rats dont l'hypertension résulte d'une l'injection d'ang II. [345]

1.3.3.2.4 Remodelage hypertrophique

En situation d'hypertension, la pression exercée sur la paroi du vaisseau peut mener à l'augmentation de l'épaisseur de la média. Dans ce type de remodelage, la lumière du vaisseau est également réduite et l'épaisseur de la média augmente. (Voir Figure 8. Remodelage vasculaire) Dans les modèles animaux d'hypertension, dont les rats spontanément hypertendus, ce remodelage hypertrophique est observé. [346] De plus, ce remodelage est également développé chez les rats dont l'hypertension résulte d'une constriction de l'aorte abdominale surrénale. (Voir Annexe 1 Modèles animaux : 1.2 Constriction aortique abdominale surrénale chez le rat) Ainsi, dans ce modèle, la réduction de la lumière d'un vaisseau situé près des reins entraîne une diminution de l'apport sanguin à ces organes résultant en des changements de pression sanguine. [347] Additionnellement, la constriction de l'aorte entraîne une augmentation de la post-charge, et de ce fait, des changements hémodynamiques et morphologiques. [347]

1.3.3.2.5 Fibrose vasculaire

Dans les vaisseaux normaux, la matrice extracellulaire est composée de collagènes de type I et III, d'élastine et de protéoglycans. Ces protéines jouent un rôle dans le maintien de la structure des vaisseaux, mais également dans la résistance à la traction ainsi qu'à l'élasticité. [1] Les CML adoptent de façon prédominante un phénotype synthétique en situation d'hypertension. [129] Ce phénotype prédispose les vaisseaux à une augmentation de la déposition de matrice extracellulaire. D'ailleurs, une densité de collagène plus importante a été observée dans les artères mésentériques de rats hypertendus [130] [131] et dans les artères de résistances sous-cutanées chez des patients avec une hypertension légère. [348] Le remodelage est facilité par la production de métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMP pour *matrix metalloproteinase*) par l'action de l'ang II, qui dégradent le collagène et facilitent la migration des CML. [132] Au niveau vasculaire, les MMP incluent les collagénases qui digèrent le collagène sous forme de fibres (collagène I en collagène III), les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) qui dénaturent le collagène IV et V retrouvé dans la membrane sous-endothéliale et finalement les stromelysines (MMP-3) qui digèrent les molécules adhésives comme la laminine et la fibronectine [133], et les protéoglycans [134]. La restructuration des

protéines de la matrice extracellulaire survient tôt dans l'apparition de l'hypertension afin de s'adapter aux changements de pression exercés contre les parois des vaisseaux sanguins. Ce remodelage résulte en une paroi vasculaire plus rigide dont la compliance est grandement réduite. [135]

1.3.4 L'hypertension sur la réparation vasculaire

Les principaux médiateurs de l'hypertension dont l'ang II et l'aldostérone sont liés aux altérations des processus de réparation et de régénération vasculaire dans les modèles animaux. La réparation vasculaire est associée aux CEP. Toutefois, le nombre de CEP (CD133⁺ et CD34⁺, VEGFR-2⁺) est diminué chez les patients souffrant d'hypertension. [349] Des études ont également démontré que l'ang II accélère la sénescence des CEP par la diminution de l'activité de la télomérase, un effet qui est inhibé par un antagoniste du récepteur AT1. [350] Ainsi, l'ang II inhibe la prolifération des CEP également via l'augmentation du stress oxydatif, un effet qui est bloqué par la présence d'inhibiteurs du récepteur de l'ang II. [351] De façon similaire, il a été démontré que l'aldostérone affecte négativement les CEP *in vivo* et *in vitro*. Ces effets seraient liés à l'induction du stress oxydatif et seraient indépendants de la pression sanguine. [352]

1.4 Nestin

La protéine Nestin est une protéine de filament intermédiaire exprimée par plusieurs types cellulaires dont les CE et les CML. [353, 354] De plus, son expression peut être modulée par les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires comme le diabète et l'hypertension. [355, 356]

1.4.1 Le cytosquelette de la cellule eucaryote

Le cytosquelette d'une cellule eucaryote est composé de trois éléments : les microfilaments, les microtubules, et les filaments intermédiaires. (Voir Table 1. Le cytosquelette des cellules eucaryotes)

Ces éléments forment une structure dynamique qui remplit le cytoplasme de la cellule. Le cytosquelette permet l'arrangement des organites et confère à la cellule la capacité de réagir à son environnement ainsi que d'accomplir des mouvements coordonnés. [1] Le cytosquelette est également impliqué dans la migration cellulaire sur une surface, la division cellulaire (ségrégation des chromosomes), la contraction musculaire et les changements morphologiques des cellules durant le développement embryonnaire. [1] La protéine Nestin fait partie des protéines de filaments intermédiaires et est impliquée dans les mécanismes de prolifération cellulaire. [357-359]

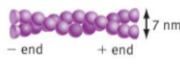

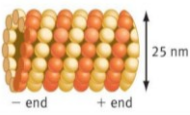



Type	Structure	Sous-unité	Fonction
Filament d'actine		Actine 	<ul style="list-style-type: none"> • Maintenir la forme cellulaire, • Mobilité par contraction ou ramper, • Cytokinèse, • Mouvement des organites,
Microtubules		Dimère de α et β tubuline 	<ul style="list-style-type: none"> • Maintenir la forme cellulaire, • Mouvement des chromosomes durant la mitose/méiose, • Dirige le transport intracellulaire,
Filaments intermédiaires		Exemple kératine 	<ul style="list-style-type: none"> • Maintenir la forme cellulaire, • Encrage du noyau et des organites,

Table 1. Le cytosquelette des cellules eucaryotes. Les trois types de filaments sont distincts par leur taille, leur structure et les protéines qui les composent. Les microfilaments sont formés suite à la polymérisation de monomères d'actine. Les microtubules sont formés suite à l'association de dimères de tubuline α et β de façon à créer une structure polarisée. Les filaments intermédiaires peuvent être formés d'une variété de protéines fibreuses qui s'assemblent selon des combinaisons précises. (Modifié de [360])

1.4.1.1 Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont composés d'une variété de protéines fibreuses qui sont exprimées dans différents types cellulaires. Jusqu'à présent, une cinquantaine de protéines de filaments intermédiaires ont été identifiées et classées en 6 catégories. [357, 361] (Voir Table 2. Les catégories de filaments intermédiaires) Les filaments intermédiaires remplissent principalement un rôle de structure cellulaire en tant que support mécanique de la membrane plasmique. D'un diamètre d'environ 10 nm, ils offrent à la cellule une résistance à la traction leur permettant de supporter les agressions mécaniques. Les filaments intermédiaires forment des structures très stables et n'ont pas de polarisation particulière. Contrairement aux microfilaments et aux microtubules, leur polymérisation ne requiert pas d'énergie (ATP). L'assemblage ainsi que le désassemblage de ces protéines sont plutôt régulés par leur état de phosphorylation. Par exemple, la phosphorylation de la protéine Nestin conduit à son désassemblage durant la mitose. [362]

<i>Catégorie</i>	<i>Protéines</i>	<i>Poids moléculaire kDa</i>	<i>Type de cellules</i>
Type I	Kératine acide	40-60	Épithélium (peau, cheveux ongles)
Type II	Kératine basique	50-70	Épithélium (peau, cheveux ongles)
Type III	Vimentine	57	Mésenchyme, fibroblastes, Leucocytes Cellules musculaires
	Desmine	53	Cellules gliales et astrocytes
	protéine acide fibrillaire gliale	50	
	Perephérine	57	Neurone périphérique et central
Type IV	Neurofilament L (Light)	67	Neurones matures
	Neurofilament M (Medium)	150	Neurones matures
	Neurofilament H (High)	200	Neurones matures
	Internexine	66	Système nerveux central en développement
Type V	Lamine A	70	Noyau de toutes les cellules
	Lamine B	67	Noyau de toutes les cellules
	Lamine C	67	Noyau de toutes les cellules
Type VI	Nestin	240	Cellules souches neuronales Myocytes

Table 2. Les catégories de filaments intermédiaires Une cinquantaine de protéines réparties en 6 catégories permettent d’avoir une diversité de filaments intermédiaires. [357, 361] (Modifié de [363, 364])

1.4.1.1.1 Assemblage des protéines des filaments intermédiaires

Les protéines composant les filaments intermédiaires sont des protéines fibreuses allongées composées d’une tête N-terminale et d’une queue C-terminale globulaire ainsi que d’un domaine central allongé en forme de bâtonnet. (Voir figure 13. Structure de protéines des filaments intermédiaires) Comme les extrémités N et C-terminales des différentes protéines de filaments intermédiaires varient, l’hypothèse initiale suggérait que ces domaines n’étaient pas impliqués dans la dimérisation de ces protéines. Des expériences de délétion par mutagenèse ont permis de déterminer que les protéines de filaments intermédiaires ayant une extrémité N-

terminale tronquée ne pouvaient plus s'assembler avec d'autres protéines. (révisé dans [365]) Exception, cependant, pour la kératine qui forme des dimères même en absence de ses domaines N et C-terminaux. [366] Actuellement, le domaine N-terminal est considéré comme un élément important dans l'assemblage de la plupart des filaments intermédiaires. Le domaine C-terminal est également nécessaire à leur assemblage et joue un rôle dans la stabilité des filaments. Ces domaines contrôlent les interactions entre les différentes protéines des filaments intermédiaires aussi bien que celles ayant lieu entre les protéines des filaments intermédiaires et les autres composants de la cellule. [363] Toutefois, il n'y a pas d'évidence que la protéine Nestin puisse interagir avec les autres composants du cytosquelette. [367]

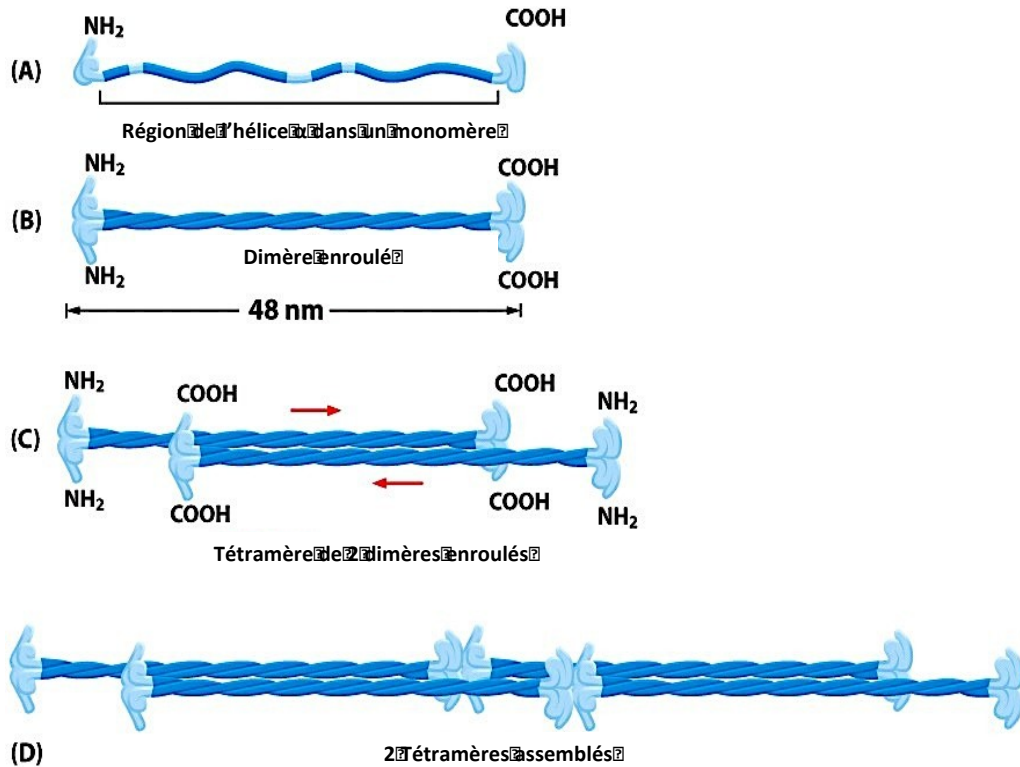


Figure 13. Structure et assemblage des protéines de filaments intermédiaires. (A) Les protéines fibreuses composant les filaments intermédiaires possèdent une tête et une queue globulaire ainsi qu'un domaine central allongé en forme de bâtonnet. (B) Les protéines forment des dimères en s'enroulant les unes aux autres. (C) Les dimères s'associent pour former des tétramères. (D) Ceux-ci s'associent ensuite par des liaisons non covalentes pour former une structure spiralée en forme de corde qui assure les fonctions de support cellulaire. (Modifié de [109])

L'assemblage des filaments intermédiaires peut se faire entre des types spécifiques de protéines de filaments intermédiaires. Par exemple, les filaments de kératine, dans l'épithélium, sont toujours des hétérodimères de protéines de type I et II. (Voir Table 2. Les catégories de filaments intermédiaires) Cependant, d'autres protéines peuvent former des hétérodimères comme la Vimentine et les Neurofilaments. [368]

La région centrale des protéines est composée d'une hélice *alpha* étendue, qui permet à des paires de filaments intermédiaires de former des dimères en s'enroulant l'un autour de l'autre. Ces dimères peuvent alors former des liaisons non covalentes avec d'autres dimères et former des tétramères. Ces tétramères s'associent ensuite par des liaisons non covalentes pour former une super structure spiralée en forme de corde. Les tétramères ainsi formés sont symétriques et ont des orientations antiparallèles. Certains filaments intermédiaires s'orientent parallèlement à la surface cellulaire alors que d'autres traversent le cytosol de la cellule. Les filaments intermédiaires forment une charpente qui intègre les autres composantes du cytosquelette, organise la structure cellulaire interne et aide à supporter la forme et l'élasticité de la cellule. [364]

1.4.1.1.2 Les filaments intermédiaires de la paroi vasculaire

Dans les CML les protéines de filaments intermédiaires sont principalement la Vimentine et la Desmine. [369] La protéine Nestin est également retrouvée dans les tissus myogéniques en développement. [370] [371] Dans les vaisseaux, la protéine Vimentine est retrouvée en plus grande proportion que la protéine Desmine. Elle est retrouvée dans les cellules d'une variété de parois vasculaires allant des artères élastiques aux petites artérioles alors que la protéine Desmine est peu ou pas détectée dans les vaisseaux de gros calibres comme l'aorte. La protéine Desmine est retrouvée principalement dans les petites artères. [372]

1.4.2 La protéine de filament intermédiaire Nestin

Identifiée en 1985, dans les cellules souches neuroépithéliales du système nerveux central en développement, la protéine Nestin a d'abord été associée à un marqueur de cellules souches neurales multipotentes. [373], [357, 374] Cette protéine de 240 KDa est un membre de la classe VI de la famille des protéines de filaments intermédiaires. [357] (Voir Table 2. Les catégories de filaments intermédiaires) La protéine Nestin, en raison de sa courte extrémité N-terminale, est incapable de s'homodimériser et forme plutôt des hétérodimères avec Desmine ou Vimentine. [375] La protéine Nestin est exprimée par la majorité des cellules progénitrices du système nerveux central et périphérique qui deviennent les neurones et les cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes, microglie).

1.4.2.1 Le gène *nestin*

Le gène *nestin*, chez le rat, contient 5945 paires de bases. Il comprend 5 exons et 4 introns. [357] Des éléments régulateurs se retrouvent dans les différents introns et contrôlent l'expression de la protéine Nestin de façon cellules/tissus spécifique. [375] De plus, ces éléments qui régulent spécifiquement l'expression des précurseurs myogéniques et neuronaux se retrouvent dans le premier et le second intron respectivement. [376] Le premier intron régule également l'expression de Nestin dans les cellules endothéliales durant l'angiogenèse. [377]

1.4.2.2 La protéine Nestin

Nestin est une grosse protéine (>1600 acides aminés), possédant une structure similaire aux autres protéines de filaments intermédiaires. Un domaine central hautement conservé composé d'une hélice α de 300-330 acides aminés situé entre les domaines N et C- terminaux. Cette partie centrale est composée de plusieurs hélices α enroulées soit les hélices 1A et 1B

séparées par un lien (L1), les hélices 1B et 2A séparées par L12, et les hélices 2A et 2B séparées par L2. [378] [365] (Voir Figure14. Structure de Nestin).

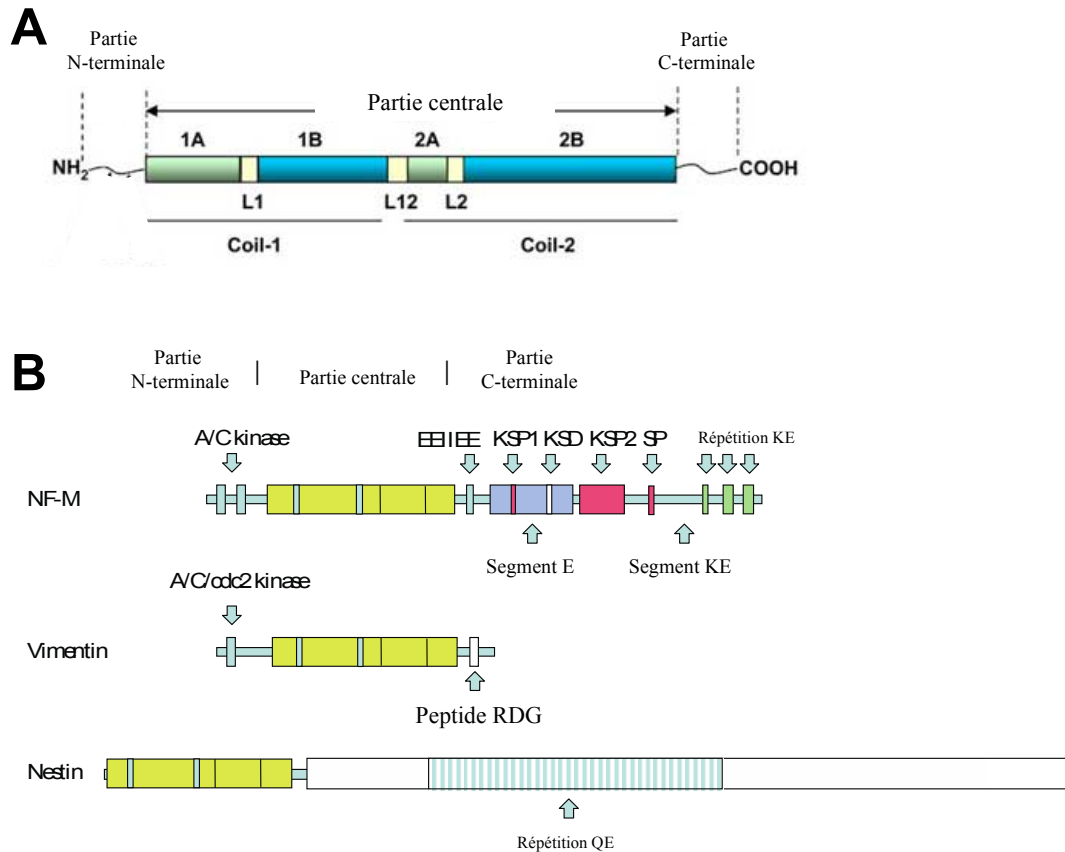


Figure 14. Structure de la protéine Nestin (A) Un domaine central hautement conservé composé d'une hélice α de 300-330 acides aminés entre les domaines N et C-terminaux. La partie centrale de la protéine est composée de plusieurs hélices α enroulées soit les hélices 1A et 1B séparées par un lien (L1), les hélices 1B et 2A séparées par L12, et les hélices 2A et 2B séparées par L2. **(B)** Comparaison de la structure de Nestin avec le Neurofilament M et la protéine Vimentine. Les sites KSP, SP et KSD sont des sites de phosphorylation dans la partie C-terminale du Neurofilament M. Les segments E, KE et QE font référence à des séquences répétées. (modifié de [379] [369])

La région C-terminale de Nestin compte 1306 acides aminés et une séquence répétée conservée contrairement à la région N-terminale qui est plus courte que les autres protéines de filaments intermédiaires. [380] La variation de l'extrémité C-terminale permet à la protéine de former des complexes avec d'autres protéines de structure. La protéine humaine Nestin est

plus courte que celle du rat et de la souris par 87 et 203 acides aminés respectivement [380] [381] La différence dans la longueur est due à une variation dans le nombre de séquences répétées. (Voir Figure 14. Structure de Nestin). La région C-terminale est conservée à 55% et la région hélicoïdale est conservée à 82% entre l'humain et les rongeurs. [380, 381]

La phosphorylation de Nestin régule son assemblage et sa désorganisation. [362] Ainsi, il a été démontré qu'un faible taux de phosphorylation est associé avec l'assemblage de Nestin durant la mitose. La protéine Nestin et sa partenaire, Vimentine, se retrouvent 3 et 6 fois plus phosphorylées respectivement durant la division cellulaire. De plus, ces états de phosphorylation coïncident avec la réorganisation des filaments intermédiaires. [362] Un site de phosphorylation important pour l'assemblage de la protéine Nestin est le résidu thréonine 316, localisé dans l'extrémité C-terminal de la protéine. D'ailleurs, il a été démontré que la phosphorylation régule l'organisation spatiale des protéines de filaments intermédiaires comme Vimentine et Nestin. [382, 383] En fait, durant la mitose, la désorganisation de Vimentine requiert sa phosphorylation et celle de Nestin. [384] Le rôle de Nestin dans la désorganisation de Vimentine a été confirmé par la réduction spécifique de l'expression de la protéine Nestin par une approche d'ARN interférant *in vitro*. Ceci a bloqué la désorganisation de Vimentine dans les cellules mitotiques et a démontré que Nestin devait être présente. [384]

1.4.2.3 La distribution de la protéine Nestin

La protéine Nestin est retrouvée dans la majorité des cellules progénitrices du système nerveux central et périphérique qui donnent les neurones et les cellules gliales. [357, 385-387] Elle a aussi été observée dans les précurseurs myogéniques du muscle squelettique et du coeur [357, 358, 388, 389], dans les cellules progénitrices de la pulpe dentaire [390], des testicules [391] et des follicules pileux de la peau. [392]. La protéine Nestin est également détectée dans plusieurs cellules souches/progénitrices non neuronales incluant le muscle squelettique, les cellules mésangiales, les cellules stellaires hépatiques, les CML et une sous-population de cellules progénitrices du pancréas. [354, 358, 371, 375, 393, 394]

1.4.2.4 L'expression de Nestin

L'expression de Nestin dans les différents tissus est transitoire. Elle est fortement exprimée durant le développement embryonnaire où elle sert de support jusqu'à son remplacement par des protéines de filaments intermédiaires tissulaires spécifiques. [395] Par exemple, Nestin est remplacée par le Neurofilament M, la protéine Gliale fibrillaire acide (GFAP pour *Glial fibrillary acidic protein*) et Desmine dans les neurones, les astrocytes et les cellules musculaires respectivement. [361] L'expression de Nestin diminue donc pendant la différenciation et la maturation cellulaire. Toutefois, elle peut être exprimée dans des tissus adultes. En effet, Nestin est réexprimée suite à un infarctus du myocarde. [396, 397] Cette réexpression de Nestin suite à une blessure ischémique peut jouer un rôle dans la régénération cellulaire ou le remodelage cardiaque. [395] Elle est également réexprimée dans les cellules du muscle squelettique, des astrocytes et les CML vasculaires suite une blessure de la moelle épinière, à une dénervation du muscle squelettique ou une blessure vasculaire respectivement. [354, 371, 386]

1.4.2.4.1 L'expression de Nestin dans les cellules endothéliales

Dans les CE, la protéine Nestin est exprimée durant l'angiogenèse et pendant le développement cardiovasculaire. [377, 398, 399] La protéine Nestin est associée avec une capacité proliférative des CE dans plusieurs mécanismes physiologiques et pathologiques. [358, 387, 400-405] Au niveau endothélial, la protéine Nestin est fortement exprimée durant le développement, mais elle n'est pas détectée dans les CE adultes de vaisseaux de gros calibres comme l'aorte ou les carotides. [354] D'ailleurs, Oikawa et al. a démontré que l'expression de Nestin était exclusive aux CML aortiques chez les rats. [354] Cependant, d'autres études ont démontré que la protéine Nestin est exprimée par les CE lors de la vascularisation des tumeurs et que son expression est une caractéristique de l'endothélium répliatif dans les capillaires même dans les tissus adultes. [353] La protéine Nestin est également ré-exprimé et retrouvée dans la néovascularisation de la cicatrice cardiaque suite à un infarctus. Dans ce dernier cas,

les CE des vaisseaux de petits calibres (0,3 à 6 mm²) exprimaient la protéine Nestin mais pas celle de vaisseaux avec un plus large diamètre. [353]

1.4.2.4.2 L'expression de Nestin dans les cellules musculaires

Les différentes études sur l'expression de Nestin dans les vaisseaux mettent en évidence l'absence de son expression par les cellules des vaisseaux de gros calibres, et, ce dans les modèles animaux adultes. [353, 354, 399, 406-410] Son expression, présente au cours du développement, est régulée à la baisse et la protéine est progressivement remplacée par la protéine Desmine dans les cellules musculaires. [369] Toutefois, une blessure vasculaire peut induire sa réexpression. Par exemple, lors d'une angioplastie, la protéine Nestin est exprimée au niveau de la néointima. [354] D'ailleurs, cette même étude conclue que l'expression de la protéine Nestin est exclusive aux CML aortique puisqu'elle ne colocalise pas avec des marqueurs endothéliaux. [354]

1.4.2.5 Régulation de l'expression de Nestin

L'expression de Nestin dans les CML est augmentée par la voie signalétique du facteur de croissance épidermique (EGF pour *epidermal growth factor*). Des études réalisées avec des CML *in vitro* ont permis d'établir qu'une stimulation au EGF permettait la réexpression de Nestin suite à une privation de sérum. Cet effet est aboli par l'ajout d'un anticorps neutralisant le EGF. [411] De plus, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de ce récepteur a également permis de déterminer l'action spécifique du récepteur à l'EGF dans l'expression de Nestin. Le récepteur à l'EGF étant un récepteur tyrosine kinase, l'EGF stimule la prolifération cellulaire par les voies PLC- γ /PCK, PI3K/AKT et Ras/Raf. D'ailleurs, une stimulation cellulaire au EGF augmente l'expression de Nestin via l'activation de la voie Ras/Raf. (Voir Figure 15. Régulation de l'expression de Nestin par le EGF et son récepteur)

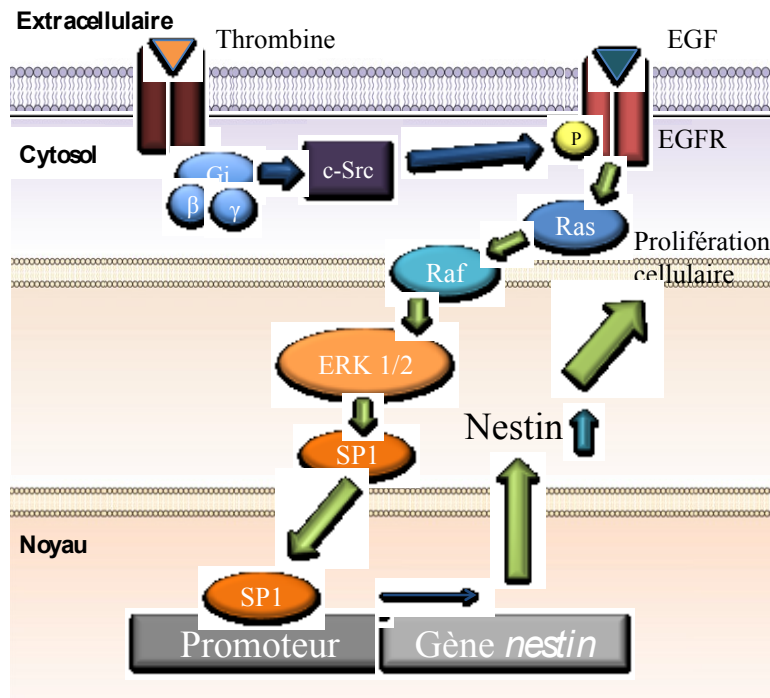


Figure 15. Régulation de l'expression de Nestin par le EGF et son récepteur. L'activation du récepteur EGF par le EGF ou sa transactivation via l'activation d'un récepteur couplé à une protéine G mène à l'activation de la voie Ras/Raf/ERK1/2 et à l'augmentation de l'expression de la protéine Nestin. (Adaptée de [411])

Toutefois, il a été démontré que le récepteur EGF pouvait aussi être activé via l'activation des récepteurs couplés aux protéines G. D'ailleurs, une stimulation à la thrombine a permis d'activer la voie EGF et à d'augmenter l'expression de Nestin dans les CML *in vitro*. [411] (Voir Figure 15. Régulation de l'expression de Nestin par le EGF et son récepteur) Bien que ces mécanismes aient été identifiés dans les CML, la régulation de Nestin dans les tissus *in vivo* demeure encore mal comprise.

De plus, une étude récente a permis de déterminer que la région 3'UTR du gène Nestin est reconnue par MIR-125b, un microARNs (MIR). Ils sont de petits ARNs non codants de 22 nucléotides qui jouent un rôle dans la régulation posttranscriptionnel de l'expression génique par une répression de la traduction ou un clivage du transcrit. [412] La surexpression de MIR-125b dans les cellules progénitrices/ souches neuronales régule à la baisse l'expression de

Nestin. [413]. Une étude de notre laboratoire a démontré une régulation réciproque de MIR-125 et de Nestin *in vivo* dans les poumons de rat néonataux et adultes. Au cours du développement, l'expression de Nestin diminue alors que celle du MIR-125 augmente. De plus, la réexpression de Nestin dans les tissus pulmonaires est accompagnée d'une diminution de MIR-125 dans un modèle d'induction d'un infarctus du myocarde chez le rat. [355] Malheureusement, il n'y a pas d'évidence présentement que MIR-125 pourrait réguler l'expression de Nestin dans les CML des vaisseaux sanguins.

1.4.2.6 Les fonctions cellulaires de Nestin

Bien que la protéine Nestin soit reconnue comme un marqueur de cellules souches, peu d'informations existent sur la fonction cellulaire qu'elle occupe. Des études ont démontré que cette protéine jouerait un rôle dans la protection contre le stress oxydatif, dans la prolifération et la différenciation cellulaire, dans les mécanismes d'angiogenèse et dans la réparation tissulaire. Toutefois, le rôle de la protéine Nestin dans les cellules vasculaires demeure, pour l'instant, mal connu.

1.4.2.5.1 Rôle dans la protection contre le stress oxydatif et la survie cellulaire

La protéine Nestin pourrait jouer un rôle de protection et de survie dans les cellules progénitrices/souches neuronales contre le stress oxydatif. Une étude *in vitro* a rapporté que suite à une stimulation avec du peroxyde d'hydrogène, la perte de la protéine Nestin précède l'initiation de l'apoptose dans les précurseurs neuronaux. Cette étude a également révélé que la protéine Nestin est une protéine d'échafaudage dans la signalisation du complexe CDK5. Elle peut médier la survie cellulaire durant un stress oxydatif en régulant l'activité et la localisation du complexe CDK5/p35 dans la cellule. [414]

De plus, l'hyperglycémie est responsable de l'apoptose des podocytes par un mécanisme également dépendant de CDK5. En effet, une étude a démontré qu'une diminution

de CDK5 permet d'augmenter l'expression de Nestin et de réduire l'apoptose des podocytes induits par l'hyperglycémie. Cette étude suggère que la protéine Nestin joue un rôle dans la survie cellulaire en situation hyperglycémique dans les podocytes. [415]

1.4.2.6.2 Rôle dans la régulation de la différenciation cellulaire

La progression du cycle cellulaire menant à la prolifération des cellules est dépendante de l'interaction entre les CDK, les protéines kinases et d'une diversité de protéines régulatrices. [363] Récemment, l'implication des CDK dans les processus de prolifération et de différenciation a été établie. [416] Durant l'embryogenèse, CDK5 est un facteur crucial de signalisation. [417] En effet, une déficience en CDK5 altère la migration neuronale durant le développement cortical [418] et inhibe la myogenèse. [419] [420] Lors de la différenciation des myoblastes, l'activité de CDK5 est régulée par la protéine kinase C atypique *zêta* (ζ). Celle-ci phosphoryle la protéine p35, l'activateur de Cdk5, ainsi que la calpaine. (Voir Figure 16. Rôle régulateur de Nestin dans le cycle cellulaire des myocytes.) Ces événements régulent conjointement le clivage de p35 en p25, une protéine activatrice. Les facteurs cellulaires p25 et p35 peuvent alors former un complexe actif avec CDK5 qui est impliqué dans la différenciation myogénique. [421] La protéine Nestin sert de protéine d'échafaudage du complexe CDK5/p35/p25 en régulant elle aussi le clivage partiel de p35 en p25. Une quantité suffisante de ce complexe CDK5/p25 s'avère essentielle au processus de différenciation des myoblastes. La CDK5 régule à son tour la réorganisation de Nestin durant la fusion des myoblastes. [414] Il phosphoryle la protéine Nestin sur la thréonine 316 et permet sa réorganisation, [370] créant ainsi une boucle de rétrocontrôle sur la production de p25 et sur la myogenèse. [422]

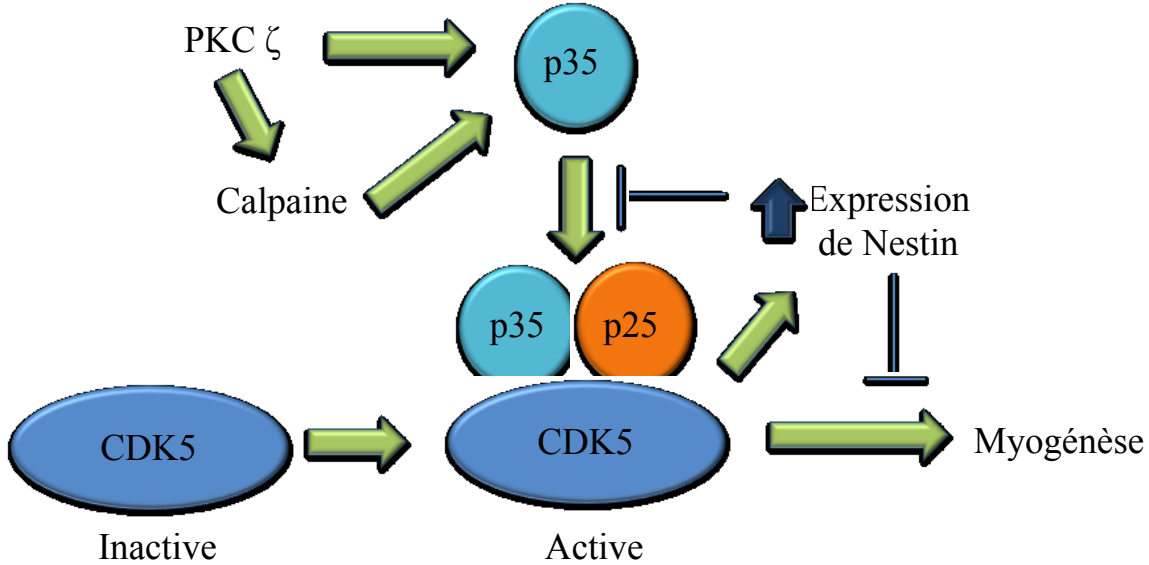


Figure 16. Rôle régulateur de Nestin dans le cycle cellulaire des myocytes. Nestin permet le clivage de p35 en p25. Le complexe p35/p25/CDK5 est alors activé et la différenciation des myoblastes est amorcée. À son tour, CDK5 régule l'assemblage de Nestin lors de la fusion des myoblastes. (Modifiée de [422])

La protéine Nestin est un marqueur de cellules souches neuronales et joue également un rôle dans la différenciation et la division des cellules neuronales durant le développement de celles-ci. [395]

1.4.2.6.3 Rôle dans l'angiogénèse

Au cours du développement, les cellules souches de la crête neurale cardiaque migrent et participent à la formation de l'aorte et de l'artère pulmonaire. [8, 423] Il a été rapporté que ces cellules ont un potentiel de différenciation en CE et CML lorsqu'elles sont soumises à certaines conditions. En effet, la protéine Nestin est détectée dans les CE des capillaires (vaisseaux de petits calibres) formés *de novo* lors de la cicatrisation cardiaque. [397] Les cellules Nestin⁺ participent également à la vascularisation réparatrice du myocarde qui

survient suite à un infarctus. [407] La transplantation de cellules résidentes, exprimant Nestin⁺ dans les cœurs normaux et infarciés, a révélé qu'une sous-population de cellules avait la capacité de se différencier en CML et/ou en CE menant à la formation *de novo* de vaisseaux sanguins. [406, 424] De plus, une sous-population de cellules Nestin⁺ dérivée de la peau a démontré un potentiel de différenciation en cellules vasculaires et a contribué directement à l'angiogenèse. [425]

Nestin est également exprimée durant la vascularisation d'une tumeur. Nestin a été détectée dans les mélanomes [426], les neuroblastomes [427, 428], les angiosarcomes [428] et les glioblastomes [429]. Les niveaux d'expression de la protéine augmentent également avec la sévérité des cancers suggérant que l'expression de Nestin peut être utilisée dans l'établissement d'un diagnostic ainsi qu'un pronostic de cancers. [430].

1.4.2.6.4 Rôle dans régénération tissulaire cardiaque

Notre laboratoire a permis d'établir que la protéine Nestin est exprimée dans les fibroblastes ventriculaires de rats néonataux et que son expression diminue progressivement au cours de la croissance postnatale du cœur. [431] Réprimée pendant le développement du cœur, cette protéine est réexprimée dans une sous-population de myofibroblastes cardiaques suite à un infarctus du myocarde. Cette réexpression peut représenter une réponse adaptative du tissu cardiaque pour augmenter la prolifération des myofibroblastes et accélérer le processus de guérison du tissu. [431] D'autres études de notre laboratoire ont permis de déterminer que les cœurs normaux de rats et de souris contiennent des cellules Nestin⁺ intercalées parmi les myocytes cardiaques (Nestin⁻). [396, 397, 406]

Nous avons également isolé les cellules Nestin⁺ qui croissent *in vitro* comme des neurosphères suggérant un potentiel neuronal. [406] Leur plasticité n'est pas limitée à la neurogénèse puisqu'une sous-population des cellules des neurosphères est capable de se différencier en un phénotype vasculaire et de mènent à la formation *de novo* de vaisseaux sanguins durant la cicatrisation cardiaque. [406] Collectivement, ces données obtenus par notre laboratoire et d'autres équipes, suggèrent la présence, dans le cœur, de cellules Nestin⁺

qui possèdent des caractéristiques d'une population de cellules souches neuronales cardiaques. [397, 406, 424, 432-435] D'ailleurs, une étude précédente de notre laboratoire a permis de confirmer que le cœur contient une population endogène de cellules Nestin⁺. [397] Ainsi, dans cette étude, un transfert de cellules de moelle osseuse de souris contenant des cellules Nestin GFP⁺ a été réalisé et a démontré que ce sont les cellules Nestin⁺ endogènes qui participent à la formation de la cicatrice suite à un infarctus du myocarde. [397] Les cellules Nestin⁺ injectées peuvent exprimer différents facteurs de croissance impliqués dans la migration, dans la formation de la fibrose et dans l'angiogenèse. Ces effets, observés par notre laboratoire, dans la zone infarctée/péri-infarctée, peuvent directement accroître la réponse fibrotique réparatrice. [407] En effet, une diminution de la taille de la cicatrice ainsi qu'une meilleure vascularisation de la région infarctée/péri infarctée ont été observées suite à l'injection de cellules Nestin⁺. [407]

La différenciation *in vitro* de cellules Nestin⁺ résidente du cœur en un phénotype neuronal (démonstré par une synthèse de neurofilament M) est également retrouvée *in vivo* dans la région infarctée/péri infarctée d'un cœur ayant subi un dommage ischémique. Une innervation de la cicatrice cardiaque par les cellules Nestin⁺ produisant des Neurofilaments M a également été observée par notre laboratoire. [436]

1.5 Problématique et but du projet

Le remodelage vasculaire est primordial dans la réponse d'adaptation des vaisseaux sanguins. La prolifération des cellules ainsi que le développement de fibres sont des phénomènes importants pour le maintien des fonctions vasculaires durant les changements hémodynamiques qui surviennent en situations pathologiques. Toutefois, il est suggéré que la perte de la fonction endothéliale résulte en une altération de ces mécanismes d'adaptations dans les parois vasculaires. De plus, une diminution importante de la capacité proliférative des cellules est également suggérée afin d'expliquer l'altération de ces processus en situations pathologiques, principalement durant le diabète. En effet, en situation diabétique, les atteintes vasculaires sont plus graves et les complications plus sévères par rapport à une situation pathologique non diabétique. Un autre facteur de risque des maladies cardiovasculaires qui entraîne un remodelage vasculaire est l'hypertension. Celle-ci amène une augmentation chronique de la pression sanguine et provoque des changements dans la paroi vasculaire.

La protéine Nestin est impliquée dans la prolifération cellulaire et est exprimée par les CE de la paroi vasculaire. En effet, des CE exprimant Nestin sont retrouvées dans les capillaires durant l'embryogénèse ainsi que lors de la vascularisation de tumeurs cancéreuses. Récemment, des cellules Nestin⁺ ont été identifiées au niveau des cellules du muscle lisse de l'aorte. Cependant, la régulation et le rôle de la protéine Nestin dans ces cellules sont inconnus. La présence de cette protéine au niveau vasculaire, principalement dans l'endothélium de vaisseaux nouvellement formés, nous a incité à nous interroger sur la fonction que cette protéine peut remplir au niveau vasculaire et qui, jusqu'à maintenant, n'est pas totalement comprise.

Cette thèse tente donc de confirmer l'hypothèse que l'expression vasculaire de Nestin joue un rôle dans l'homéostasie vasculaire durant le vieillissement physiologique et participe au remodelage suite à des stimuli pathologiques. Ainsi, l'objectif des travaux présentés dans cette thèse est, en premier lieu, de caractériser l'expression de la protéine Nestin au niveau des artères carotides et aortiques en situation physiologique durant le développement d'un modèle

de rat. Par la suite, nous avons étudié l'expression de Nestin dans deux modèles pathologiques distincts soient de diabète, induit par une injection de streptozotocin, et d'hypertension, induite par une constriction aortique abdominale surrénale. D'ailleurs, comme le remodelage vasculaire joue un rôle primordial dans la réponse d'adaptation des vaisseaux, ce projet ce veut un premier pas dans l'étude de l'importance de l'expression de la protéine Nestin dans le remodelage vasculaire.

2 Articles scientifiques

2.1 Nestin downregulation in rat vascular smooth muscle cells represents an early marker of vascular disease in experimental type I diabetes

Kim Tardif¹, Vanessa Hertig², Camille Dumais³, Louis Villeneuve³,
Louis Perrault⁴, Jean-François Tanguay¹ and Angelino Calderone^{2*}

Cardiovascular Diabetology 2014, 13:119

Full list of author information is available at the end of the article.

Short Title: Type I diabetes and vascular disease

Word Count: 5275

*Correspondence: Angelino Calderone, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330 ext. 3710. Fax: (514) 593-2596.

2.1.2 Abstract

Background: Nestin was reported to directly contribute to cell proliferation and the intermediate filament protein was detected in vascular smooth muscle cells. In experimental type I diabetes, Nestin downregulation in the heart was identified as an incipient pathophysiological event. The following study tested the hypothesis that dysregulation of Nestin expression in vascular smooth muscle cells represented an early event of vascular disease in experimental type I diabetes. **Methods/Results:** In the carotid artery and aorta of adult male Sprague-Dawley rats, a subpopulation of vascular smooth muscle cells co-expressed Nestin and was actively involved in the cell cycle as reflected by the co-staining of nuclear phosphohistone-3. The infection of aortic vascular smooth muscle cells with a lentivirus containing a shRNAmir directed against Nestin significantly reduced protein expression and concomitantly attenuated basal DNA synthesis. Two weeks following injection of adult male Sprague-Dawley rats with streptozotocin, the endothelial response of aortic rings to acetylcholine, vascular morphology and the total density of vascular smooth muscle cells in the vasculature of type I diabetic rats were similar to normal rats. By contrast, Nestin protein levels and the density of Nestin⁽⁺⁾/phosphohistone-3⁽⁺⁾-vascular smooth muscle cells were significantly reduced in type I diabetic rats. The *in vivo* observations were recapitulated *in vitro* as exposure of vascular smooth muscle cells to 30 mM D-glucose inhibited DNA synthesis and concomitantly reduced Nestin protein expression. **Conclusions:** Hyperglycaemia-mediated Nestin downregulation and the concomitant reduction of cycling

vascular smooth muscle cells represent early markers of vascular disease in experimental type I diabetes.

Keywords: Type I diabetes, rat, vasculature, Nestin, phosphohistone-3, vascular smooth muscle cells, hyperglycaemia

2.1.3 Background

Type I diabetes accounts for 5-10% of the diabetic population and is characterized by the depletion of insulin synthesis secondary to pancreatic beta cell destruction [1]. Thus, hyperglycaemia represents a chronic condition of type I diabetes and elevated plasma glucose levels was reported as the third major cause of global mortality [1]. Type II diabetes account for 90-95% of the diabetic population and is characterized by the reduced sensitivity of peripheral tissue to circulating insulin [1]. In this regard, a hypersecretion of insulin is chronically observed and ultimately leads to pancreatic beta cell exhaustion [1]. A major complication of diabetes is micro- and/or macrovascular disease in nearly all organs [1, 2]. Microvascular complications include retinopathy, nephropathy, and neuropathy whereas macrovascular complications constitute the rapid acceleration of cardiovascular and cerebrovascular disease secondary to stroke [1, 2]. An incipient pathophysiological event of diabetic vascular disease was an imbalance of homeostasis due to increased vasoconstriction secondary to impaired endothelial cell reactivity that occurred prior to the onset of overt clinical symptoms [1-3]. The underlying mechanisms included reduced bioavailability of nitric oxide secondary to the increased production of superoxide anion leading to the formation of peroxynitrite and/or compromised activity of endothelial nitric oxide synthase [1-3]. Vascular smooth muscle cell dysfunction likewise contributed to the progression of vessel disease in experimental models of diabetes and diabetic patients, albeit it remains presently unknown whether it occurred prior to, concomitantly or after impaired endothelial reactivity was established [1, 2, 4].

Nestin, a class VI intermediate filament protein was first detected in a population of

neural progenitor/stem cells residing in the CNS [5]. However, several studies have identified Nestin in developing skeletal myoblasts, endothelial cells during reparative angiogenesis and tumour vascularisation, upregulated in the infarcted heart, detected in diverse forms of cancer and a biological role in proliferation and/or migration was reported [6-13]. A recent study by Oikawa and colleagues demonstrated that Nestin was expressed in vascular smooth muscle cells of the adult rat aorta [14]. Work from our lab detected a population of cardiac resident Nestin-expressing cells that exhibited a neural progenitor/stem cell phenotype and downregulation of the intermediate filament protein was identified as an incipient pathophysiological event of type I diabetes [8, 9, 15, 16]. Based on these observations, the present study tested the hypothesis that Nestin expression in vascular smooth muscle cells (VSMCs) of the adult rat carotid artery and aorta was directly linked to proliferation and the intermediate filament protein was downregulated during the early stage of experimental type I diabetes attributed to hyperglycaemia.

2.1.4 Methods

Animal models

Vascular phenotype was determined in the aorta of neonatal (2-3 days old; Charles Rivers, Canada) and carotid artery and aorta of adult male Sprague–Dawley rats (9–11 weeks old; Charles Rivers, Canada). Experimental type I diabetes was induced following a single injection of streptozotocin (60 mg/kg) in the jugular vein of adult male Sprague-Dawley rats (9–11 weeks old) [15, 16]. Plasma glucose levels and left ventricular function were determined as previously described [16]. The use and care of laboratory rats was according to the Canadian Council for Animal Care and approved by the Animal Care Committee of the Montreal Heart Institute.

Endothelial reactivity of aortic rings

The endothelial function of aortic rings was determined in organ chambers as previously described [17].

Vessel morphology

Formalin fixed 6-8 μm thick sections of the carotid artery and aorta were stained with haematoxylin-phloxin-saffron (HPS) and images captured with the Olympus QICAM colour video camera interfaced with an Olympus CKX41 microscope. Vessel wall media thickness (mm) and media area (mm^2) were measured with Image-Pro (version 7, Media Cybernetics, Rockville, MD).

Vascular smooth muscle cells (VSMCs)

The carotid artery and aorta of adult male Sprague-Dawley rats (9–11 weeks old) were cut longitudinally and the lumen gently rubbed with a cotton swab to remove the endothelium. Vessel segments of 3-5 mm in length were digested in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; low glucose; HyClone Laboratories, Logan, UT) containing collagenase (type II; 1mg/ml) for 5 hours at 37⁰C. Cells were filtered (40 µm nylon mesh; Corning, NY), cultured in DMEM supplemented with 10% FBS (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY), 2% penicillin-streptomycin, 1% fungizone, epidermal growth factor (25 ng/ml), basic fibroblast growth factor (10 ng/ml) and grown until confluent. Experiments were subsequently performed exclusively on 1st/2nd passage VSMCs plated at a density of 125-150 cells/mm² in DMEM-containing 10% FBS for 24 hours. Thereafter, VSMCs were washed and the media replaced with DMEM supplemented with insulin/transferring/selenium (BD Bioscience, Bedford, MA) for 48 hours. To assess the effect of hyperglycaemia, VSMCs were plated in DMEM containing 5 mM D-glucose for 48 hours and thereafter supplemented with 25 mM D-glucose (Sigma, St-Louis MO), 30 mM L-glucose (Sigma) or 30 mM mannitol (Sigma) for 24 or 48 hours. DNA and protein synthesis was determined by ³H-thymidine and ³H-leucine uptake respectively, as previously described [10].

Immunofluorescence

Formalin fixed 6-8 µm thick sections were subjected to the antigen retrieval method and stained with the mouse monoclonal anti-Nestin (1:150; Chemicon, Temicula, CA), rabbit polyclonal anti-smooth muscle α-actin (1:100; Abcam, Cambridge, MA), goat monoclonal anti-CD31

(1:100; SantaCruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) or a rabbit polyclonal anti-phosphohistone-3 directed against phosphorylated serine 10 (1:100; Abcam). Primary and 1st/2nd passage VSMCs were plated on glass coverslips for ~48 hours, fixed with 4% paraformaldehyde and stained with the mouse monoclonal anti-Nestin (1:500; Chemicon), rabbit polyclonal anti-smooth muscle α -actin (1:200; Abcam), rabbit polyclonal anti-caldesmon (1:500; Abcam) or a rabbit polyclonal anti-smooth muscle-22 α (1:1000; Abcam). The nucleus was identified with To-PRO-3 (InVitrogen; 1.5 μ M) or 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma; 1.5 μ M) and used to calculate total cell density normalized to the field (mm^2). Secondary antibodies used were a goat anti-mouse IgG conjugated-Alexa-555 (1:800; InVitrogen) or a goat anti-rabbit IgG conjugated-Alexa-647 (1:800; InVitrogen). Immunofluorescence was visualized using a confocal LSM710 Zeiss microscope with the Zeiss LSM Image Browser. The density of Nestin⁽⁺⁾- and phosphohistone-3⁽⁺⁾-VSMCs were determined with maximum projections derived from a z-stack (voxel size of 143x143x250 nm in XYZ) and normalized to the vessel area (μm^2 ; average of at least 3-4 distinct fields). Non-specific staining was determined following the addition of the conjugated secondary antibody alone.

Western blot

Lysates (30-50 μ g) were prepared from the carotid artery, aorta or VSMCs, subjected to SDS-polyacrylamide gel (10%) electrophoresis and transferred to a PVDF membrane (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA) [16]. Antibodies used include a mouse monoclonal anti-Nestin (1:500; Chemicon), mouse monoclonal anti-eNOS (1:500; BD Bioscience), goat monoclonal anti-CD31 (1:500; SantaCruz Biotechnologies), rabbit polyclonal anti-caldesmon

(1:2500; Abcam), rabbit polyclonal anti-smooth muscle-22 α (1:5000; Abcam), rabbit polyclonal anti-smooth muscle α -actin (1:5000; Abcam), and mouse monoclonal anti-GAPDH (1:50,000; Ambion, Austin TX). Following overnight incubation at 4°C, the appropriate secondary antibody-conjugated to horseradish peroxidase (1:20,000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) was added and bands visualized utilizing the ECL detection kit (Perkin Elmer). Films were scanned with Image J software® and the target protein signal was depicted as arbitrary light units normalized to GAPDH protein levels.

Lentiviral construct

The lentiviral construct containing the shRNAmir directed against Nestin was prepared as previously described [10]. The biological impact of the empty lentivirus and the lentivirus containing the shRNAmir directed against Nestin was determined on DNA synthesis by measuring ³H-thymidine uptake of infected aortic-derived VSMCs, as previously described [10].

Statistics

Data are presented as the mean \pm S.E.M and (*n*) represents the number of rats or individual preparation of VSMCs used per experiment. Data was evaluated by a one-way ANOVA (GraphPad InStat) and a significant difference determined by the Student Newman-Keuls Multiple Comparisons post-hoc test or by a student's unpaired t-test and a value of $P < 0,05$ considered statistically significant.

2.1.5 Results

Temporal and spatial pattern of Nestin expression in the vasculature during physiological development

In the aortic arch of 1-3 day old neonatal Sprague-Dawley rats, Nestin immunoreactivity was detected in CD31⁽⁺⁾ endothelial cells (Figure 1A). Nestin staining of a subpopulation of smooth muscle α -actin⁽⁺⁾-VSMCs was variable among neonatal rats as expression was modest or completely absent in the media of the aortic arch (Figure 1B). In the aortic arch of adult male Sprague-Dawley rats, Nestin immunoreactivity persisted in CD31⁽⁺⁾ endothelial cells and a subpopulation of VSMCs in the medial region of the adult aortic arch expressed the intermediate filament protein (Figure 1C). Nestin immunoreactivity was identified in $20 \pm 2\%$ (N = 6, Figure 1C) of smooth muscle α -actin⁽⁺⁾-VSMCs residing predominantly in close proximity to the lumen of the adult aortic arch and occupied a density of 641 ± 89 cells/mm² (N = 6). In the thoracic region of the adult rat aorta, a subpopulation of Nestin⁽⁺⁾/smooth muscle α -actin⁽⁺⁾-VSMCs was also detected in the media but the percentage ($11 \pm 4\%$, Figure 1D) and density (276 ± 90 cells/mm²; N = 6) were significantly lower ($P < 0,01$) as compared to the aortic arch. The percentage ($6 \pm 2\%$) and density (170 ± 46 cells /mm²; N = 6) of Nestin⁽⁺⁾/smooth muscle α -actin⁽⁺⁾-VSMCs in the abdominal aorta likewise remained significantly lower ($P < 0,01$) as compared to the aortic arch. The spatial disparity in the density of Nestin⁽⁺⁾-VSMCs in the adult rat aorta was reaffirmed as expression of the intermediate filament protein was highest in the aortic arch and significantly lower in the thoracic and abdominal regions whereas smooth muscle α -actin protein levels were unchanged

(Figure 1G). Nestin immunoreactivity of CD31⁽⁺⁾-endothelial cells persisted in the thoracic and abdominal regions and CD31 and eNOS protein expression was similar throughout the adult aorta (N = 3-4) (Figure 1G). In the carotid artery of adult male Sprague-Dawley rats, a subpopulation of smooth muscle α -actin⁽⁺⁾-VSMCs co-expressed Nestin ($26 \pm 1\%$; 590 ± 72 cells/mm²; N = 4) and the intermediate filament protein was also detected in CD31⁽⁺⁾-endothelial cells (Figures 1E & 1F).

To reaffirm Nestin expression in a vascular smooth muscle cell lineage, carotid artery and aortic VSMCs were isolated, cultured and stained with smooth muscle α -actin, caldesmon and smooth muscle-22 α . The vascular smooth muscle cell phenotype of primary and 1st/2nd passage cells (N = 4-5) was confirmed and as observed *in vivo*, Nestin-immunoreactive filaments were detected in caldesmon⁽⁺⁾/smooth muscle-22 α ⁽⁺⁾/smooth muscle α -actin⁽⁺⁾-VSMCs (Figures 2A & 2B).

Biological role of Nestin

First passage aortic-derived VSMCs infected with a lentivirus containing a shRNAmir directed against Nestin (N = 4) led to a significant reduction in the expression of the intermediate filament protein, whereas lineage specific markers were unaffected (Figure 3A). These data were reaffirmed by immunofluorescence as staining was diminished in aortic VSMCs infected with the lentivirus containing the shRNAmir directed against Nestin (Suppl Figure 1). DNA synthesis, as measured by ³H-thymidine uptake was significantly attenuated in Nestin-depleted 1st passage aortic VSMCs (N = 4) (Figure 3B).

The established proliferative role of Nestin suggested that a subpopulation of VSMCs expressing the intermediate filament protein in the vasculature of normal adult rats was

actively engaged in the cell cycle. To evaluate cell cycle entry *in vivo*, phosphohistone-3 (PHH3) immunoreactivity characterized by the phosphorylation of serine 10 was examined [18]. Consistent with its proliferative role, a significant population of Nestin⁽⁺⁾-VSMCs in the carotid artery and aortic arch of normal adult rats was associated with nuclear PHH3 staining (Figures 4A, 4C & Table 1). Furthermore, Nestin⁽⁺⁾-endothelial cells in the vasculature of normal adult rats also co-expressed nuclear PHH3 (Figures 4A, 4C).

Streptozotocin-induced type I diabetes in the adult rat; endothelial reactivity and morphological/cellular vascular remodeling

Plasma glucose levels were increased and left ventricular contractility was significantly depressed 2 weeks after streptozotocin (STZ) injection of adult male rats (Table 2). Following pre-contraction with phenylephrine, acetylcholine treatment led to a dose-dependent relaxation of normal aortic rings and a quantitatively analogous response was observed in STZ-induced diabetic rats (Figure 5A). Consistent with the latter data, CD31 and eNOS protein levels (normalized to GAPDH) in the aorta and carotid artery of STZ-induced type I diabetic rats (N = 4-6) were comparable to normal rats (N = 4) (Figures 5B & 5C). Vascular morphology as measured by the media area and media thickness of the carotid artery and aorta were also similar in normal and type I diabetic rats (Table 3 & Suppl Figure 2).

The total density of VSMCs (as measured by nuclear staining) in the carotid artery and aortic arch of STZ-induced type I diabetic rats and normal rats were not significantly different (Table 1). However, a significant loss in the density of VSMCs expressing Nestin (Table 1) was observed in the carotid artery (Figure 4B) and aortic arch (Figure 4D) of type I diabetic rats. The data were reaffirmed as Nestin protein expression was significantly reduced in the

vasculature of type I diabetic rats as compared to normal rats (Figures 5B & 5C). The established proliferative role suggested that the reduced density of Nestin⁽⁺⁾-VSMCs in the carotid artery and aortic arch of STZ-induced diabetic rats may be associated in part with a concomitant loss in the number of cycling cells. In the vasculature of STZ-induced diabetic rats, the density of PHH3⁽⁺⁾-VSMCs and Nestin⁽⁺⁾-VSMCs co-expressing nuclear PHH3 were significantly decreased (Figures 4B & 4D; Table 1). Lastly, Nestin and PHH3 staining was apparently reduced in endothelial cells lining the vasculature of type I diabetic rats (Figures 4B & 4D).

Hyperglycaemia inhibited DNA synthesis and reduced Nestin protein expression in VSMCs

A 24 hour exposure of 1st/2nd passage carotid artery and aortic VSMCs to 30 mM mannitol or L-glucose had no effect on Nestin protein expression or lineage specific markers, as compared to cells treated with DMEM (N = 4-6) (Figures 6A & Suppl Figure 3). The exposure of carotid artery VSMCs to 30 mM D-glucose for 24 and 48 hrs significantly downregulated Nestin protein expression, whereas smooth muscle α -actin, caldesmon and smooth muscle-22 α protein levels were unchanged (N = 4-6) (Figures 6A, 6B and Suppl Figure 4). The exposure of aortic VSMCs to 30 mM D-glucose for 24 hrs did not have a significant effect on Nestin protein expression whereas a downregulation of the intermediate filament protein was observed after a 48 hr exposure (N = 4-6) (Suppl Figure 3). The 24 or 48 hr exposure of aortic VSMCs to 30 mM D-glucose did not influence the expression of lineage specific markers (Suppl Figures 3 & 4). DNA synthesis, as measured by ³H-thymidine uptake was significantly decreased following a 24 hr exposure of VSMCs to 30 mM D-glucose (N = 4-6) (Figure 6C).

By contrast, the density of VSMCs, as measured by nuclear staining (aortic VSMCs; L-glucose 51 ± 2 versus D-glucose 59 ± 7 cells/mm²; N = 3) and ³H-leucine uptake, a global index of protein synthesis were unchanged following exposure to 30 mM D-glucose (N = 4-6) (Figure 6D).

2.1.6 Discussion

Nestin was first identified as a selective marker of CNS-derived neural progenitor/stem cells [5]. However, Nestin expression was also reported in developing skeletal myoblasts, detected in endothelial cells during reparative angiogenesis and tumour vascularisation, upregulated in the infarcted heart and identified in diverse forms of cancer [6-11, 19, 20]. Oikawa and colleagues recently demonstrated that VSMCs of the adult rat aorta expressed Nestin [14]. The present study has reaffirmed the latter findings and further revealed that Nestin was also expressed in a subpopulation of VSMCs in the carotid artery of adult male rats. As reported by Oikawa and colleagues [14], a spatial disparity in the density of Nestin⁽⁺⁾-VSMCs was identified as a greater population was observed in the aortic arch versus the thoracic and abdominal regions of adult male rats. Consistent with the latter data, Nestin protein expression was highest in the aortic arch and significantly lower in the thoracic and abdominal regions, whereas smooth muscle α -actin protein levels were comparable in the three regions of the aorta. Lastly, the *in vivo* immunofluorescence data was confirmed *in vitro* as Nestin⁽⁺⁾-filaments were detected in primary and 1st/2nd passage carotid artery and aortic VSMCs characterized by smooth muscle α -actin, caldesmon and smooth muscle-22 α co-staining.

To ascertain the biological role, Nestin expression was depleted with a lentivirus containing a shRNAmir that selectively targeted the intermediate filament protein [10]. Lentiviral shRNAmir-mediated depletion of Nestin in aortic-derived VSMCs significantly attenuated basal ³H-thymidine uptake demonstrating that the intermediate filament protein participated in cell cycle entry. Based on these observations, an analogous paradigm may be

prevalent in Nestin-expressing VSMCs in the vasculature of adult rats. To examine the latter issue *in vivo*, immunoreactivity of phosphohistone H3 (PHH3); an established cell cycle protein that was directly phosphorylated on the residue serine 10 during chromosome condensation in G₂/M phase was examined [18]. In the carotid artery and aortic arch of adult rats, a significant population of Nestin⁽⁺⁾-VSMCs were actively engaged in the cell cycle as nuclear PHH3 co-staining was identified. Nestin staining of CD31⁽⁺⁾-endothelial cells in the vasculature of adult rats was also associated with nuclear PHH3 immunoreactivity. The latter findings were in stark contrast to that of Oikawa and colleagues [14] as their study did not detect Nestin immunoreactivity in endothelial cells in the aorta of adult rats. Previous studies have reported Nestin expression in proliferating endothelial cells in the developing pancreas, during wound healing and tumor vascularisation [8, 11, 19, 20]. However, Nestin⁽⁺⁾-endothelial cells in the carotid artery and aorta of normal adult male rats were also actively engaged in proliferation as revealed by nuclear PHH3 co-staining. Therefore, these data suggest that Nestin expression in proliferating endothelial cells was not restricted to *de novo* blood vessel formation during physiological development and pathological remodeling.

Work from our lab has reported that Nestin downregulation in the heart of type I diabetic rats was identified as an incipient pathophysiological event and contributed in part to the impaired neurogenic response of neural progenitor/stem cells during the reparative fibrotic response of the type I diabetic infarcted rat heart [15, 16]. These observations provided the impetus to test the hypothesis that dysregulation of Nestin expression in VSMCs may represent an early event of vascular disease in type I diabetes. Two weeks following streptozotocin (STZ) injection of adult male rats, plasma glucose levels were elevated and associated with left ventricular contractile dysfunction. Previous studies have reported that

hyperglycemia-induced increase in oxidative stress was directly implicated in endothelial dysfunction and identified as an early pathological event of diabetes prior to the overt manifestation of symptoms [1-3]. In the present study, the vasorelaxant response of aortic rings to acetylcholine and eNOS and CD31 protein levels in the aorta during the early phase of experimental type I diabetes were similar to normal rats. In addition, the total density of VSMCs and morphological remodeling of the carotid artery and aorta were also comparable in normal and type I diabetic rats. However, Nestin protein levels and the density of VSMCs expressing Nestin and nuclear PHH3 were significantly reduced in the carotid artery and aortic arch of type I diabetic rats. These findings support the premise that despite the absence of a change in the total density of VSMCs in the vasculature of type I diabetic rats, a significant population was unable to re-enter the cell cycle as reflected by the concomitant downregulation of Nestin and PHH3 expression. The immunofluorescence data further revealed that Nestin and PHH3 staining was decreased in endothelial cells in the vasculature of type I diabetic rats, thereby suggesting that the proliferative response was also compromised.

In vitro experiments were performed to assess whether the reduced density of cycling VSMCs in STZ-induced diabetic rats was directly attributed to elevated plasma glucose levels. Previous studies have reported that cultured VSMCs exposed to high glucose significantly increased, decreased or had no effect on proliferation [21-24]. The underlying reasons for the disparate *in vitro* findings remain unknown. Therefore, to limit the potential spurious impact of long-term culturing, the impact of elevated glucose was examined exclusively on 1st/2nd passage VSMCs. The 24 hour exposure of 1st/2nd passage carotid artery and aortic VSMCs to 30 mM D-glucose significantly attenuated DNA synthesis, as reflected by the decreased

uptake of ^3H -thymidine. By contrast, the density of VSMCs and ^3H -leucine uptake were unchanged following a 24 hour exposure to 30 mM D-glucose. The *in vitro* data recapitulated the *in vivo* findings as the total density of vascular smooth muscle cells was unchanged in the vasculature during the early phase of STZ-induced diabetes albeit a significant population was unable to re-enter the cell cycle. Moreover, the downregulation of Nestin protein levels in VSMCs of STZ-induced diabetic rats was attributed in part to hyperglycemia as exposure of 1st/2nd passage carotid artery and aortic VSMCs to 30 mM D-glucose significantly reduced expression, whereas lineage specific markers were unaffected. A similar paradigm was reported following renal damage secondary to experimental type I diabetes as Nestin expression was reduced in podocytes mediated by elevated plasma glucose levels [25,26]. Thus, the hyperglycemic environment of experimental type I diabetes contributed in part to the loss of Nestin expression in the vasculature and downregulation of the intermediate filament protein may further represent an incipient event attenuating the re-entry of VSMCs in the cell cycle.

A seminal finding of the present study was the apparent physiological turnover of a subpopulation of Nestin⁽⁺⁾-VSMCs in the carotid artery and aorta of normal adult male rats characterized by concomitant nuclear PHH3 staining. During the early phase of experimental type I diabetes, endothelial reactivity, vessel morphology and the total density of VSMCs were similar to normal rats. However, the density of VSMCs co-expressing Nestin and PHH3 in the vasculature of STZ-induced diabetic rats was significantly reduced. The latter paradigm was recapitulated *in vitro* as the acute exposure of VSMCs to 30 mM D-glucose significantly reduced Nestin protein levels and attenuated DNA synthesis. Collectively, these data support the novel premise that hyperglycaemia-mediated Nestin downregulation and the concomitant

reduction of cycling VSMCs represent early markers of vascular disease in experimental type I diabetes that occurred prior to the onset of impaired endothelial reactivity.

Competing interests

The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

Authors' contributions

KT performed experiments and wrote draft; VH performed experiments; CD performed experiments; LV immunofluorescence; LP vascular reactivity experiments; JFT supervisor and planning of study; AC supervisor, planning of study, reviewed/edited manuscript.

Acknowledgments

The author acknowledges Marie-Pierre Mathieu and Marie-Élaine Clavet for their technical assistance and Tina Louise Boivin for excellent secretarial assistance. AC is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Author details

¹Department of Biomedical Sciences, Université de Montréal, and Research Center, Montreal Heart Institute, Montreal, QC, Canada.

²Departement of Physiology, Université de Montréal and Research Center, Montreal Heart Institute, Montreal, QC, Canada.

³Research Center, Montreal Heart Institute, Montreal, QC, Canada

⁴Department of Medicine, Université de Montréal, and Research Center, Montreal Heart Institute, Montreal, QC, Canada.

2.1.7 References

1. Forbes JM and Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 2013, 93:137–188.
2. Cade WT. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther* 2008, 88:1322–1335.
3. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van d Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000, 130:963–974.
4. Farmer DG, Kennedy S. RAGE vascular tone and vascular disease. *Pharmacol Ther* 2009, 124:185–194.
5. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990, 60:585-595.
6. Sejersen T, and Lendahl U. Transient expression of the intermediate filament Nestin during skeletal muscle development. *J Cell Sci* 1993, 106:1291-1300.
7. Mokrý J, Cízková D, Filip S, Ehrmann J, Osterreicher J, Kolár Z, English D. Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev* 2004, 13:658-664.
8. El-Helou V, Chabot A, Gosselin H, Villeneuve L, Clavet-Lanthier ME, Tanguay JF, Enikolopov G, Fernandes KJ, Jasmin JF, Calderone A. Cardiac resident Nestin⁺ cells participate in reparative vascularisation. *J Cell Physiol* 2013, 228:1844-1853.
9. El-Helou V, Beguin PC, Assimakopoulos J, Clement R, Gosselin H, Brugada R, Aumont A, Biernaskie J, Villeneuve L, Leung TK, Fernandes KJ, Calderone A. The rat

- heart contains a neural stem cell population; role in sympathetic sprouting and angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 2008, 45:694-702.
10. Béguin P, Gosselin H, Mamarbachi M & Calderone A. Nestin expression is lost in ventricular fibroblasts during postnatal development of the rat heart and re-expressed in scar myofibroblasts. *J Cell Physiol* 2012, 227:813-820.
 11. Ishiwata T, Matsuda Y, Naito Z. Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2010, 17:409-418.
 12. Xue XJ and Yuan XJ. Nestin is essential for mitogen-stimulated proliferation of neural progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 2010, 45:26-36.
 13. Kleeberger W, Bova GS, Nielsen ME. Roles for the stem cell associated intermediate filament Nestin in prostate cancer migration and metastasis. *Cancer Res* 2007, 67:9199-9206.
 14. Oikawa H, Hayashi K, Maesawa C, Masuda T, Sobue K. Expression profiles of Nestin in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* 2010, 316:940-950.
 15. El-Helou V, Proulx C, Assimakopoulos J. The cardiac neural stem cell phenotype is compromised in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *J Cell Physiol* 2009, 220:440-449.
 16. Chabot A, Meus MA, Hertig V, Duquette N, Calderone A. The neurogenic response of cardiac resident Nestin⁽⁺⁾ cells was associated with the upregulation of GAP43 and abrogated in a setting of type I diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2013, 12;114.
 17. Aubin MC, Lajoie C, Clément R, Gosselin H, Calderone A, Perrault LP. Female Rats Fed a High Fat Diet Were Associated with Vascular Dysfunction and Cardiac Fibrosis in

the Absence of Overt Obesity and Hyperlipidemia: Therapeutic Potential of Resveratrol. *J Pharmacol Exp Therap* 2008, 325:961-968.

18. Tsuta K, Liu DC, Kalthor N, Wistuba II, Moran CA. Using the mitosis-specific marker anti-phosphohistone H3 to assess mitosis in pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2011, 136:252-259.
19. Teranishi N, Naito Z, Ishiwata T, Tanaka N, Furukawa K, Seya T, Shinji S, Tajiri T. Identification of neovasculature using Nestin in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2007, 30:593-603.
20. Treutelaar MK, Skidmore JM, Dias-Leme CL, Hara M, Zhang L, Simeone D, Martin DM, Burant CF. Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet. *Diabetes* 2003, 52:2503-2512.
21. Tammali R, Saxena A, Srivastava SK, Ramana KV. Aldose reductase regulates vascular smooth muscle cell proliferation by modulating G1/S phase transition of cell cycle. *Endocrinology* 2010, 151:2140–2150.
22. Sun J, Xu Y, Dai Z, Sun Y. Intermittent high glucose enhances proliferation of vascular smooth muscle cells by upregulating osteopontin. *Mol Cell Endocrinology* 2009, 313:64-69.
23. Seki N, Hashimoto N, Sano H, Horiuchi S, Yagui K, Makino H, Saito Y. Mechanisms involved in the stimulatory effect of advanced glycation end products on growth of rat aortic smooth muscle cells. *Metabolism* 2003, 52:1558-1563.
24. Suzuki LA, Poot M, Gerrity RG, Bornfeldt KE. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis. *Diabetes* 2001, 50:851–860.

25. Liu W, Zhang Y, Hao J, Liu S, Liu Q, Zhao S, Shi Y, Duan H. Nestin protects mouse podocytes against high glucose-induced apoptosis by a cdk5-dependent mechanism. *J Cell Biochem* 2012, 113:3186-3196.
26. Liu W, Zhang Y, Liu S, Liu Q, Hao J, Shi Y, Zhao S, Duan H. The expression of intermediate filament protein Nestin and its association with cyclin-dependent kinase 5 in the glomeruli of rats with diabetic nephropathy. *Am J Med Sci.* 2013, 345:470-477.

2.1.8 Figure Legends

Figure 1. Nestin expression in neonatal and adult rat vessels. Nestin, CD31 and smooth muscle α -actin (SMA) staining of (**Panels A & B**) the neonatal aortic arch, (**Panel C**) adult aortic arch, (**Panel D**) adult thoracic region and (**Panels E & F**) adult rat carotid artery. The arrow indicates the luminal side and the nucleus identified by DAPI (blue fluorescence). (**Panel G**) Nestin expression was greatest in the aortic arch (AA) as compared to the thoracic (TA) and abdominal (AB) regions of the adult rat aorta, whereas CD31, eNOS and smooth muscle α -actin protein levels were unchanged. (*) Denotes $P < 0,05$ versus AA and protein levels were normalized to GAPDH.

Figure 2. Phenotype of cultured VSMCs. (**Panel A**) Lineage specific markers were expressed in carotid artery and aortic VSMCs. (**Panel B**) Filamentous Nestin was detected in caldesmon and smooth muscle-22 $\alpha^{(+)}$ -VSMCs. The nucleus was identified by To-PRO-3 (blue fluorescence).

Figure 3. Nestin depletion and DNA synthesis. (**Panel A**) Aortic VSMCs infected with a lentivirus containing a shRNAmir directed against Nestin reduced protein expression, whereas smooth muscle α -actin (SMA), caldesmon and smooth muscle-22 α protein levels were unchanged. (**Panel B**) In Nestin-depleted aortic VSMCs, ^3H -thymidine uptake was

significantly decreased. (*) Denotes $P < 0,05$ versus VSMCs infected with the empty lentivirus.

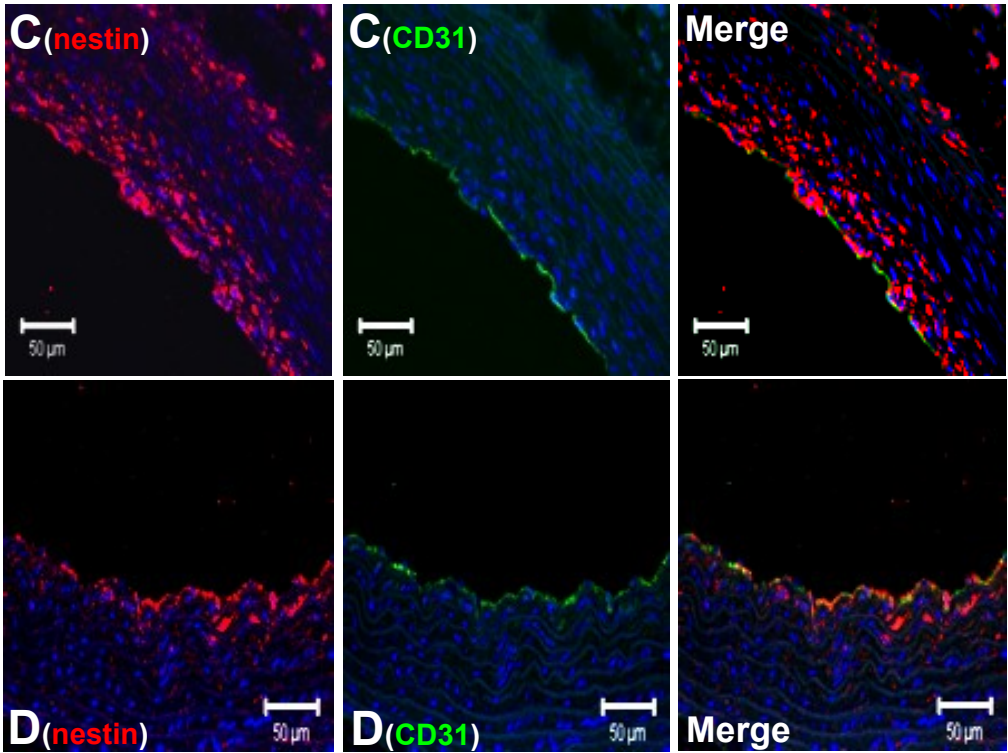
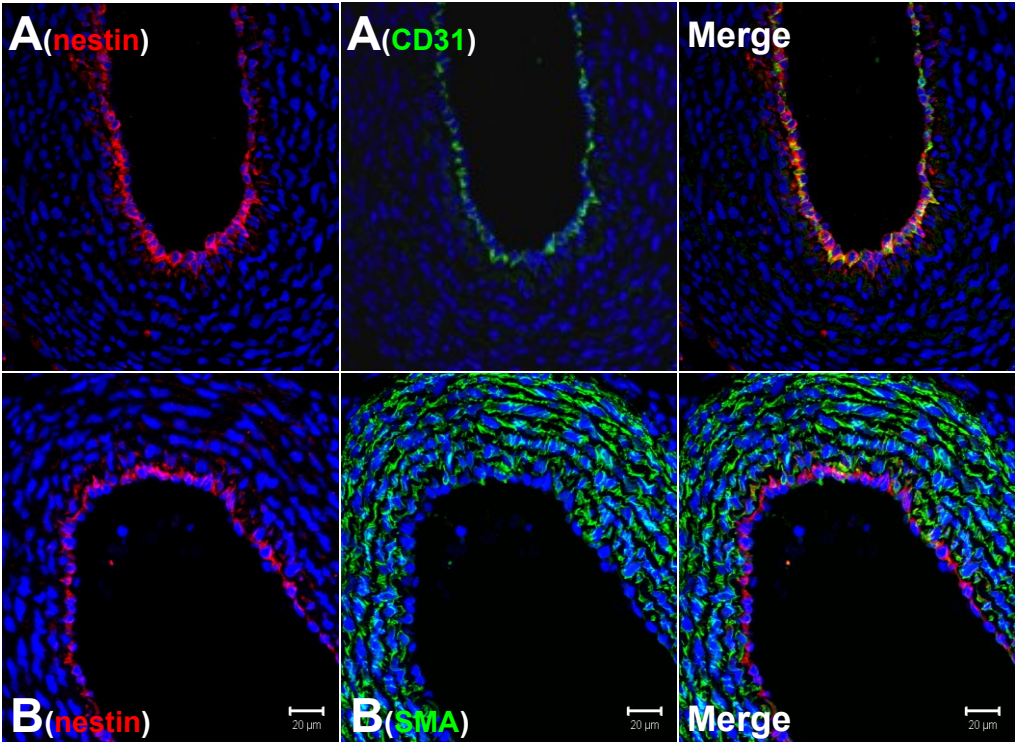
Figure 4. Nestin⁽⁺⁾-VSMCs were actively involved in the cell cycle; impact of type I diabetes. A subpopulation of Nestin⁽⁺⁾-VSMCs and Nestin⁽⁺⁾-endothelial cells in the (**Panel A**) carotid artery and (**Panel C**) aorta arch of normal adult rats were associated with nuclear PHH3 staining. In type I diabetic rats, the subpopulation of Nestin⁽⁺⁾-VSMCs co-expressing nuclear PHH3 staining in the (**Panel B**) carotid artery and (**Panel D**) aortic arch was reduced and Nestin/PHH3 co-staining of endothelial cells was also diminished. The arrow indicates the luminal side and the nucleus was identified by DAPI (blue fluorescence).

Figure 5. Endothelial reactivity and Nestin expression in type I diabetic rats. (**Panel A**) Acetylcholine-mediated relaxation of pre-contracted aortic rings was comparable in sham (N = 3) and streptozotocin (STZ, N = 3) induced type I diabetic rats. Nestin expression in the (**Panel B**) carotid artery and (**Panel C**) aorta of type I diabetic rats was significantly reduced, whereas CD31 and eNOS levels were unchanged. (*) Denotes $P < 0,05$ versus sham and protein levels normalized to GAPDH.

Figure 6. Hyperglycaemia, Nestin expression and DNA synthesis in VSMCs. (**Panels A & B**) Exposure of 1st/2nd passage carotid artery VSMCs to 30 mM mannitol or 30 mM L-glucose for 24 hours did not influence Nestin protein expression as compared to DMEM. A 24 and/or 48-hour exposure to 30 mM D-glucose significantly reduced Nestin protein levels, whereas smooth muscle α -actin (SMA), caldesmon and smooth muscle-22 α protein

expression was unchanged. (*) Denotes $P < 0,05$ versus L-glucose and protein levels normalized to GAPDH. (**Panel C**) VSMCs exposed to 30 mM D-glucose for 24 hours attenuated ^3H -Thymidine uptake. VSMCs treated with 10% FBS increased ^3H -thymidine uptake, whereas 30 mM mannitol and 30 mM L-glucose had no effect (**Panel D**) VSMCs exposed to 30 mM D-glucose, 30 mM L-glucose or 30 mM mannitol for 24 hours had no effect on ^3H -Leucine uptake, whereas a robust increase was observed with 10% FBS. Results are presented as % change versus DMEM and (*) denotes $P < 0,05$ versus L-glucose/mannitol

2.1.9 Figure 1



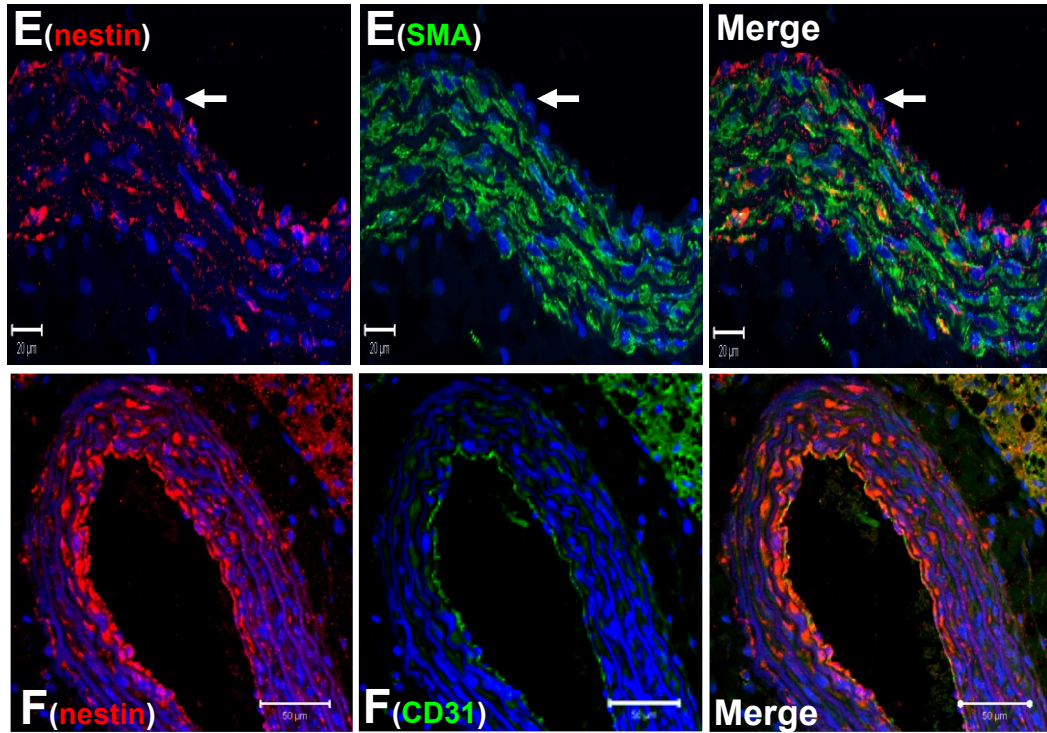
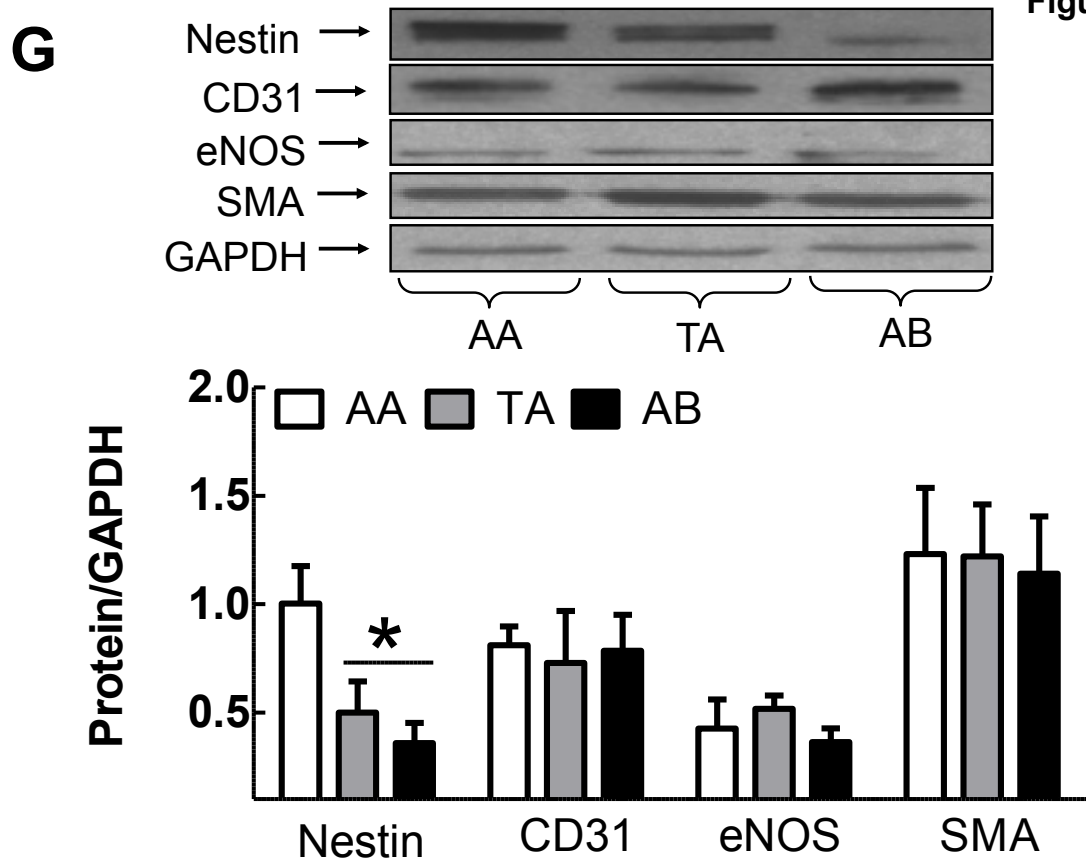
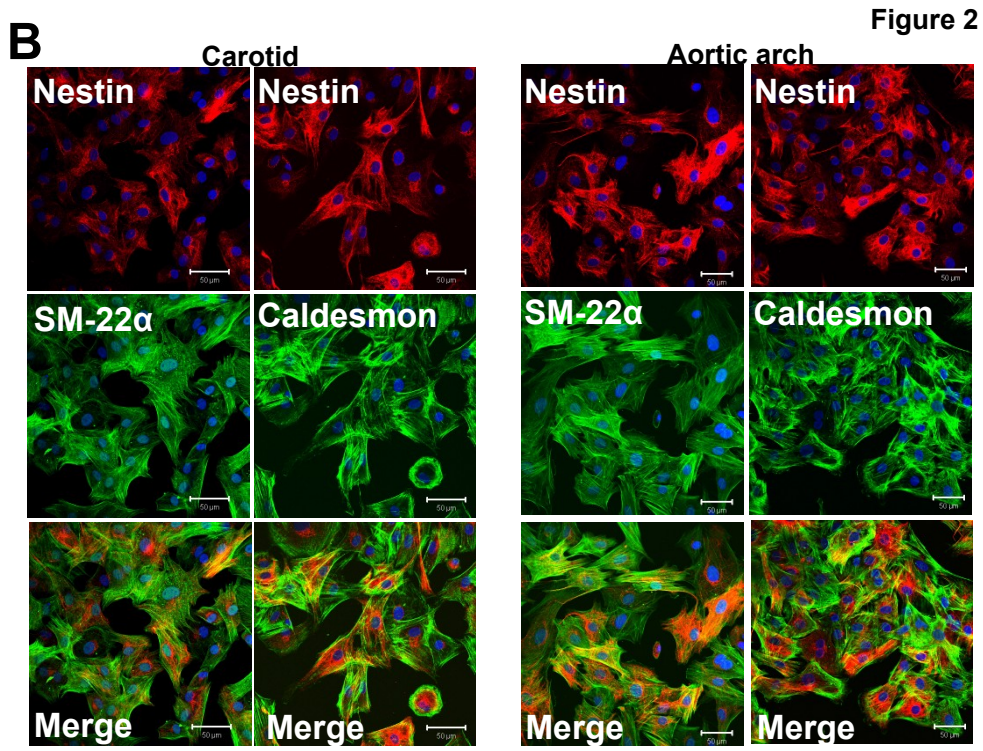
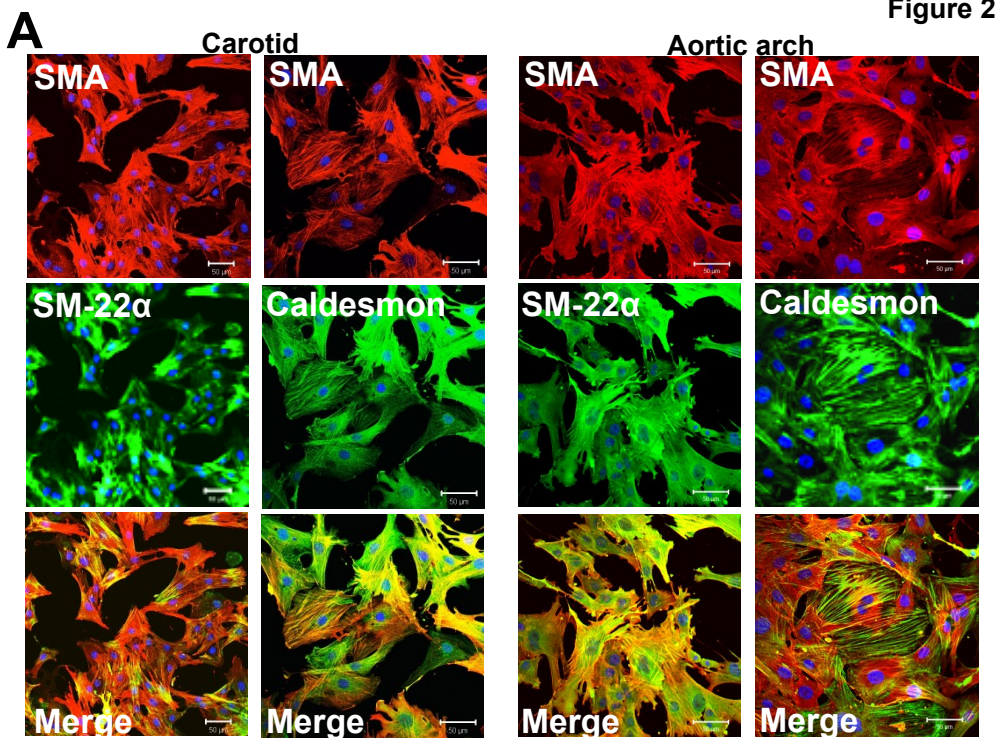


Figure 1



2.1.10 Figure 2



2.1.11 Figure 3

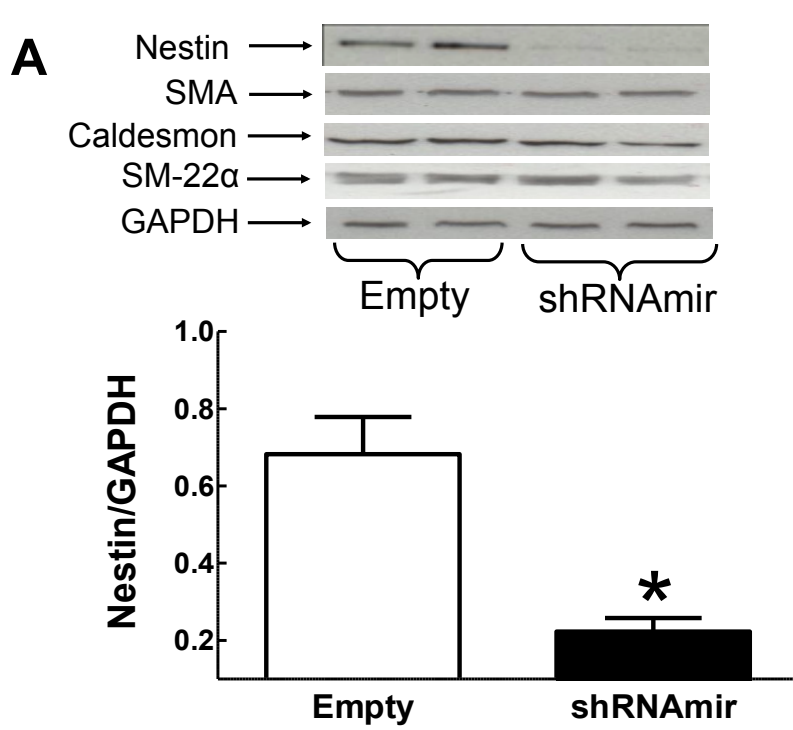


Figure 3

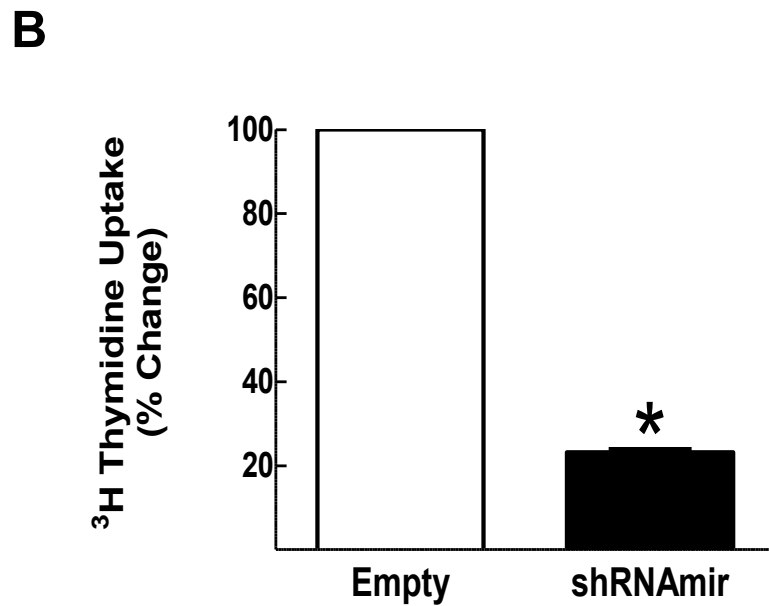
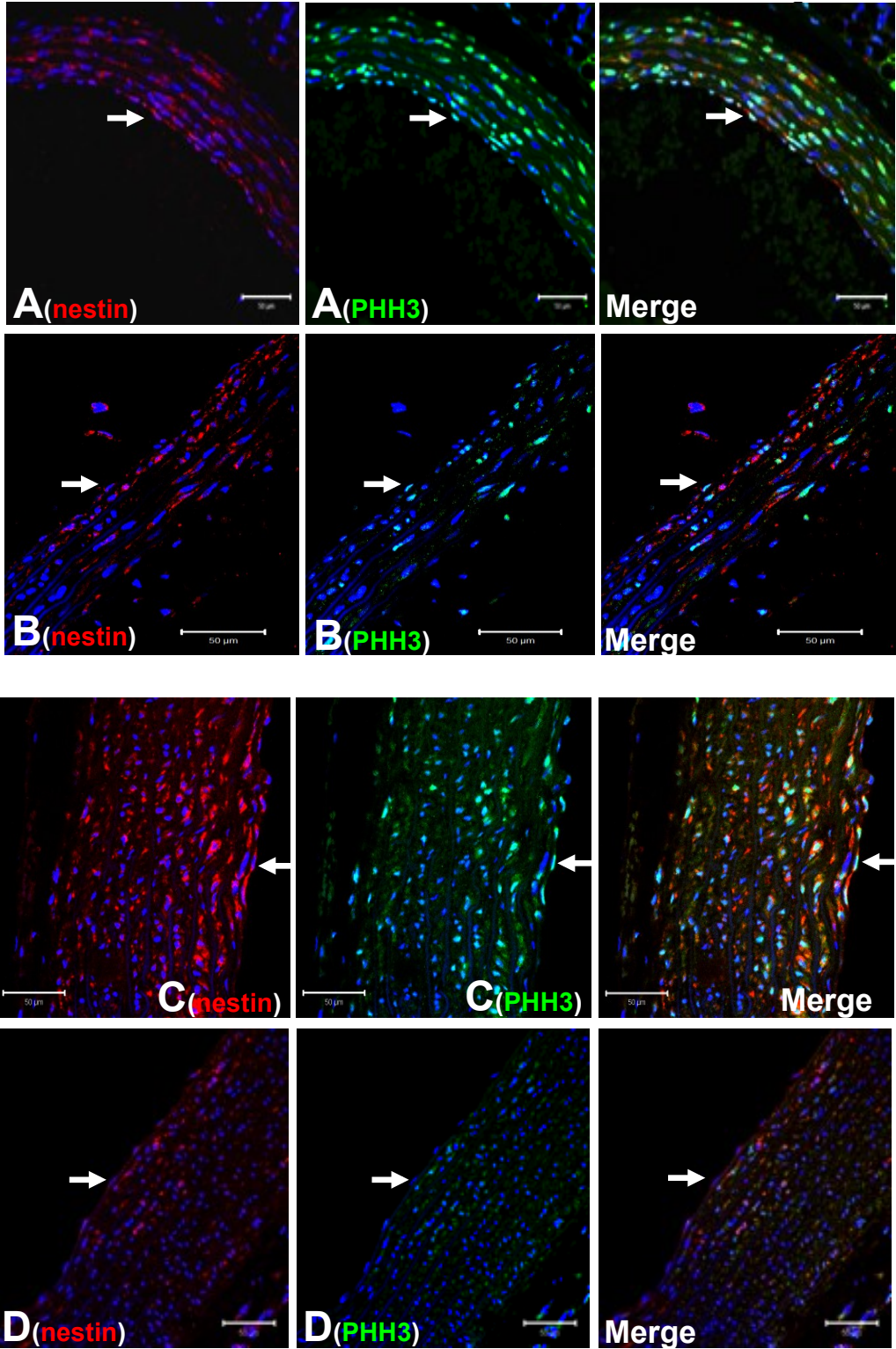


Figure 3

2.1.12 Figure 4



2.1.13 Figure 5

Figure 5

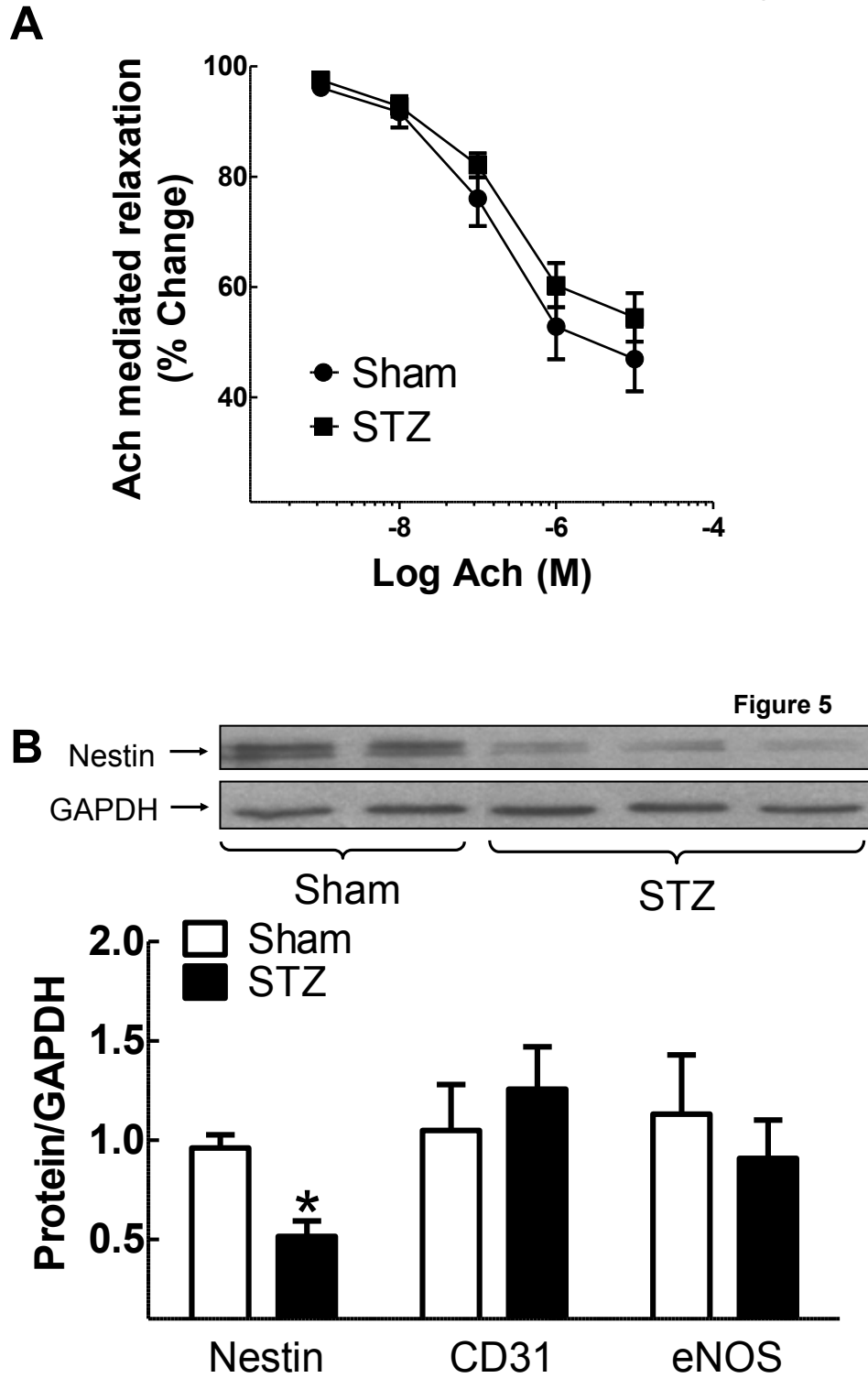
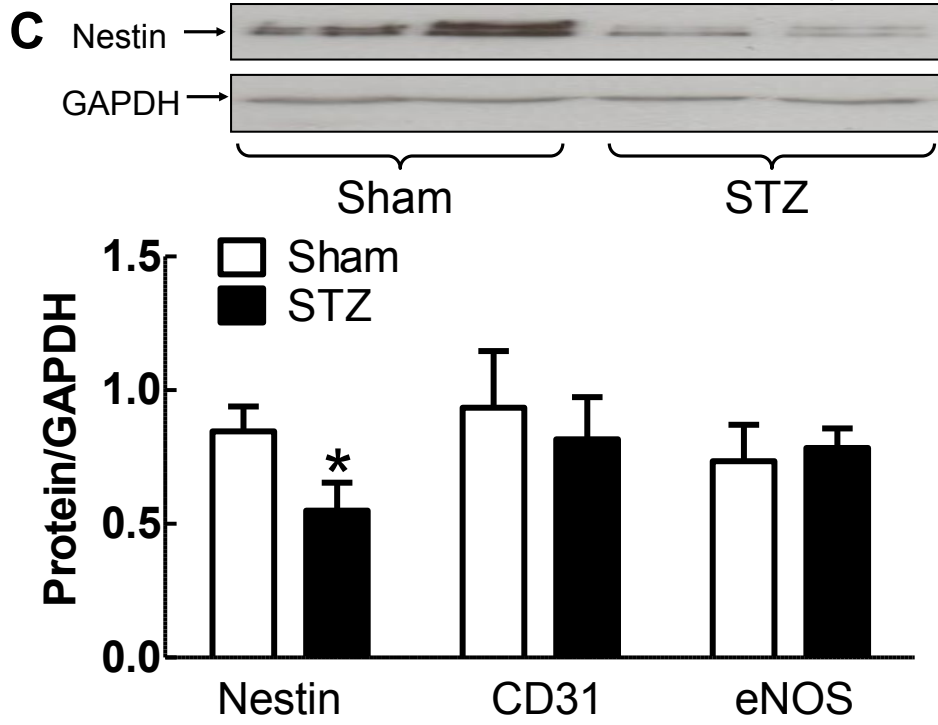


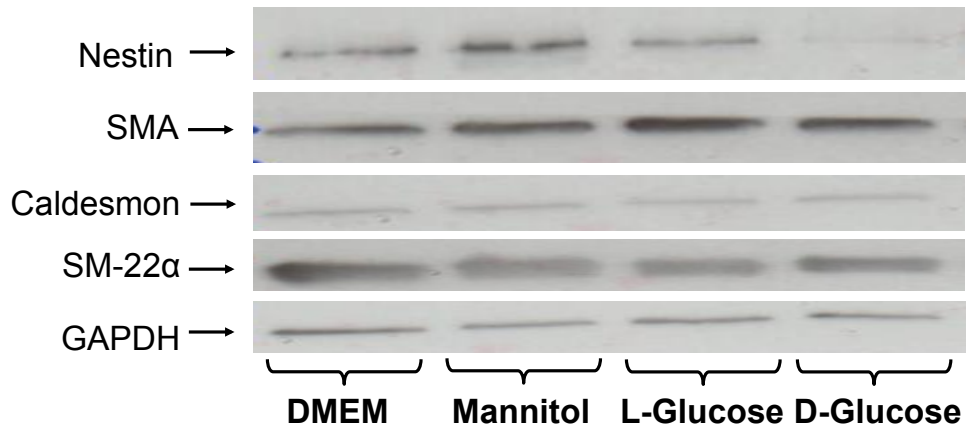
Figure 5



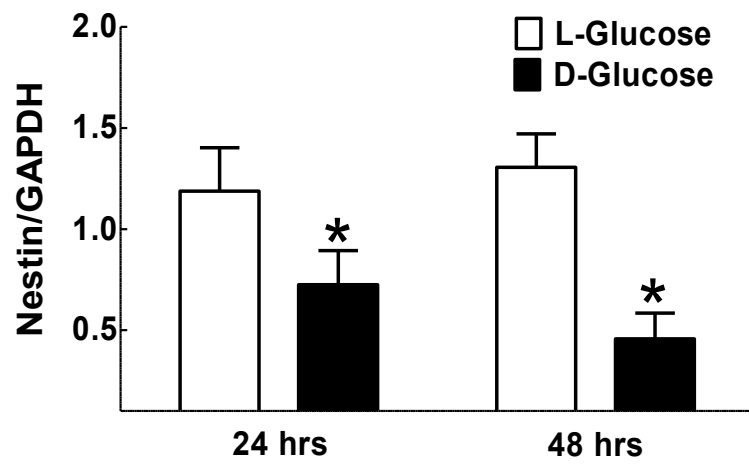
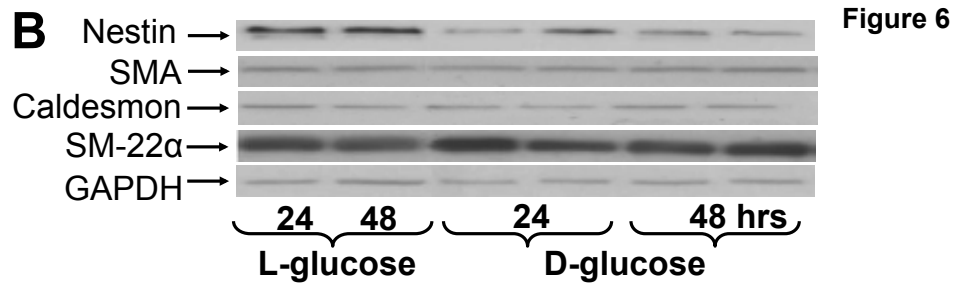
2.1.14 Figure 6

Figure 6

A



B



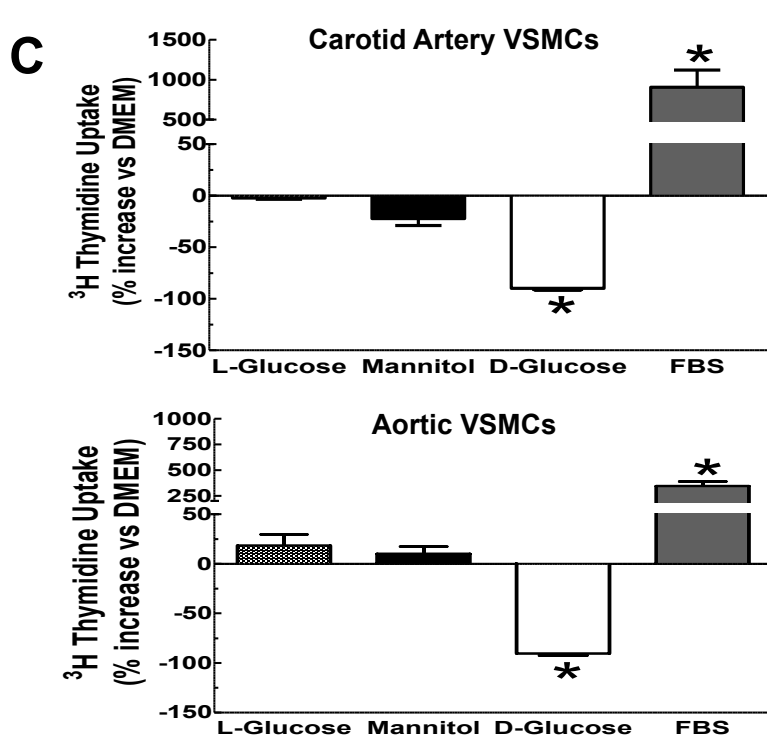


Figure 6

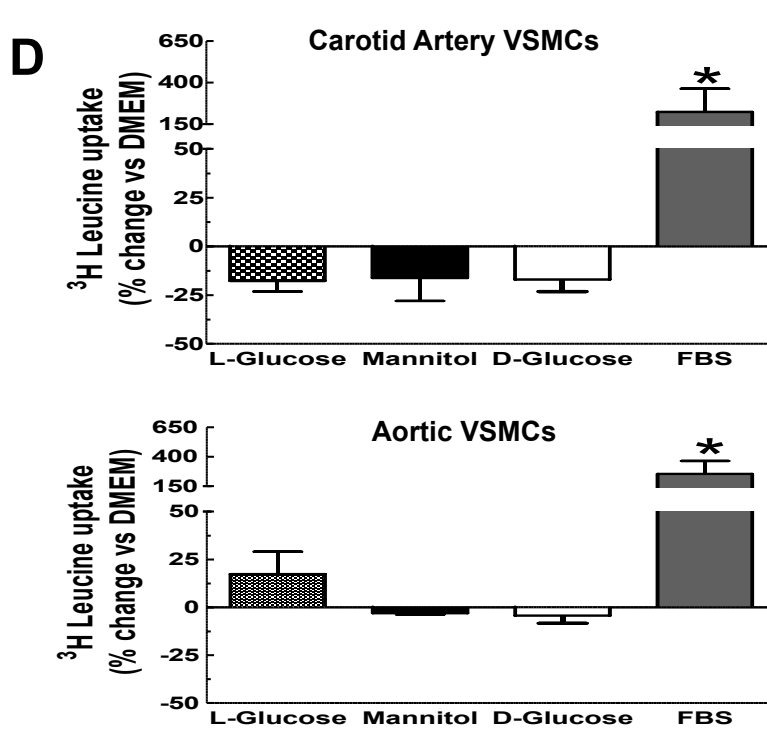


Figure 6

2.1.15 Table 1. Vascular remodeling of the carotid artery and aorta of normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats

	Aortic arch		Carotid artery	
	Sham (N = 6)	STZ (N = 6)	Sham (N = 4-5)	STZ (N = 4-5)
Total Density (cells/mm ²)	3114 ± 204	2693 ± 284	2869 ± 223	2710 ± 237
PHH3 ⁽⁺⁾ (cells/mm ²)	1032 ± 201	137 ± 28*	797 ± 124	416 ± 108*
PHH3 ⁽⁺⁾ /Nestin ⁽⁻⁾ (cells/mm ²)	645 ± 131	84 ± 18*	430 ± 73	273 ± 87*
Nestin ⁽⁺⁾ (cells/mm ²)	641 ± 89	385 ± 48*	590 ± 72	355 ± 64*
HH3 ⁽⁺⁾ /Nestin ⁽⁺⁾ (cells/mm ²)	387 ± 77	52 ± 15*	368 ± 62	143 ± 36*

STZ indicates streptozotocin-induced diabetic rats, data are presented as mean ± SEM, analyzed by unpaired t-test, (*) represents P < 0.05 versus sham and (N) number of rat examined.

2.1.16 Table 2. Cardiac function of normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats

	BW (g)	MAP (mmHg)	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	LV +dp/dt (mmHg/sec)	LV -dp/dt (mmHg/sec)	Plasma glucose
Sham (N = 5)	312 ± 1	117 ± 3	148 ± 8	8 ± 1	6963 ± 188	6069 ± 172	10 ± 2
STZ (N = 5)	263 ± 2*	87 ± 1*	109 ± 1*	10 ± 1	5656 ± 79*	4155 ± 53*	29 ± 1*

STZ indicates streptozotocin-induced diabetic rats, BW, body weight, MAP, mean arterial pressure, LVSP, left ventricular systolic pressure, LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure, +dp/dt, rate of contraction; -dp/dt rate of relaxation, LV, data are presented as mean ± SEM, analyzed by unpaired t-test, (*) represents P < 0.05 versus sham and (N) number of rat examined.

2.1.17 Table 3. Vascular morphology of the carotid artery and aorta of normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats

	Carotid artery		Aortic arch		Thoracic Aorta		Abdominal Aorta	
	Sham (N = 4)	STZ (N = 4)	Sham (N = 4)	STZ (N = 4)	Sham (N = 4)	STZ (N = 4)	Sham (N = 4)	STZ (N = 4)
Media thickness (mm)	0.063 ± 0.002	0.066 ± 0.002	0.15 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Media area (mm ²)	0.147 ± 0.006	0.148 ± 0.011	0.82 ± 0.06	0.82 ± 0.04	0.59 ± 0.08	0.55 ± 0.05	0.44 ± 0.01	0.55 ± 0.01

STZ indicates streptozotocin-induced diabetic rats, data are presented as mean ± SEM, and (N) number of rat examined.

2.1.18 Supplemental Figure Legends

Suppl Figure 1. Lentivirus-shRNAmir directed against Nestin. (Panel A) The infection of aortic vascular smooth muscle cells with the empty lentivirus expressing the reporter green fluorescent protein (GFP) had no significant effect on Nestin immunoreactivity. **(Panel B)** The infection of aortic vascular smooth muscle cells with a lentivirus containing a shRNAmir directed against Nestin significantly reduced staining of the intermediate filament protein.

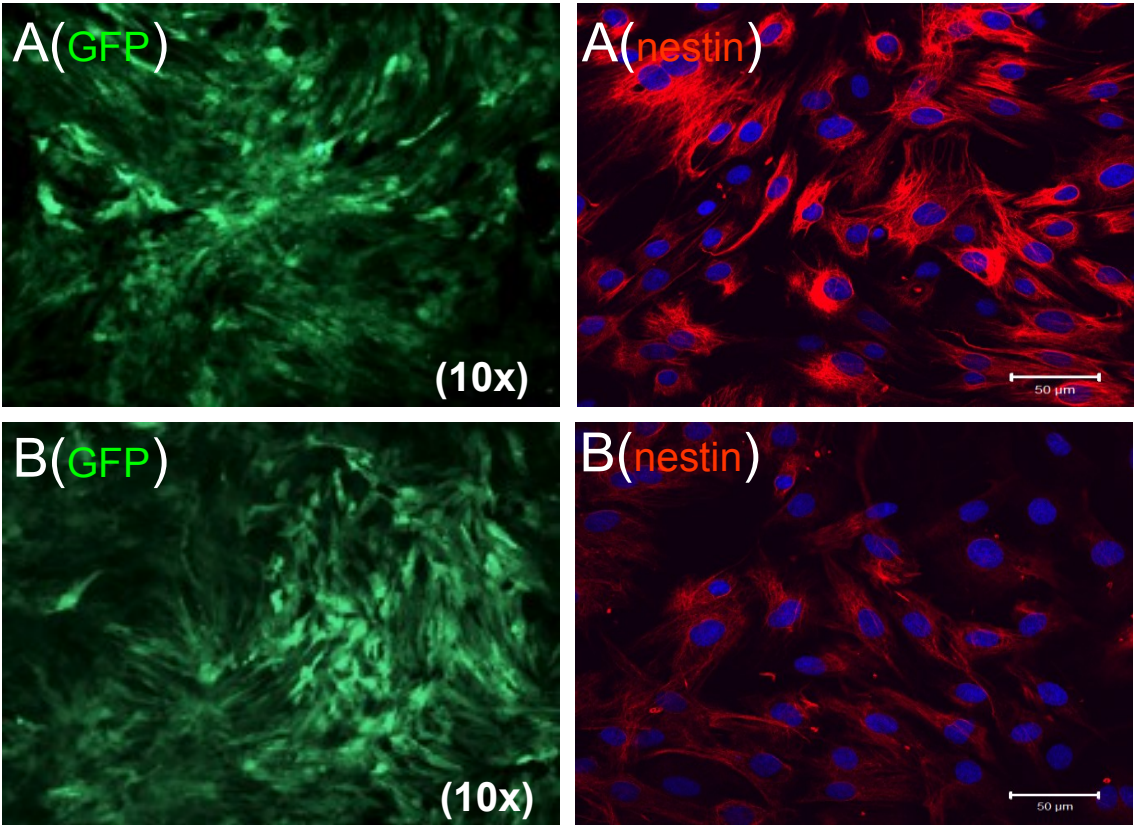
Suppl Figure 2. Vascular morphology. The media thickness and area of the carotid artery (CA) and aortic arch (AA) of streptozotocin (STZ) induced type I diabetic rats were similar to sham rats.

Suppl Figure 3. Hyperglycaemia downregulated Nestin protein expression in aortic VSMCs. The exposure of **(Panels A & B)** 1st/2nd passage aortic VSMCs to 30 mM mannitol or 30 mM L-glucose for 24 hrs did not significantly influence Nestin protein expression as compared to DMEM. A 48 hr exposure of aortic-derived VSMCs to 30 mM D-glucose significantly reduced Nestin protein levels, as compared to 30 mM L-glucose treated cells, whereas smooth muscle α -actin (SMA), caldesmon and smooth muscle-22 α protein expression was unchanged. (*) Denotes $p < 0,05$ versus L-glucose and data normalized to GAPDH.

Suppl Figure 4. The impact of hyperglycaemia on vascular smooth muscle cells. A 24 and/or 48 hour exposure of **(Panel A)** carotid artery (n=4-6) and **(Panel B)** aortic-derived (n=4-6) vascular smooth muscle cells to 30 mM D-glucose had no significant effect on smooth muscle α -actin, caldesmon and smooth muscle-22 α protein expression as compared to 30 mM L-glucose. Proteins levels were normalized to GAPDH.

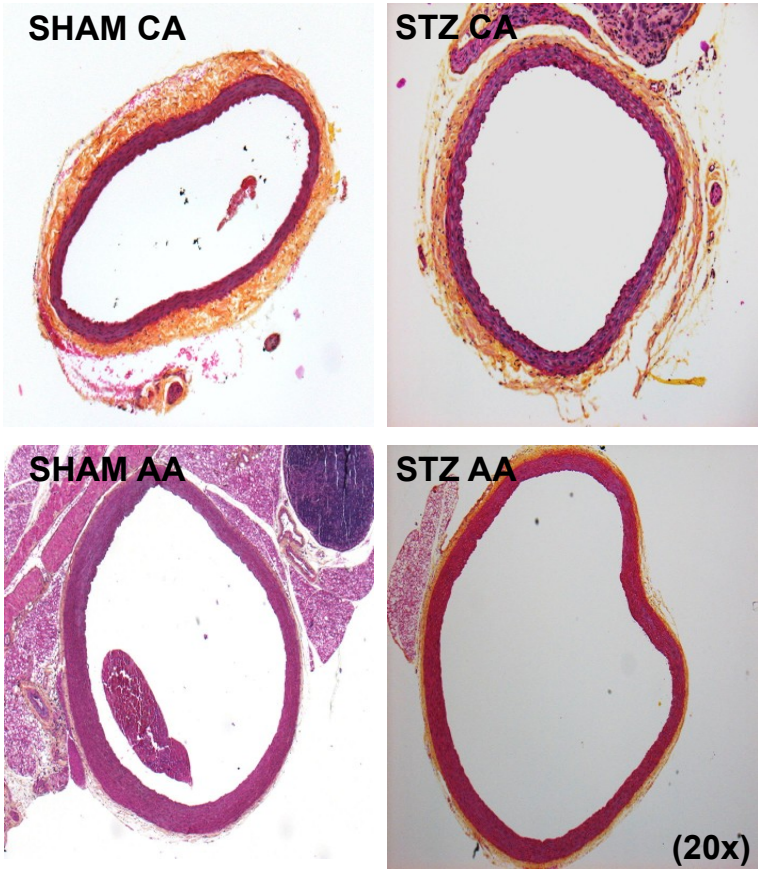
2.1.19 Supplemental Figure 1

Suppl Figure 1



2.1.20 Supplemental Figure 2

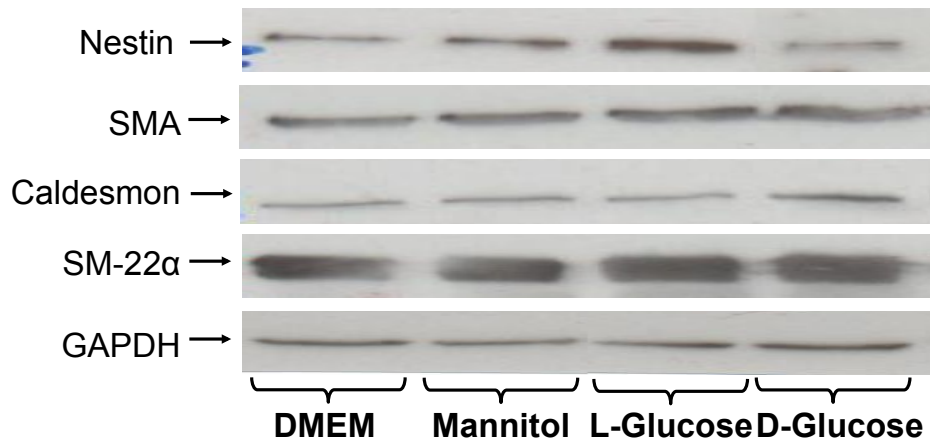
Suppl Figure 2



2.1.21 Supplemental Figure 3

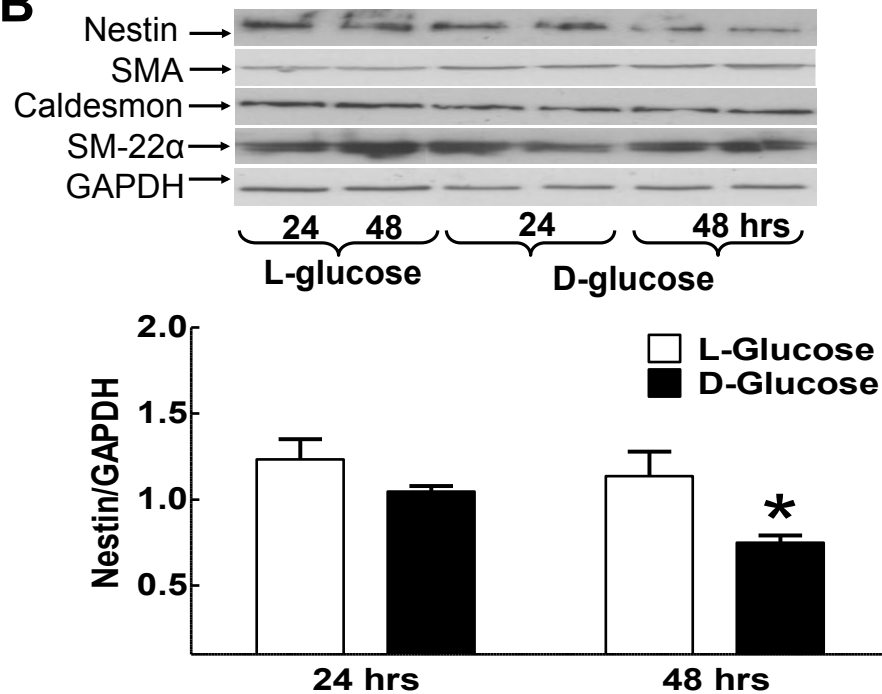
Suppl Figure 3

A

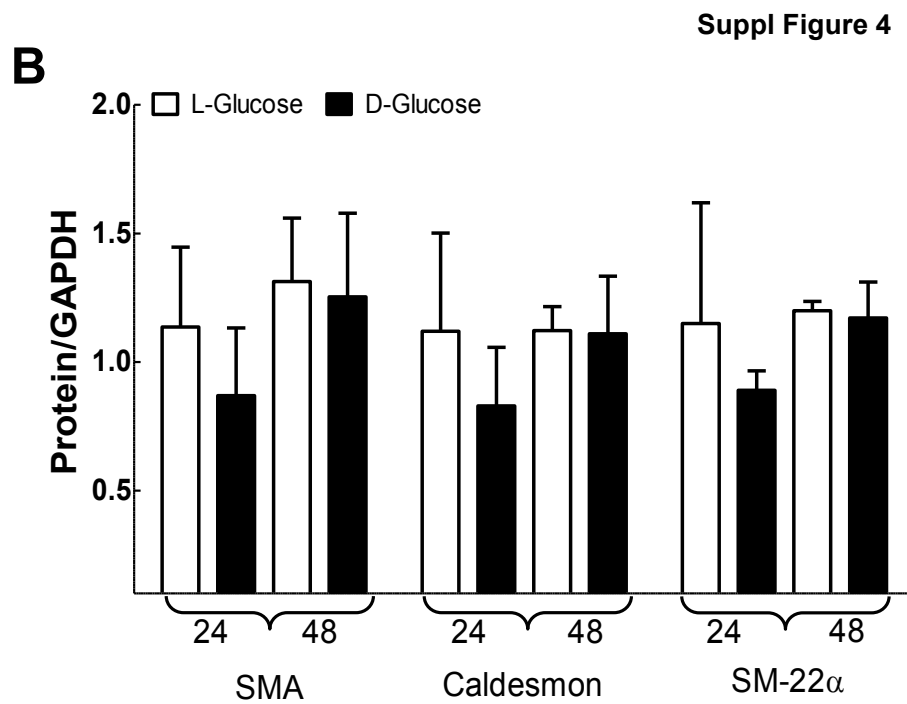
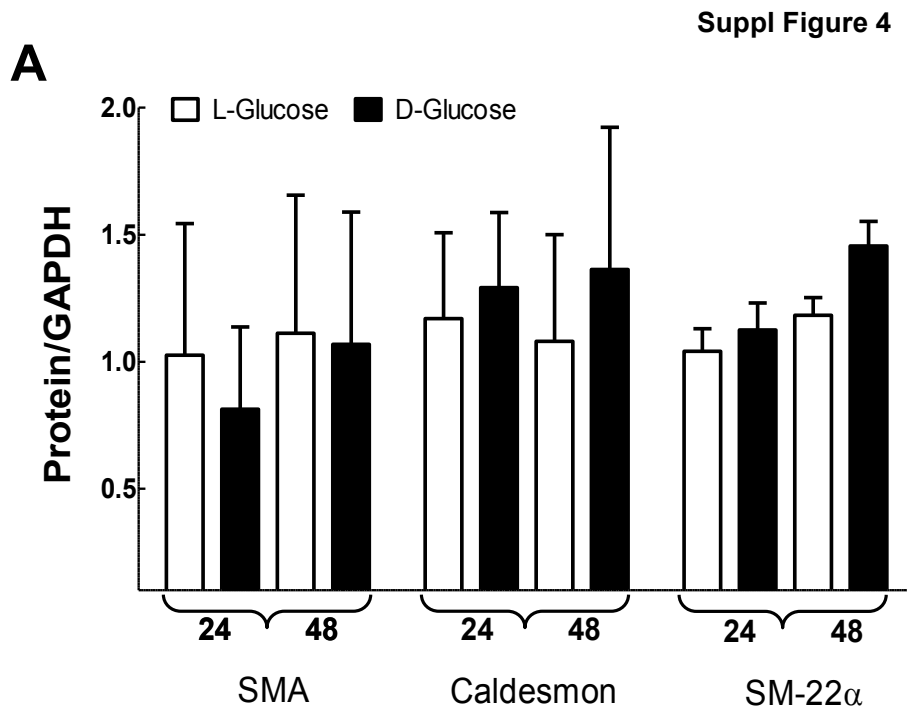


Suppl Figure 3

B



2.1.22 Supplemental Figure 4



2.2 Nestin upregulation characterizes rat carotid artery remodelling secondary to hypertension

Accepté dans American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.

Dear Dr. Calderone:

This is to acknowledge receipt of your revised manuscript, titled "Nestin upregulation characterizes vascular remodelling secondary to hypertension in the rat", H-00804-2014R1 to be considered for publication in American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.

If you have already returned the signed mandatory submission form, a duplicate is not necessary.

You will receive notification as soon as a decision has been reached concerning the suitability of this paper for publication.

Thank you for your interest in American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.

Regards,

Teki Bynum
Peer Review Coordinator
AJP- Heart and Circulatory and AiPS
9650 Rockville Pike
Bethesda, MD 20814
301-634-7247
301-634-7243 (FAX)

Nestin upregulation characterizes rat carotid artery remodelling secondary to hypertension

Kim Tardif, Vanessa Hertig, Natacha Duquette, Louis Villeneuve, Ismail El-Hamamsy,

Jean-François Tanguay and Angelino Calderone

Short Title: Nestin and carotid artery remodelling

Correspondence to Angelino Calderone, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330 ext. 3710. Fax: (514) 376-1355. E-mail:

2.2.1 Abstract

Proliferation and hypertrophy of vascular smooth muscle cells represent hallmark features of vessel remodelling secondary to hypertension. The intermediate filament protein nestin was recently identified in vascular smooth muscle cells and in other cell types directly participated in proliferation. The present study tested the hypothesis that vessel remodelling secondary to hypertension was characterized by nestin upregulation in vascular smooth muscle cells. Two weeks following suprarenal abdominal aorta constriction of adult male Sprague-Dawley rats, elevated mean arterial pressure increased the media area and thickness of the carotid artery and aorta and concomitantly upregulated nestin protein levels. In the normal adult rat carotid artery, nestin immunoreactivity was observed in a subpopulation of vascular smooth muscle cells and the density significantly increased following suprarenal abdominal aorta constriction. Filamentous nestin was detected in cultured rat carotid artery- and aortic-derived vascular smooth muscle cells and an analogous paradigm observed in human aortic-derived vascular smooth muscle cells. AII and EGF treatment of vascular smooth muscle cells stimulated DNA and protein synthesis and increased nestin protein levels. Lentiviral-shRNA mediated nestin depletion of carotid artery-derived vascular smooth muscle cells inhibited peptide growth factor stimulated DNA synthesis whereas protein synthesis remained intact. These data have demonstrated that vessel remodelling secondary to hypertension was characterized in part by nestin upregulation in vascular smooth muscle cells. The selective role of nestin in peptide growth factor stimulated DNA synthesis has revealed that the proliferative and hypertrophic response of vascular smooth muscle cells were mediated by divergent signalling events.

Key Words: Nestin ▪ carotid artery ▪ aorta ▪ hypertension ▪ vascular remodeling

2.2.2 Introduction

During the development of the central nervous system (CNS), a population of neuroepithelial stem cells was initially identified via expression of the intermediate filament protein nestin (8, 18). Nestin is a 240-kDa protein and member of the class VI family of intermediate filament proteins and in contrast to other classes, is unable to self-assemble and form homodimers because of a short N-terminus (37, 39). Therefore, nestin will form heterodimers with other intermediate filament proteins including vimentin and desmin (37). The promoter region upstream of exon 1 of the nestin gene does not contain any identifiable elements regulating expression. However, the nestin gene does contain regulatory elements in the various intron regions that drive expression in a cell-specific manner (37). In neural progenitor/stem cells, nestin expression is independently regulated by restricted enhancer elements identified in the 2nd intron (44). In humans, a highly conserved region that directs expression was also identified in the 2nd intron of the nestin gene (21). However, nestin expression driven by the 2nd intron was not limited to CNS-resident stem cells as a transgenic mouse containing the 5.8-kb fragment of the promoter region and the 1.8-kb fragment of the 2nd intron of the rat nestin gene linked to the reporter GFP identified progenitor/stem cell populations in the skin, skeletal muscle and heart (2, 5, 11, 12, 14, 23). Despite the plethora of data supporting the premise that nestin expression identified a stem cell phenotype, recent studies have detected the intermediate filament protein in numerous non-stem cell populations during physiological growth and pathological remodelling. Nestin was highly expressed in developing skeletal myofibres and downregulated following maturation, upregulated in endothelial cells during

reparative angiogenesis, induced in mesangial cells following injury and in scar myofibroblasts and cardiac myocyte-like cells bordering the peri-infarct/infarct region of the ischemically damaged rodent and human heart(1, 3, 4, 7, 9, 11, 24, 25, 31, 32). However, in contrast to neural progenitor/stem cells, expression of the intermediate filament protein in skeletal myofibres and endothelial cells was driven by the first intron of the nestin gene (1, 43, 44). Biologically, nestin expression was reported to play a seminal role in cell proliferation (4, 9, 37, 38).

Vascular remodelling is a hallmark feature of hypertension characterized in part by the proliferation and hypertrophy of vascular smooth muscle cells (13). A recent study reported that a subpopulation of vascular smooth muscle cells residing in the normal rat aorta expressed the intermediate filament protein nestin and was actively engaged in the cell cycle (27). Moreover, nestin upregulation was identified in newly formed blood vessels during physiological and pathological remodelling and increased expression observed during neointimal growth following balloon injury of the rat carotid artery (1, 11, 12, 24, 27). *In vitro* studies have further demonstrated that peptide growth factors implicated in vascular remodelling induced nestin expression in rat aortic vascular smooth muscle cells (16, 41). Based on these observations, nestin upregulation in vascular smooth muscle cells may represent an early event of vessel remodelling secondary to hypertension. Thus, the present study tested the hypothesis that nestin expression was increased during vessel remodelling following suprarenal abdominal aorta constriction of adult male Sprague-Dawley rats and the intermediate filament protein directly contributed to peptide growth factor stimulated vascular smooth muscle cell proliferation.

2.2.3 Methods

Animal Models

Suprarenal abdominal aorta constriction was performed on adult male Sprague-Dawley rats (9-11 weeks old; Charles Rivers, Canada), employing 21-gauge needle as previously described (26). Two weeks following surgery, mean arterial pressure and left ventricular function were determined (12). The heart, left common carotid artery and aorta were subsequently removed for analysis. The use and care of laboratory rats was according to the Canadian Council for Animal Care and approved by the Animal Care Committee of the Montreal Heart Institute.

Vessel Morphology and Collagen Content

Formalin fixed 6-8 μm thick sections of the left common carotid artery and aorta (aortic arch and thoracic region) were stained with haematoxylin-phloxin-saffron (HPS) and images captured with the Olympus QICAM colour video camera interfaced with an Olympus CKX41 microscope. Vessel wall morphology (media thickness, mm; media area, mm^2) was measured with Image-Pro (version 7, Media Cybernetics, Rockville, MD). HPS staining was also used to determine the number of vascular smooth muscle cell nuclei and density normalized to media area. Masson's trichrome staining measured intraluminal collagen accumulation in the carotid artery. The program Image-Pro calculated collagen content and the data normalized to the media area.

Rat Vascular Smooth Muscle Cells

The left common carotid artery or aortic arch of adult male Sprague-Dawley rats (9–11 weeks old) was cut longitudinally and the lumen gently rubbed with a cotton swab to remove the endothelium. Vessel segments (3-5 mm in length) were digested in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; low glucose; HyClone Laboratories, Logan, UT) containing collagenase (type II; 1 mg/ml) at 37°C for 5 hrs. Cells were filtered (40 µm nylon mesh; Corning, NY), cultured in DMEM supplemented with 10% FBS (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY), 2% penicillin-streptomycin, 1% fungizone, EGF (25 ng/ml), bFGF (10 ng/ml) and grown until confluent. Experiments were performed on 1st/2nd passage vascular smooth muscle cells plated at a density of 125-150 cells/mm² in DMEM-containing 10% fetal bovine serum (FBS) for 24 hours. Cells were subsequently washed and the media replaced with DMEM supplemented with insulin/transferrin/selenium (BD Bioscience, Bedford, MA) for 48 hrs. Vascular smooth muscle cells were treated for 24 hours with angiotensin II (AII; 10⁻⁶ M, Sigma), epidermal growth factor (EGF; 10 ng/ml, R&D Systems) transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁; 5 ng/ml, R&D Systems) or fetal bovine serum (FBS; 10%) to assess nestin expression, DNA and protein synthesis. Briefly, cells were treated for 24 hours with ³H-Leucine (2 µCi/ml; MP Biomedicals, Santa Ana, CA) or 4-6 hours prior to the end of stimulation with ³H-thymidine (1 µCi/ml; PerkinElmer, Waltham, Mass) to assess protein and DNA synthesis, respectively. Thereafter, cells were washed twice with cold PBS and 1 ml of cold 5% trichloroacetic acid was added for 30-60 min to precipitate protein or DNA. The precipitates were subsequently washed twice with cold water and re-suspended in

500 μ l of 0.4M NaOH. Aliquots were counted in a scintillation counter. In each experiment, data was the average of three to six independent wells.

Human Aortic Vascular Smooth Muscle Cells

The aorta was obtained from 2 non-diabetic non-hypertensive male patients (47 & 55 yrs old) undergoing the Ross procedure at the Montreal Heart Institute. The tissue was collected in Medium 199 (M199) (Gibco, Life technologies, Ontario, Canada) supplemented with penicillin/streptomycin (50 U of penicillin and 50 μ g of streptomycin; Gibco), fungizone (102.5 μ g/ml) (Gibco) and 10% FBS (Fisher Scientific, Ontario, Canada). Under sterile conditions, tissue was washed with phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco), the adventitia removed and the tunica media placed in a 50 ml tube containing 10 ml of a type II collagenase (220 U/mg; Gibco). Following collagenase treatment at 37°C for 2 hours, the non-digestible tissue was removed and 5 mL of M199 supplemented with penicillin/streptomycin, fungizone and 10% FBS was added and the tube centrifuged (3500 rpm, 5 min, 4°C). The pellet was resuspended in 2 mL of M199 supplemented with penicillin/streptomycin, fungizone and 10% FBS and the cells were plated in a T25 flask coated with 2% gelatin derived from bovine skin (Sigma, Missouri, USA) and placed in an incubator at 37°C with 5% CO₂. Following confluency, the cells were passaged and plated in a T75 flask coated with 2% gelatin and grown until confluent. Thereafter, cells were trypsinized and subsequently passaged in T75 flasks or plated in P6 plates coated with 2% gelatin and grown until 80% confluence in 10% FBS. Immunofluorescence was performed on 2nd/3rd passage cells and vascular smooth muscle cell lineage confirmed for each preparation.

Western Blot

Lysates (30-50 μ g) prepared from the left common carotid artery, aortic arch, or cultured vascular smooth muscle cells were subjected to SDS-polyacrylamide gel (10%) electrophoresis and transferred to a PVDF membrane (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA) (12). Antibodies used include mouse monoclonal anti-nestin (~240 kDa; 1:500; Chemicon, Temecula, CA), mouse monoclonal anti-eNOS (~130 kDa; 1:500; BD Bioscience, Mississauga, ON), goat monoclonal anti-CD31 (~130 kDa; 1:500; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA), rabbit polyclonal anti-caldesmon (~70 kDa; 1:2500; Abcam, Cambridge, MA), rabbit polyclonal anti-smooth muscle-22 α (~230 kDa; 1:5000; Abcam), rabbit polyclonal anti-smooth muscle α -actin (~43 kDa; 1:5000; Abcam), rabbit polyclonal anti-vimentin (~57 kDa 1:500; Abcam,), and a mouse monoclonal anti-GAPDH (~37 kDa; 1:50,000; Ambion, Austin TX). Following overnight incubation at 4°C, the appropriate secondary antibody-conjugated to horseradish peroxidase (1:20,000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) was added and bands visualized utilizing the ECL detection kit (Perkin Elmer). Films were scanned with Image J software® and the target protein signal was depicted as arbitrary light units normalized to GAPDH protein.

Immunofluorescence

Formalin fixed 6-8 μ m thick sections of the left common carotid artery were subjected to the

antigen retrieval method and stained with the mouse monoclonal anti-nestin (1:150; Chemicon), rabbit polyclonal anti-smooth muscle α -actin (1:100; Abcam) or goat monoclonal anti-CD31 (1:100; Santa Cruz Biotechnologies) (12). Rat (primary & 1st/2nd passage) and human vascular smooth muscle cells were plated on glass coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde and stained with the mouse monoclonal anti-nestin (1:500; Chemicon), mouse monoclonal anti-human nestin (1:500; Santa Cruz Biotechnologies), rabbit polyclonal anti-smooth muscle α -actin (1:200; Abcam), rabbit polyclonal anti-caldesmon (1:500; Abcam) or rabbit polyclonal anti-smooth muscle-22 α (1:1000; Abcam) (4, 12). The nucleus was identified with To-PRO-3 (InVitrogen; 1.5 μ M) or 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma; 1.5 μ M). Secondary antibodies used were a goat anti-mouse IgG conjugated-Alexa-555 (1:800; InVitrogen) or a goat anti-rabbit IgG conjugated-Alexa-647 (1:800; InVitrogen). Immunofluorescence was visualized using a confocal LSM710 Zeiss microscope with the Zeiss LSM Image Browser. The density of vascular smooth muscle cells expressing nestin was determined with maximum projections derived from a z-stack (voxel size of 143x143x250 nm in XYZ plane) and normalized to the vessel media area (μ m²; average of at least 3-4 distinct fields). Non-specific staining was determined following the addition of the conjugated secondary antibody alone.

Lentiviral Construct

The lentiviral construct containing the shRNA directed against nestin was prepared as previously described (4). The biological impact of the empty lentivirus and the lentivirus containing the shRNA directed against nestin was determined by measuring DNA and protein

synthesis of infected 1st/2nd passage carotid artery-derived VSMCs (4).

Statistics

Data are presented as the mean±S.E.M and (n) represents the number of rats or individual preparation of vascular smooth muscle cells used per experiment. Data was evaluated by a student's unpaired t-test or a one-way ANOVA (GraphPad InStat) and a significant difference determined by the Student Newman-Keuls Multiple Comparisons post-hoc test and a value of $P<0.05$ considered statistically significant. The magnitude of nestin and vimentin expression in the aortic arch of normal and suprarenal abdominal aorta constricted rats was variable and led to a significant difference between the standard deviations. Therefore, a non-parametric two-tailed t-test (GraphPad InStat) was performed and a value of $P<0.05$ considered statistically significant.

2.2.3 Results

Left Ventricular Contractility and Cardiovascular Remodelling of Suprarenal

Abdominal Aorta Constricted Rats

Two weeks following suprarenal abdominal aorta constriction of adult male Sprague-Dawley rats, mean arterial pressure (MAP), left ventricular systolic pressure (LVSP), the rate of left ventricular contraction (+dP/dT) and relaxation (-dP/dT) were significantly elevated as compared to sham (Table 1). Absolute left ventricular weight and following normalisation to body weight were increased after a greater afterload was imposed on the heart, whereas right ventricular weight remained unchanged (Table 2).

In the carotid artery of suprarenal abdominal aorta constricted rats, a hypertrophic response was evident as media area and thickness were significantly greater as compared to sham rats (Table 3). Remodelling of the carotid artery suprarenal abdominal aorta constricted rats was also attributed in part to vascular smooth muscle cell proliferation as the number of nuclei alone and subsequent normalisation to the media area were significantly increased as compared to sham rats (Table 3). A reactive fibrotic response was also prevalent as intraluminal collagen content (% collagen; excluding the adventitia and normalized to vessel wall area, mm²) was greater ($P < 0.05$ versus sham) in the carotid artery of suprarenal abdominal aorta constricted rats ($34 \pm 4\%$, n=8 rats) as compared to sham ($21 \pm 3\%$, n=5 rats). In the aortic arch and thoracic aorta of suprarenal abdominal aorta constricted rats, a

hypertrophic response was also identified as the media area and thickness were increased as compared to sham rats (Table 3). In addition, the total number of nuclei detected in the media of the aorta arch and thoracic aorta of banded rats was significantly elevated, indicative of a proliferative vascular smooth muscle cell response. However, following normalisation to the media area, the density of vascular smooth muscle cell nuclei in the aorta of banded rats was modestly lower as compared to sham rats (Table 3).

Nestin Expression in the Carotid Artery and Aortic Arch of Suprarenal Abdominal Aorta Constricted Rats

In a second independent population of suprarenal abdominal aorta constricted adult male Sprague-Dawley rats, left ventricular hypertrophy and contractility were significantly elevated as compared to sham (data not shown). Within the population of banded rats, the magnitude of nestin upregulation in the carotid artery was variable as compared to sham rats (Figure 1A). Despite the variability, an overall significant increase in nestin protein expression was observed in the carotid artery of suprarenal abdominal aorta constricted rats (n=8) as compared to sham rats (n=8) (Figures 1A & 1B). A further analysis revealed that the magnitude of nestin protein expression in the carotid artery of normal and suprarenal abdominal aorta constricted rats positively correlated with MAP and LVSP (Figures 1E & 1F). By contrast, eNOS and CD31 expression in the carotid artery of suprarenal abdominal aorta constricted rats (n=8) was similar to sham (n=8) (Figures 1A & 1B). Previous studies have reported that nestin was unable to self-assemble and form homodimers because of a short N-terminus (37). Therefore, depending on the cell type, nestin will form heterodimers with other

intermediate filament proteins including vimentin (37). Vimentin proteins levels were significantly increased in the carotid artery of suprarenal abdominal aorta constricted rats and a positive correlation was observed with MAP ($r^2=0.52$; $n=7$ for sham and banded rats) and LVSP ($r^2=0.53$) (Figures 1A & 1B). A second lower molecular weight band of vimentin was also detected and appeared predominantly in the carotid artery of banded rats (Figure 1A). Previous studies have detected the existence of multiple isoforms of vimentin and phosphorylation of the intermediate filament protein was also reported (20, 28, 34). It remains unknown if the lower molecular weight band detected in the present study represented an isoform or a dephosphorylated state of vimentin. Aortic remodelling secondary to suprarenal abdominal aorta constriction ($n=8$) was also associated with the concomitant upregulation of nestin and vimentin protein levels as compared to sham rats ($n=4$) (Figures 1C & 1D). However, nestin and vimentin protein expression in the aortic arch of sham and banded rats did not correlate with MAP (nestin, $r^2=0.001$; vimentin, $r^2=0.037$) or LVSP (nestin, $r^2=0.001$; vimentin, $r^2=0.045$).

An immunofluorescence approach revealed that a subpopulation of vascular smooth muscle cells in the carotid artery of normal adult rats was associated with nestin immunoreactivity (409 ± 105 cells/ mm^2 ; $n=4$ rats; Figure 2A) and modest diffused staining of the intermediate filament protein was also detected in endothelial cells. Nestin upregulation in the carotid artery of banded rats was attributed in part to the increased density of nestin-expressing vascular smooth muscle cells (720 ± 73 cells/ mm^2 ; $n=6$ rats; $P<0,05$ versus sham; Figures 2B & 2C). Nestin immunoreactivity of CD31⁽⁺⁾-endothelial cells persisted in the carotid artery of suprarenal abdominal aorta constricted rats (Figures 2B & 2C) and in all tissues examined staining intensity was greater than sham (Figure 2A).

Filamentous Nestin Detected in Rat and Human Cultured Vascular Smooth Muscle Cells and Induced by Peptide Growth Factors

A vascular smooth muscle cell phenotype was confirmed as carotid artery- and aortic-derived cells (n=3 independent preparations) co-expressed filamentous caldesmon and smooth muscle-22 α (Figure 2D and reference 36). Nestin-immunoreactive filaments were detected in a subpopulation of caldesmon⁽⁺⁾/smooth muscle-22 α ⁽⁺⁾ vascular smooth muscle cells (Figure 2D). Caldesmon and smooth muscle-22 α immunoreactivity was also detected in 2nd/3rd passage vascular smooth muscle cells isolated from the aorta of two patients and filamentous nestin staining was identified in a subpopulation of cells (Figure 2E).

Angiotensin II (AII) acting directly or indirectly via the paracrine release of peptide growth factors plays a seminal role in vascular remodeling (13,22,30,35,40). DNA synthesis, as measured by ³H-thymidine uptake was significantly increased following a 24 hr exposure of carotid artery- and aortic-derived vascular smooth muscle cells to AII (10⁻⁶ M), epidermal growth factor (EGF; 10 ng/ml) and fetal bovine serum (FBS; 10%), whereas ³H-thymidine uptake was reduced in response to transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1 ; 5 ng/ml) (n=4-6 independent preparations) (Figures 3A & 3C). ³H-Leucine uptake, an index of protein synthesis was significantly increased in carotid artery- and aortic-derived vascular smooth muscle cells following a 24 hr exposure to the panel of peptide growth factors (Figures 3B & 3D). In parallel, a 24 hr exposure of carotid artery- and aortic-derived vascular smooth muscle cells to AII, EGF and TGF- β_1 (Figures 3E-3H) significantly increased nestin protein levels as compared to untreated cells (n=4-6 independent preparations). By contrast, vimentin, smooth

muscle α -actin, caldesmon and smooth muscle 22α expression remained unchanged following exposure of vascular smooth muscle cells to AII, EGF and TGF- β_1 (Figures 3E-3H).

The Role of Nestin in DNA and Protein synthesis in Carotid Artery-Derived Vascular Smooth Muscle Cells

Filamentous nestin was detected in the majority of carotid artery-derived vascular smooth muscle cells infected with the empty lentivirus (Figure 4A). By contrast, the infection of carotid artery-derived vascular smooth muscle cells with a lentivirus containing a shRNA directed exclusively against nestin (n=4 independent preparations) significantly reduced expression of the intermediate filament protein, as compared to cells infected with the empty lentivirus (n=4 independent preparations) (Figures 4A & 4B). The expression of lineage specific markers in nestin-depleted cells was similar to carotid artery-derived vascular smooth muscle cells infected with the empty lentivirus (Figure 4B). Basal DNA synthesis, as measured by ^3H -thymidine uptake was significantly reduced in nestin-depleted carotid artery-derived vascular smooth muscle cells ($12,500 \pm 2310$ cpm; n=4 independent preparations; $P < 0.05$ versus empty lentivirus) as compared to cells infected with the empty lentivirus ($21,141 \pm 1789$ cpm; n=4 independent preparations). Furthermore, ^3H -thymidine uptake in response to AII (10^{-6} M) and EGF (10 ng/ml) was significantly attenuated in nestin-depleted cells (Figure 4C). Basal protein synthesis, measured by ^3H -leucine uptake was reduced in nestin-depleted carotid artery-derived vascular smooth muscle cells (2017 ± 422 cpm; n=4 independent preparations; $P < 0.05$ versus empty lentivirus) as compared to cells infected with the empty lentivirus (3280 ± 210 cpm; n=4 independent preparations). However, AII and EGF

stimulated ^3H -leucine uptake in nestin-depleted cells was similar to carotid artery-derived vascular smooth muscle cells infected with the empty lentivirus (Figure 4D).

2.2.4 Discussion

Vessel remodelling secondary to hypertension was characterized by vascular smooth muscle cell hypertrophy, proliferation and reactive fibrosis leading to increased arterial wall stiffness and worsening of vascular tone (6, 13). An analogous paradigm of vessel remodelling was observed in suprarenal abdominal aorta constricted adult male Sprague-Dawley rats. Two weeks following banding, carotid artery remodelling was evident as media area, thickness and intraluminal collagen deposition were increased in banded rats. Furthermore, the number of vascular smooth muscle cell nuclei alone and density following normalisation to the media area were also elevated in the carotid artery of suprarenal banded rats supporting the premise that proliferation significantly contributed to vessel remodelling. Analogous to the carotid artery, media area and thickness were increased in the aortic arch and thoracic region of suprarenal abdominal aorta constricted rats. The number of vascular smooth muscle cell nuclei in the aortic arch and thoracic region was also significantly elevated in banded versus sham rats. However, following normalisation to the media area, the density of vascular smooth muscle cell nuclei in the aortic arch and thoracic region was modestly lower as compared to sham rats. Therefore, despite the presence of a proliferative response, vascular smooth muscle cell hypertrophy was the predominant adaptive event of the aorta during the early phase of remodelling secondary to suprarenal abdominal aorta constriction.

Previous studies have reported nestin upregulation in newly formed blood vessels during physiological and pathological remodelling (1,11,12,24). Likewise, neointimal growth following balloon injury of the rat carotid artery was associated with nestin expression (27).

Consistent with its role in vascular remodelling, the present study has demonstrated that nestin protein levels were upregulated in the carotid artery and aortic arch following suprarenal abdominal aorta constriction of adult male Sprague-Dawley rats and attributed in part to the increased density of vascular smooth muscle cells expressing the intermediate filament protein. Furthermore, the magnitude of nestin expression in the carotid artery alone positively correlated with the rise of MAP and LVSP. As previously discussed, nestin is unable to self-assemble and form homodimers because of a short N-terminus (37). Thus, nestin will form heterodimers with other intermediate filament proteins including vimentin (37). Consistent with this premise, vimentin protein levels were significantly increased in the carotid artery and aortic arch of suprarenal abdominal aorta constricted rats and a positive correlation observed between the magnitude of expression and MAP and LVSP in the carotid artery alone. Thus, since vimentin expression was reported in endothelial and vascular smooth muscle cells, both cell types may have contributed to the reported upregulation in the vasculature of banded rats (15,19).

In experimental models of hypertension including suprarenal abdominal aorta constriction, AII acting directly and/or indirectly via the synthesis of peptide growth factors EGF and TGF- β significantly influenced vascular and cardiac remodelling (10,22,29,30,33,35,40). Based on these observations, *in vitro* experiments were performed to assess the impact of AII, EGF and TGF- β_1 on nestin expression in cultured vascular smooth muscle cells. The intermediate filament protein nestin was detected in a subpopulation of carotid artery- and aortic-derived vascular smooth muscle cells expressing lineage specific markers (36). Likewise, human aortic vascular smooth muscle characterized by caldesmon and smooth muscle-22 α immunoreactivity co-expressed filamentous nestin. The 24 hr

exposure of rat carotid artery- and aortic-derived vascular smooth muscle cells to AII and EGF significantly increased ^3H -thymidine and ^3H -leucine uptake. By contrast, TGF- β_1 stimulation of vascular smooth muscle cells reduced ^3H -thymidine uptake but concomitantly increased protein synthesis. Despite the dissimilar growth response, the exposure of vascular smooth muscle cells to AII, EGF and TGF- β_1 significantly increased nestin protein levels, whereas the expression of vimentin and lineage specific markers remained unchanged. The disparate action on DNA synthesis and nestin expression suggested that upregulation of the intermediate filament protein was insufficient to promote entry into the cell cycle in response to TGF- β_1 . Thus, one or more of the myriad signalling events recruited by TGF- β_1 may have suppressed a downstream target of nestin required for DNA synthesis (42). Nonetheless, the in vitro data suggests that nestin upregulation in the vasculature of suprarenal abdominal aorta constricted rats may have occurred in part via AII acting directly and/or in a concerted fashion via the synthesis and release of EGF and TGF- β_1 . The contrasting pattern of vimentin and nestin expression in cultured vascular smooth muscle cells further suggested that the upregulation of the two intermediate filament proteins in the vasculature of banded rats was mediated in part by distinct biological events. Lastly, the detection of filamentous nestin in human aortic vascular smooth muscle cells supports the premise that increased expression of the intermediate filament protein may also represent a phenotypic event of pathological vascular remodelling in hypertensive patients.

In several distinct cell types, nestin expression correlated with an increased proliferative response (4, 9, 37, 38). Nestin was also detected in a diverse range of cancers, directly implicated in proliferation and expression in several tumours strongly correlated with poor prognosis (17). In the vasculature of the adult rat, two recent studies reported that nestin

expression in a subpopulation of vascular smooth muscle cells correlated with cell cycle entry (27, 36). Thus, the reported increase in the number of vascular smooth muscle cell nuclei in the carotid artery and aorta of suprarenal abdominal aorta constricted rats may have been attributed in part to the upregulation of nestin and subsequent re-entry into the cell cycle. Unfortunately an *in vivo* transgenic approach to selectively deplete nestin in vascular smooth muscles cells does not presently exist. However, an *in vitro* approach to directly address the role of nestin in the re-entry of vascular smooth muscle cells into the cell cycle was feasible and involved the use of a lentivirus containing a shRNA that selectively targeted the intermediate filament protein. As compared to nestin-expressing carotid artery-derived vascular smooth muscle cells, the basal uptake of ³H-thymidine and AII and EGF stimulated DNA synthesis were significantly attenuated in nestin-depleted cells. Thus, the established proliferative role of nestin was consistent with the increased density of vascular smooth muscle cell nuclei and concomitant greater density of nestin-expressing vascular smooth muscle cells in rats subjected to suprarenal abdominal aorta constriction. By contrast, AII and EGF mediated ³H-leucine uptake in nestin-depleted vascular smooth muscle cells was equivalent to nestin-expressing cells. These data suggest that the hypertrophic component of vascular remodeling in suprarenal abdominal aorta constricted rats was not directly dependent on nestin upregulation. Lastly, the apparent greater staining intensity of nestin in endothelial cells of banded rats may likewise provide a proliferative advantage during vascular remodeling (1,17,24).

Vessel remodelling is the end of result of established hypertension. The present study has demonstrated that the increased density of a subpopulation of nestin-expressing vascular smooth muscle cells was associated with significant vessel remodelling (e.g. hypertrophy,

proliferation and fibrosis) in the hypertensive rat secondary to suprarenal abdominal aorta constriction. Moreover, the magnitude of nestin expression in the carotid artery of banded rats significantly correlated with the rise of mean arterial pressure. Lastly, the seminal contribution of nestin to vascular smooth muscle cell proliferation in response to a variety of peptide growth factors supports the premise that upregulation of the intermediate filament protein may represent an incipient event of vessel remodelling secondary to hypertension.

Acknowledgments

Marie-Élaine Clavet and Amelie Bourget for technical assistance and France Thériault for excellent secretarial assistance.

Sources of Funding

Heart and Stroke Foundation of Canada/Quebec (G-11-CA-4771); Canadian Diabetes Association (OG-3-11-3267-AC).

Disclosures

None.

2.2.5 References

1. **Aihara M, Sugawara K, Torii S, Hosaka M, Kurihara H, Saito N, Takeuchi T.** Angiogenic endothelium-specific nestin expression is enhanced by the first intron of the nestin gene. *Lab Invest* 84: 1581-1592, 2004.
2. **Amoh Y, Li L, Yang M, Moossa AR, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM.** Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. *Proc Natl Acad Sci* 101: 13291-13295, 2004.
3. **Béguin PC, El-Helou V, Assimakopoulos J, Clement R, Gosselin H, Brugada R, Villeneuve L, Rohlicek CV, Del Duca D, Lapointe N, Rouleau JL, Calderone A.** The phenotype and potential origin of nestin⁽⁺⁾ cardiac myocyte-like cells following infarction. *J Appl Physiol* 107: 1241-1248, 2009.
4. **Béguin P, Gosselin H, Mamarbachi M, Calderone A.** Nestin expression is lost in ventricular fibroblasts during postnatal development of the rat heart and re-expressed in scar myofibroblasts. *J Cell Physiol* 227: 813-820, 2012.
5. **Birbrair A, Wang Z-M, Messi ML, Enikolopov GN, Delbono O.** Nestin-GFP transgene reveals neural precursor cells in adult skeletal muscle. *PLoS One* 6: e16816, 2011.
- 6- **Brionesa AM, Arribasb SM, Salaices M.** Role of extracellular matrix in vascular remodelling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19: 187-194, 2010.

7. **Carlsson L, Li Z, Paulin D, Thornell LE.** Nestin is expressed during development and in myotendinous and neuromuscular junctions in wild type and desmin knock-out mice. *Exp Cell Res* 251: 213-223, 1999.
8. **Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, Lendahl U.** Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J Cell Sci* 103: 589-597, 1992.
9. **Daniel C, Albrecht H, Ludke A, Hugo C.** Nestin expression in repopulating mesangial cells promotes their proliferation. *Lab Invest* 88: 387-397, 2008.
10. **Dostal DE, Baker KM.** Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart. Mediation by the AT1 receptor. *Am J Hypertens* 5: 276-280, 1992.
11. **El-Helou V, Beguin PC, Assimakopoulos J, Clement R, Gosselin H, Brugada R, Aumont A, Biernaskie J, Villeneuve L, Leung TK, Fernandes KJ, Calderone A.** The rat heart contains a neural stem cell population; role in sympathetic sprouting and angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 45: 694-702, 2008.
12. **El-Helou V, Chabot A, Gosselin H, Villeneuve L, Clavet-Lanthier ME, Tanguay JF, Enikolopov G, Fernandes Karl, Jasmin JF, Calderone A.** Cardiac nestin⁽⁺⁾ cells participate in reparative vascularisation. *J Cell Physiol* 228: 1844-1853, 2013.
13. **Feihl F, Liaudet L, Levy BI, Waeber B.** Hypertension and microvascular remodelling. *Cardiovas Res* 78: 274-285, 2008.
14. **Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabé-Heider F, Biernaskie J, Junek A, Kobayashi NR, Toma JG, Kaplan DR, Labosky PA, Rafuse V, Hui CC, Miller FD.** A dermal niche for skin-derived precursor cells. *Nature Cell Biol* 6: 1082-1093, 2004.

15. **Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, de CC, Vandekerckhove J, Weber K, Franke WW.** Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:298–302, 1981
16. **Huang Y-L, Shi G-Y, Lee H, Jiang M, Huang B-M, Wu H-L, Yang H-Y.** Thrombin induces nestin expression via the transactivation of EGFR signalling in rat vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* 21: 954-968, 2009.
17. **Ishiwata T, Matsuda Y, Naito Z.** Nestin in gastrointestinal and other cancers: Effects on cells and tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 17: 409-418, 2011.
18. **Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD.** CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 23: 585-595, 1990.
19. **Liu T, Guevara OE, Warburton RR, Hill NS, Gaestel M, Kayyali US.** Regulation of vimentin intermediate filaments in endothelial cells by hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C363-373, 2010
20. **Liu T, Ghamloush MM, Aldawood A, Warburton R, Toksoz D, Hill NS, Tang DD, Kayyali US.** Modulating endothelial barrier function by targeting vimentin phosphorylation. *J Cell Physiol* 229: 1484-1493, 2014.
21. **Lothian C, Prakash N, Lendahl U, Wahlström GM.** Identification of both general and region-specific embryonic CNS enhancer elements in the nestin promoter. *Exp Cell Res* 248: 509-519, 1999.
22. **Lu X, Choy JS, Zhang Z, Wassall CD, Guo X, Kemple MD, Kassab GS.** Effects of local mechanical stimulation on coronary artery endothelial function and angiotensin II type I receptor in pressure or flow-overload. *J Hypertens* 4: 720-729, 2013.

23. **Mignone JL, Kukekov V, Chiang A, Steindler D, Enikolopov G.** Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J Comp Neurol* 469: 311-324, 2004.
24. **Mokry J, Cízková D, Filip S, Ehrmann J, Österreicher J, Kolár Z, English D.** Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Develop* 13: 658-664, 2004.
25. **Mokry J, Pudil R, Ehrmann J, CizkovaD, Osterreicher J, Filip S, Kolar Z.** Re-expression of nestin in the myocardium of postinfarcted patients. *Virchows Arch* 453: 33-41, 2008.
26. **Morkin E, Ashford TP.** Myocardial DNA synthesis in experimental cardiac hypertrophy. *Am J Physiol* 215: 1409-1413, 1968.
27. **Oikawa H, Hayashi K, Maesawa C, Masuda T, Sobue K.** Expression profiles of nestin in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* 316: 940-950, 2010.
28. **Perlson E, Hanz S, Ben-Yaakov K, Segal-Ruder Y, Seger R, Fainzilber M.** Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* 45: 715-726, 2005.
29. **Regan CP, Anderson PG, Bishop SP, Berecek KH.** Pressure-independent effects of AT1-receptor antagonism on cardiovascular remodelling in aortic-banded rats. *Am J Physiol* 272: H2131-2138, 1997.
30. **Satoh C, Fukuda N, Hu WY, Nakayama M, Kishioka H, Kanmatsuse K.** Role of endogenous angiotensin II in the increased expression of growth factors in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 37: 108-118, 2001.

31. **Scobioala S, Klocke R, Kuhlmann M, Tian W, Hasib L, Milting H, Koenig S, Stelljes M, El-Banayosy A, Tenderich G, Michel G, Breithardt G, Nikol S.** Up-regulation of nestin in the infarcted myocardium potentially indicates differentiation of resident cardiac stem cells into various lineages including cardiomyocytes. *FASEB J* 22: 1021-1031, 2008.
32. **Sejersen T, Lendahl U.** Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J Cell Sci* 106: 1291-1300, 1993.
33. **Stanley AG, Patel H, Knight AL, Williams B.** Mechanical strain-induced human vascular matrix synthesis: the role of angiotensin II. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1: 32-35, 2000.
34. **Stephens AN, Hannan NJ, Rainczuk A, Meehan KL, Chen J, Nicholls PK, Rombauts LJF, Stanton PG, Robertson DM, Salamonsen LA.** Post-translational modifications and protein-specific isoforms in endometriosis revealed by 2D DIGE. *J Proteome Res* 9: 2438-2449, 2010.
35. **Stouffer GA, Owens GK.** Angiotensin II-induced mitogenesis of spontaneously hypertensive rat-derived cultured smooth muscle cells is dependent on autocrine production of transforming growth factor-beta. *Circ Res* 70: 820-828, 1992.
36. **Tardif K, Hertig V, Dumais C, Villeneuve L, Perrault L, Tanguay JF, Calderone A.** Nestin downregulation in rat vascular smooth muscle cells represents an early marker of vascular disease in experimental type I diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 13: 119, 2014.
37. **Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM.** Nestin expression-a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61: 2510-2522, 2004.

38. **Xue X-J, Yuan X-J.** Nestin is essential for mitogen-stimulated proliferation of neural progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 45: 26-36, 2010.
39. **Yang J, Cheng L, Yan Y, Bian W, Tomooka Y, Shiurba R, Jing N.** Mouse nestin cDNA cloning and protein expression in the cytoskeleton of transfected cells. *Biochim Biophys Acta* 1520: 251-254, 2001.
40. **Yang X, Zhu MJ, Sreejayan N, Ren J, Du M.** Angiotensin II promotes smooth muscle cell proliferation and migration through release of heparin-binding epidermal growth factor and activation of EGF-receptor pathway. *Mol Cells* 20:263-270, 2005.
41. **Yuan Huang Y-L, Shi G-Y, Jiang M-J, Lee H, Chou Y-W, Wu H-L, Yang H-Y.** Epidermal growth factor up-regulates the expression of nestin through the Ras-Raf-ERK signaling axis in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 361–366, 2008.
42. **Zarzynska JM.** Two faces of TGF-beta1 in breast cancer. *Mediators Inflamm* 2014: 1-16, 2014.
43. **Zhong H, Jin Z, Chen Y, Zhang T, Bian W, Cui X, Jing N.** First intron of nestin gene regulates its expression during C2C12 myoblast differentiation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40: 526-532, 2008.
44. **Zimmerman L, Parr B, Lenfahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vassileva G, McMahon A.** Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12: 11-24, 1994.

2.2.6 Figure Legends

Figure 1. Nestin Protein Expression in the Vasculature of Suprarenal Abdominal Aorta Constricted Adult Male Rats. Nestin and vimentin protein levels were increased in the carotid artery (**Panels A & B**) and aortic arch (**Panels C & D**) of suprarenal abdominal aorta constricted (SAC) rats, whereas CD31 and eNOS expression remained unchanged. (**Panels E & F**) Nestin protein expression in the carotid artery of sham (filled circles) and suprarenal abdominal aorta constricted (SAC; open circles) rats correlated with mean arterial pressure and left ventricular systolic pressure. Protein expression was normalized to GAPDH, n=7-8 sham rats, n=7-8 banded rats and (*) denotes $P < 0.05$ versus sham

Figure 2. Nestin Expression in the Rat Vasculature and in Isolated Rat and Human Vascular Smooth Muscle Cells. (**Panel A**) In the carotid artery of normal adult rats, nestin immunoreactivity (red fluorescence) was detected in a subpopulation of smooth muscle α -actin (SMA)-immunoreactive (green fluorescence) vascular smooth muscle cells. In addition, weak and diffused nestin staining was observed in endothelial cells lacking SMA immunoreactivity. (**Panel B**). In the carotid artery of suprarenal abdominal aorta constricted rats, nestin (red fluorescence) staining was detected in SMA-immunoreactive (green fluorescence) vascular smooth muscles and density was greater as compared to sham rats (please see Results). Furthermore, as compared to sham rats (depicted in Panel A), nestin staining of endothelial cells was greater in banded rats. (**Panel C**). In the carotid artery of suprarenal abdominal aorta constricted rats, nestin (red fluorescence) staining of endothelial

cells was confirmed with CD31 (green fluorescence) co-immunoreactivity and the signal was greater as compared to sham rats (depicted in Panel A). Furthermore, nestin staining was detected in vascular smooth muscle cells lacking CD31 immunoreactivity. In each figure, the arrow indicates the luminal side and the nucleus identified by DAPI (blue fluorescence). **(Panel D)** In rat carotid artery-derived vascular smooth muscle cells, filamentous nestin staining was detected in caldesmon and smooth muscle-22 α expressing. **(Panel E)** A subpopulation of human aortic-derived vascular smooth muscle cells characterized by caldesmon and smooth muscle-22 α expression was associated with filamentous nestin. The nucleus was identified by To-PRO-3 (blue fluorescence).

Figure 3. Peptide Growth Factor Mediated DNA and Protein Synthesis and Nestin Expression in Rat Carotid Artery- and Aortic Arch-Derived Vascular Smooth Muscle Cells. The 24 hr exposure of carotid artery- (**Panels A & B**) and aortic-derived (**Panels C & D**) vascular smooth muscle cells to angiotensin II (AII;10⁻⁶ M), epidermal growth factor (EGF;10 ng/ml) or fetal bovine serum (FBS;10%) significantly increased ³H-thymidine and ³H-leucine uptake. Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1 ;5 ng/ml) treatment reduced ³H-thymidine uptake but concomitantly increased ³H-leucine uptake. (**Panels E & F**) The 24 hr exposure of carotid artery-derived vascular smooth muscle cells to AII, EGF or TGF- β_1 upregulated nestin protein levels whereas smooth muscle α -actin (SMA), caldesmon (Caldes), smooth muscle-22 α (SM-22 α) and vimentin expression remained unchanged. (**Panels G & H**) The 24-hr exposure of aortic-derived vascular smooth muscle cells to AII, EGF or TGF- β_1 upregulated nestin protein levels whereas and vimentin expression remained unchanged.

Protein expression was normalized to GAPDH, n=4-6 independent preparations and (*) denotes $P<0.05$ versus untreated cells.

Figure 4. Rat Carotid Artery-Derived Vascular Smooth Muscle Cells Depleted of Nestin and Subsequent Impact on DNA and Protein Synthesis. (Panel A) (Empty) Filamentous nestin staining was detected in the majority of vascular smooth muscle cells infected with the empty lentivirus. (shRNA) The infection of vascular smooth muscle cells with a lentivirus containing a shRNA directed against nestin markedly reduced expression of the intermediate filament protein. The nucleus was identified by To-PRO-3 (blue fluorescence) (Panel B) Carotid artery-derived vascular smooth muscle cells infected with a lentivirus containing a shRNA directed against nestin significantly reduced protein expression whereas smooth muscle α -actin (SMA), caldesmon and smooth muscle-22 α (SM-22 α) protein levels were unaffected as compared to cells infected with an empty lentivirus. Protein expression was normalized to GAPDH, n=4 independent preparations and (*) denotes $P<0.05$ versus cells infected with the empty lentivirus. (Panels C & D) In nestin-depleted vascular smooth muscle cells, peptide growth factor-stimulated ^3H -thymidine uptake was attenuated whereas ^3H -leucine uptake was equivalent to nestin-expressing vascular smooth muscle cells. N=4 independent preparations and (*) denotes $P<0.05$ versus cells infected with the empty lentivirus.

2.2.7 Figure 1

Figure 1A

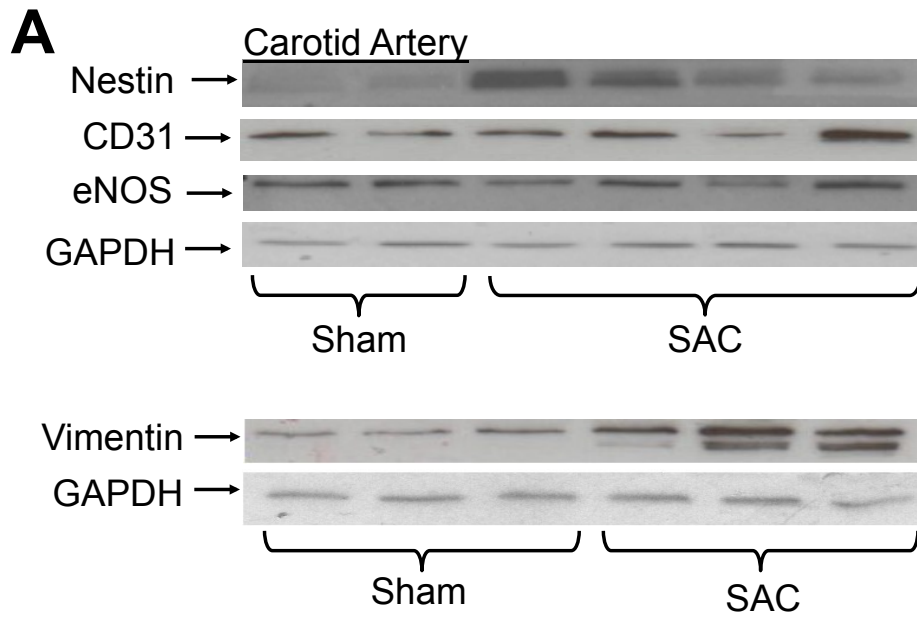


Figure 1B

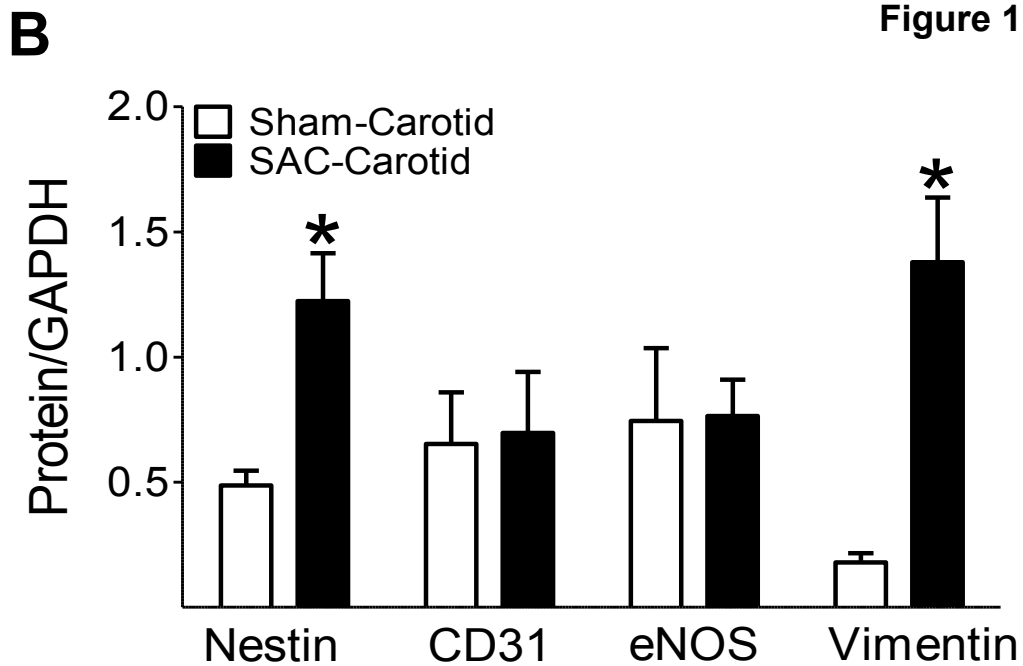


Figure 1C

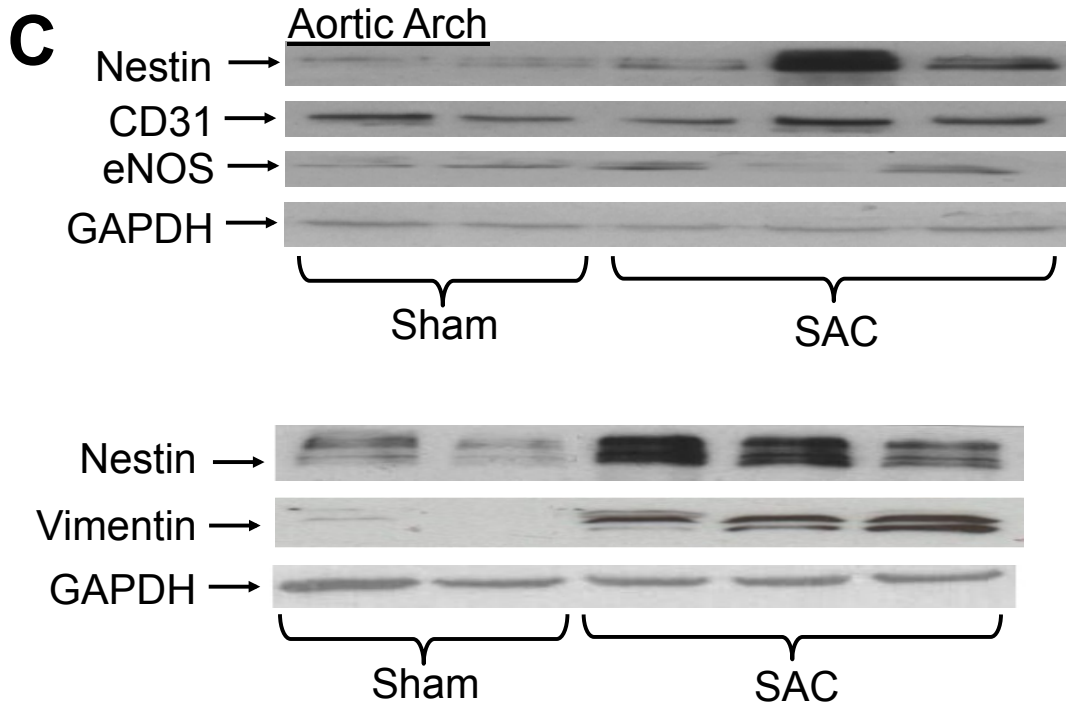
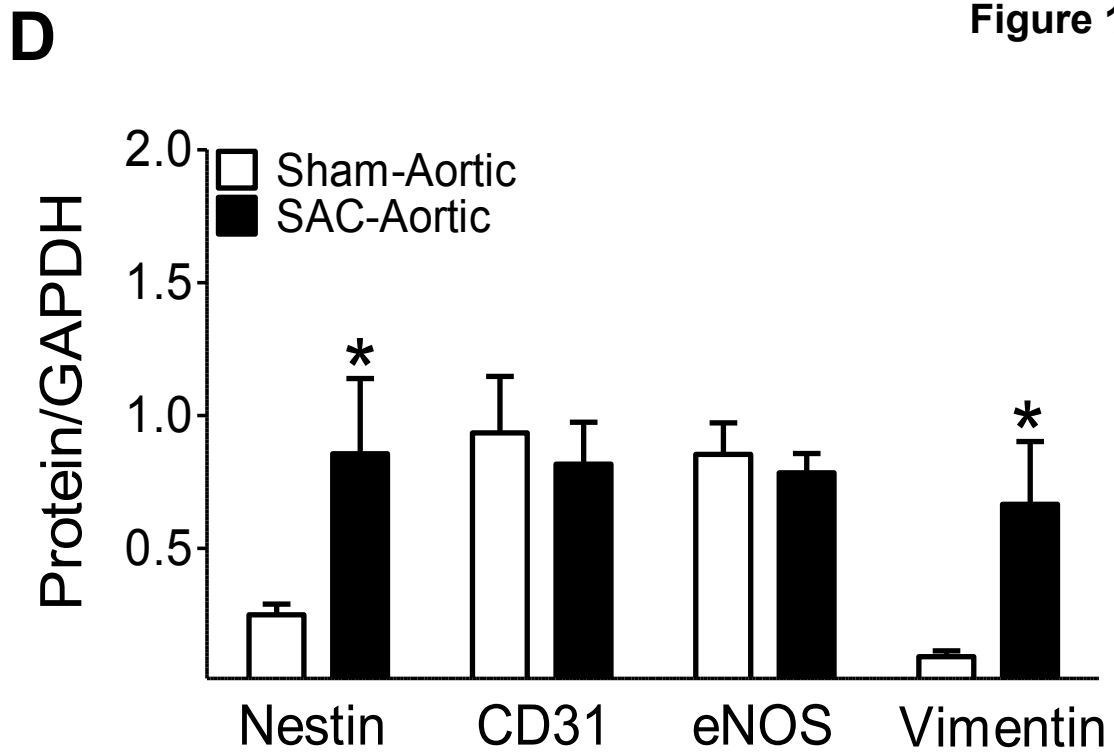
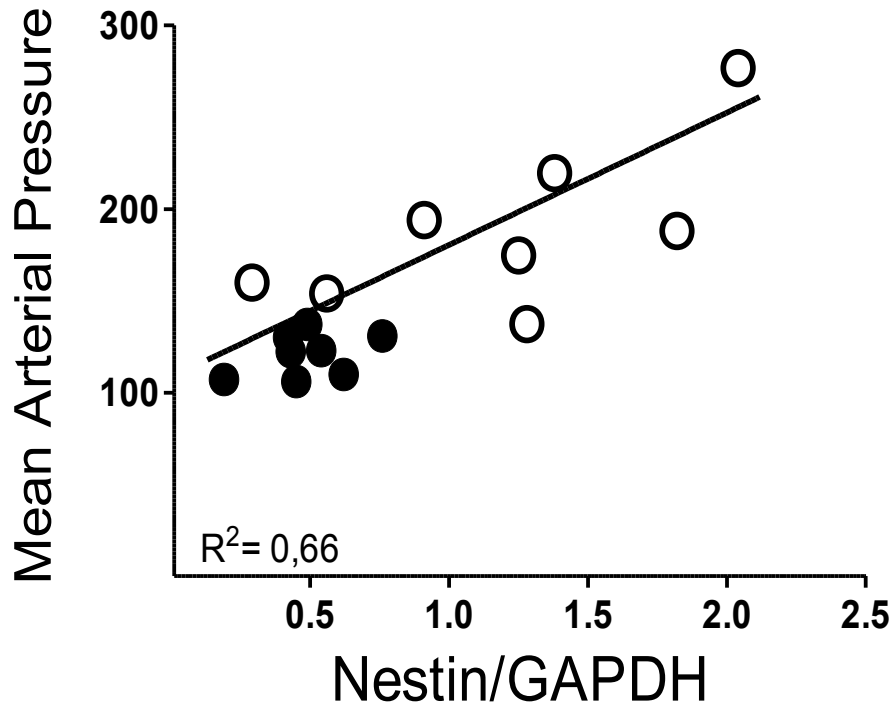
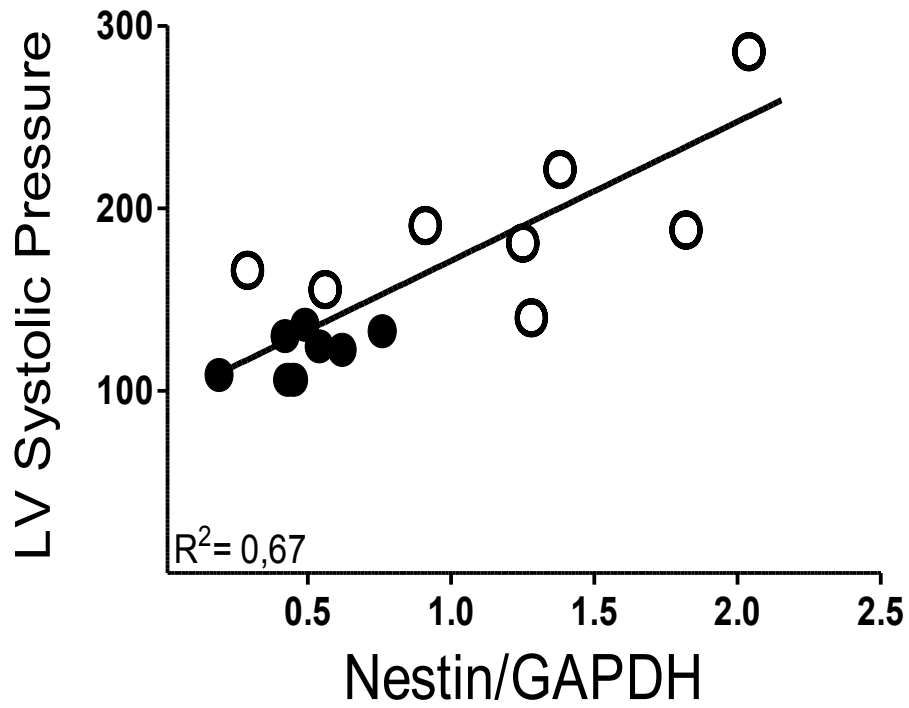


Figure 1D



E**Figure 1E****F****Figure 1F**

2.2.8 Figure 2

Figure 2A

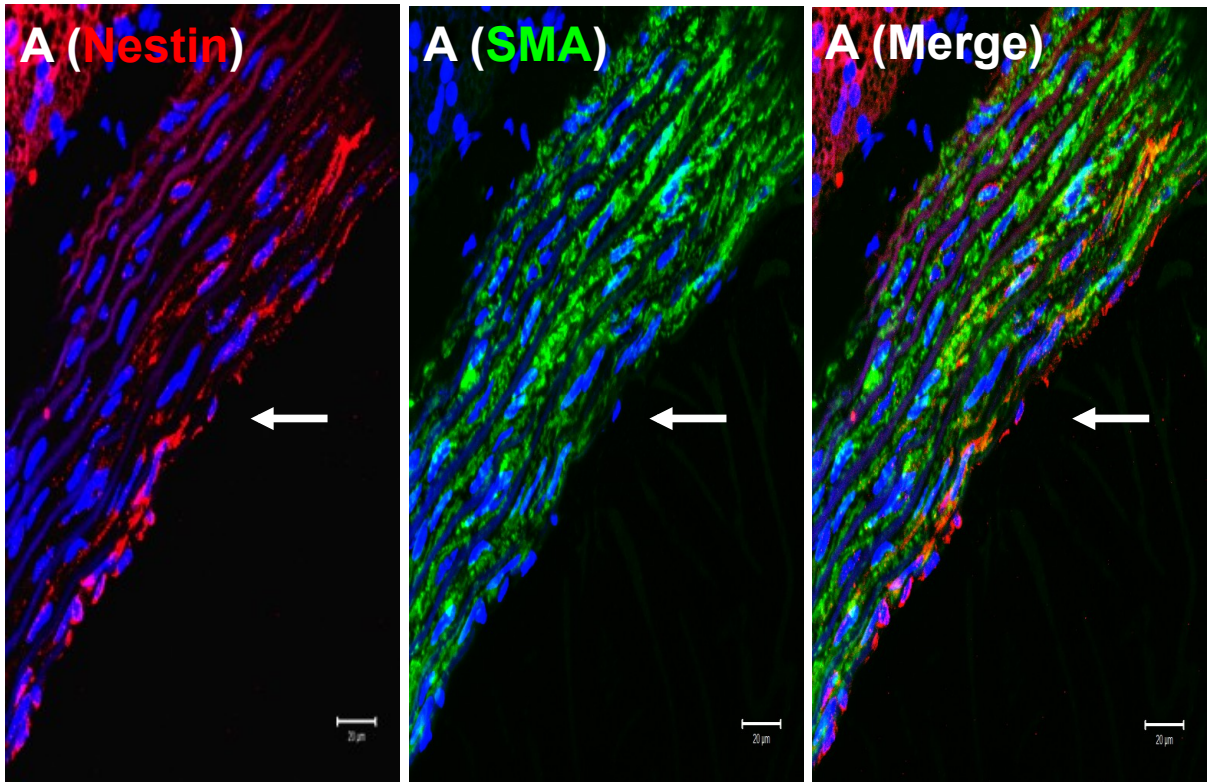


Figure 2B

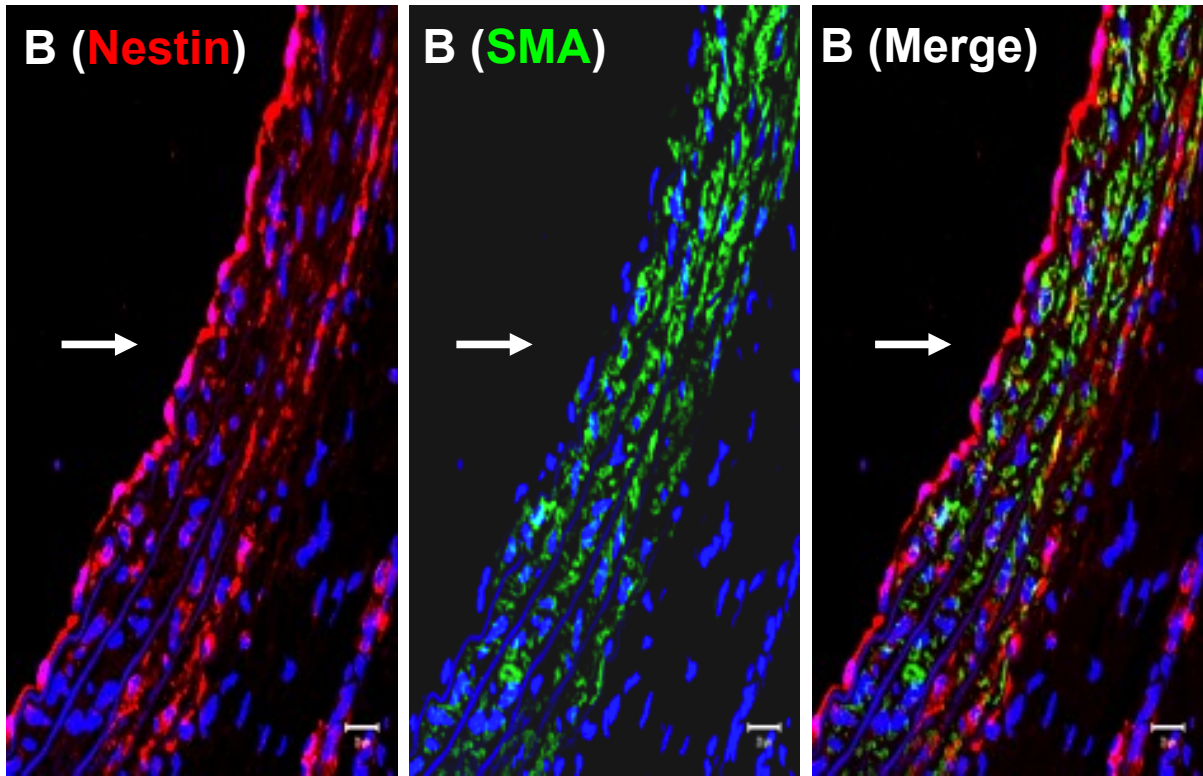


Figure 2C

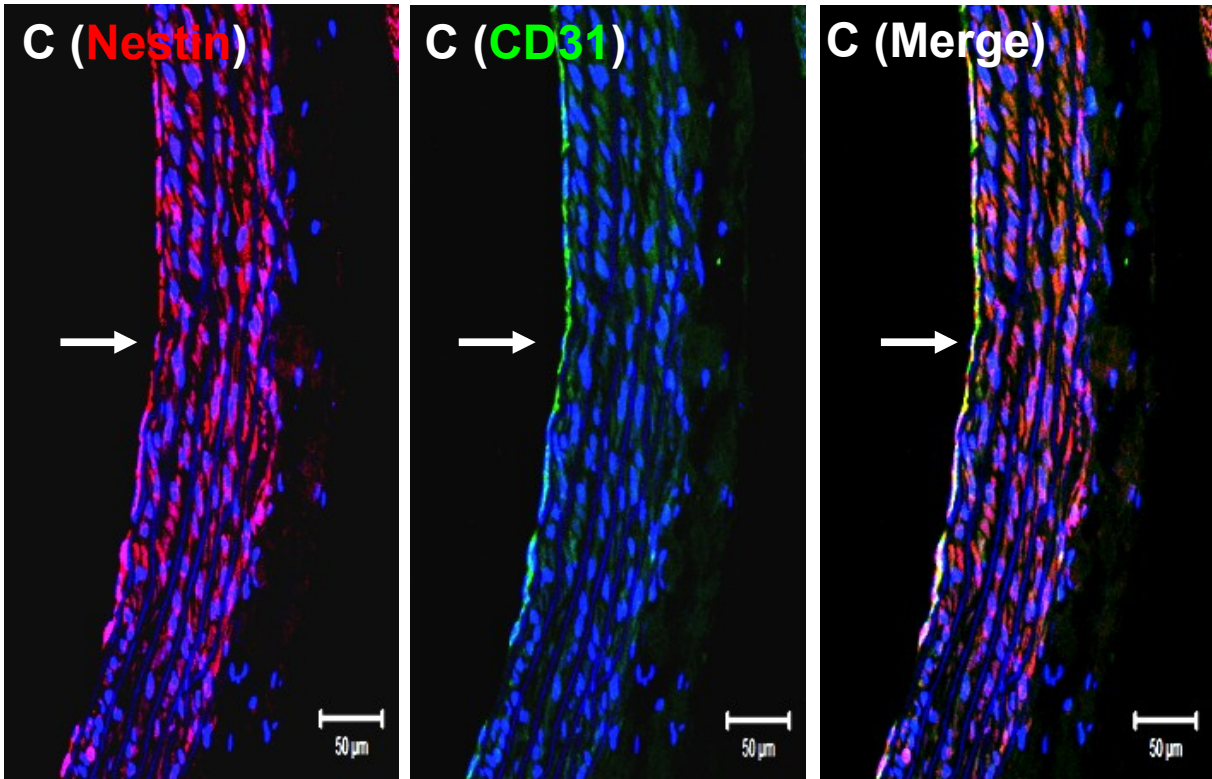


Figure 2D

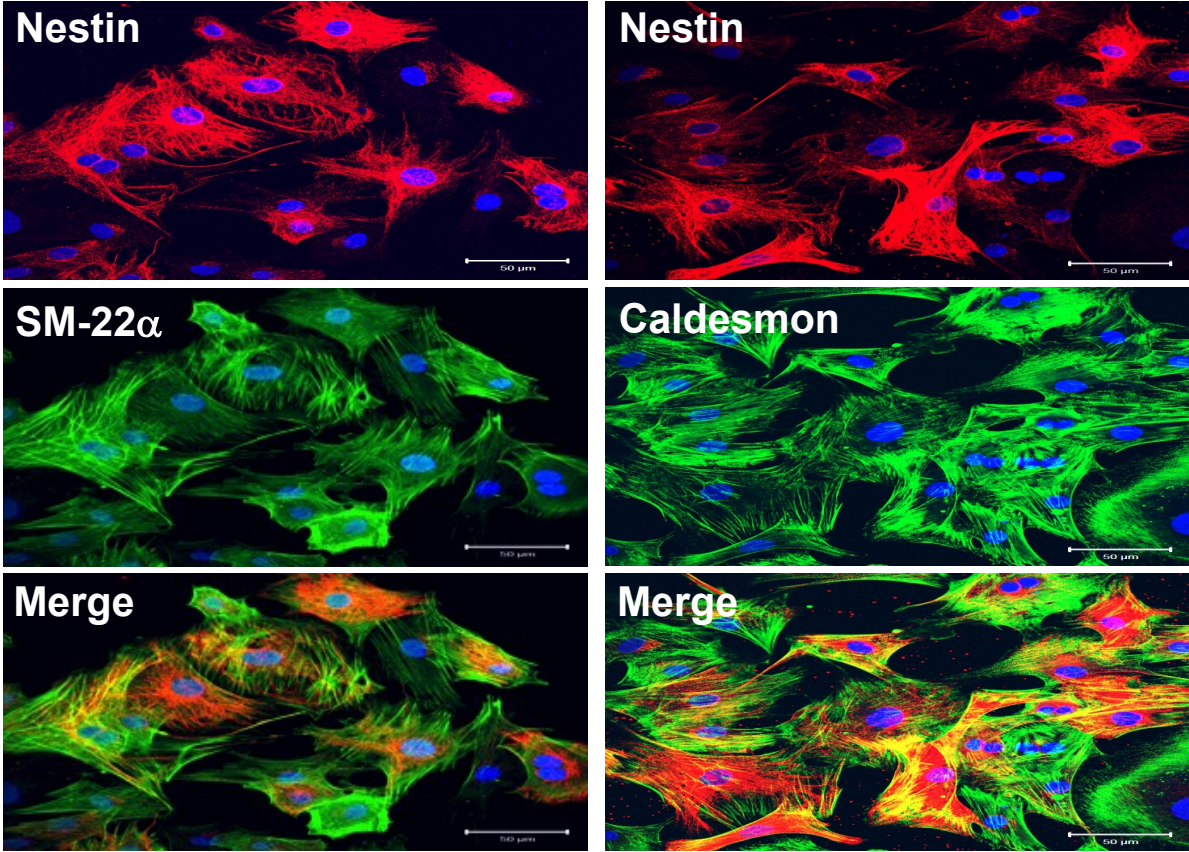
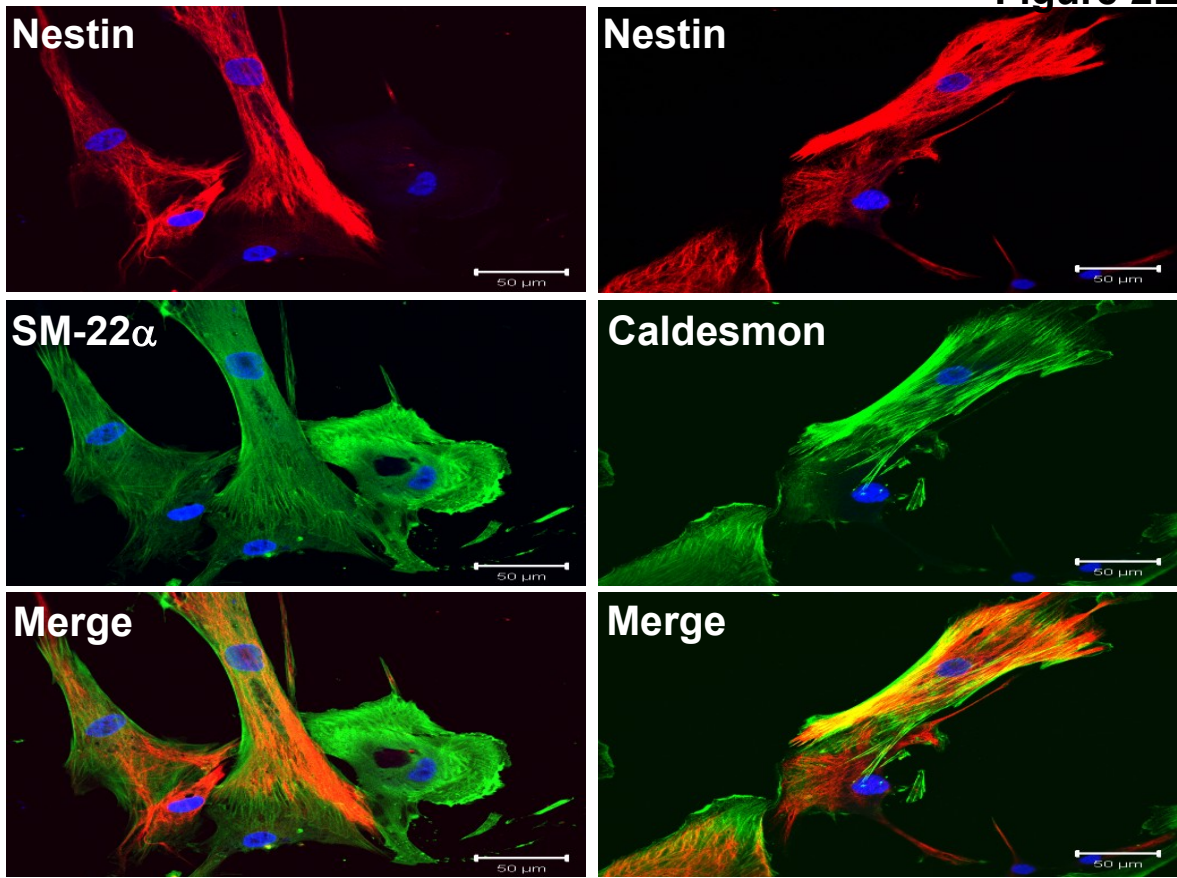
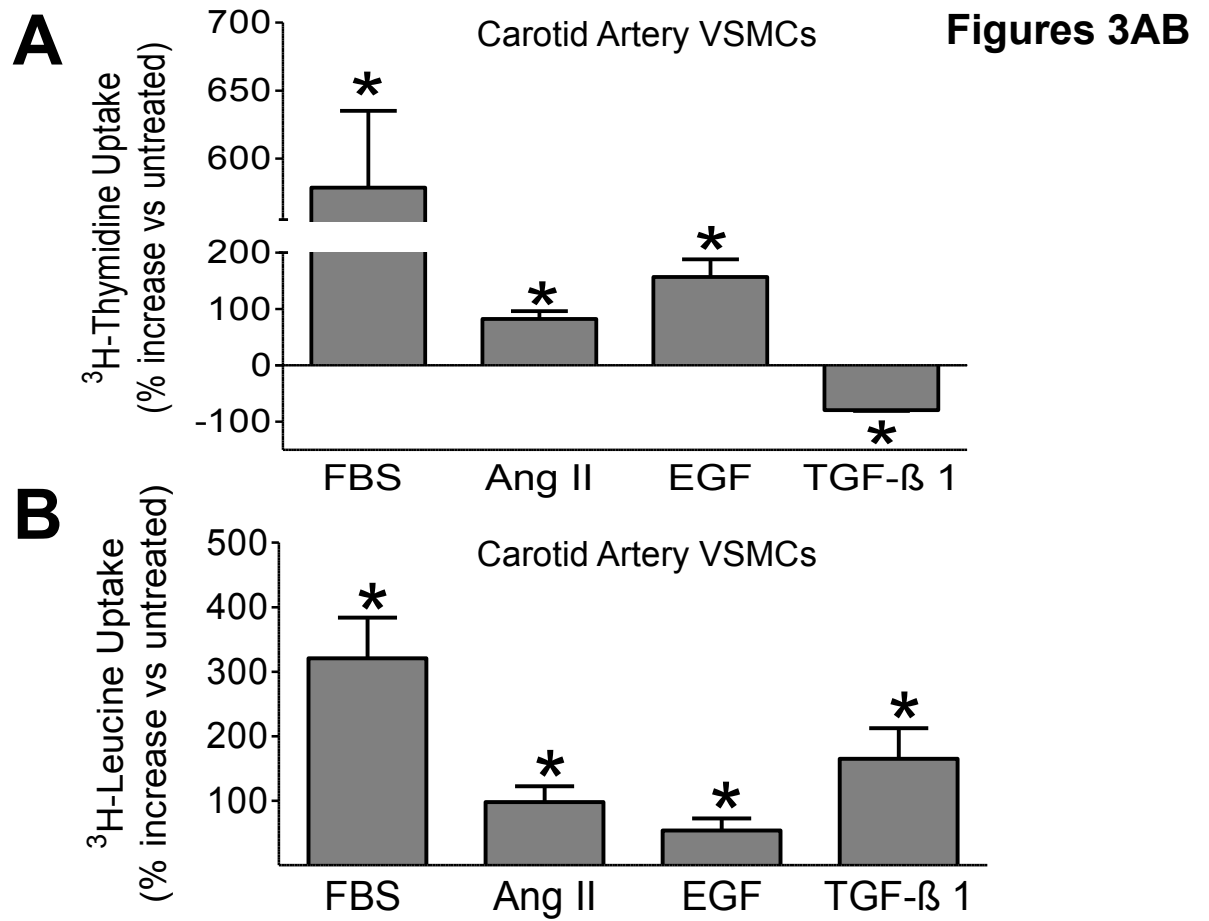


Figure 2E



2.2.9 Figure 3



Figures 3CD

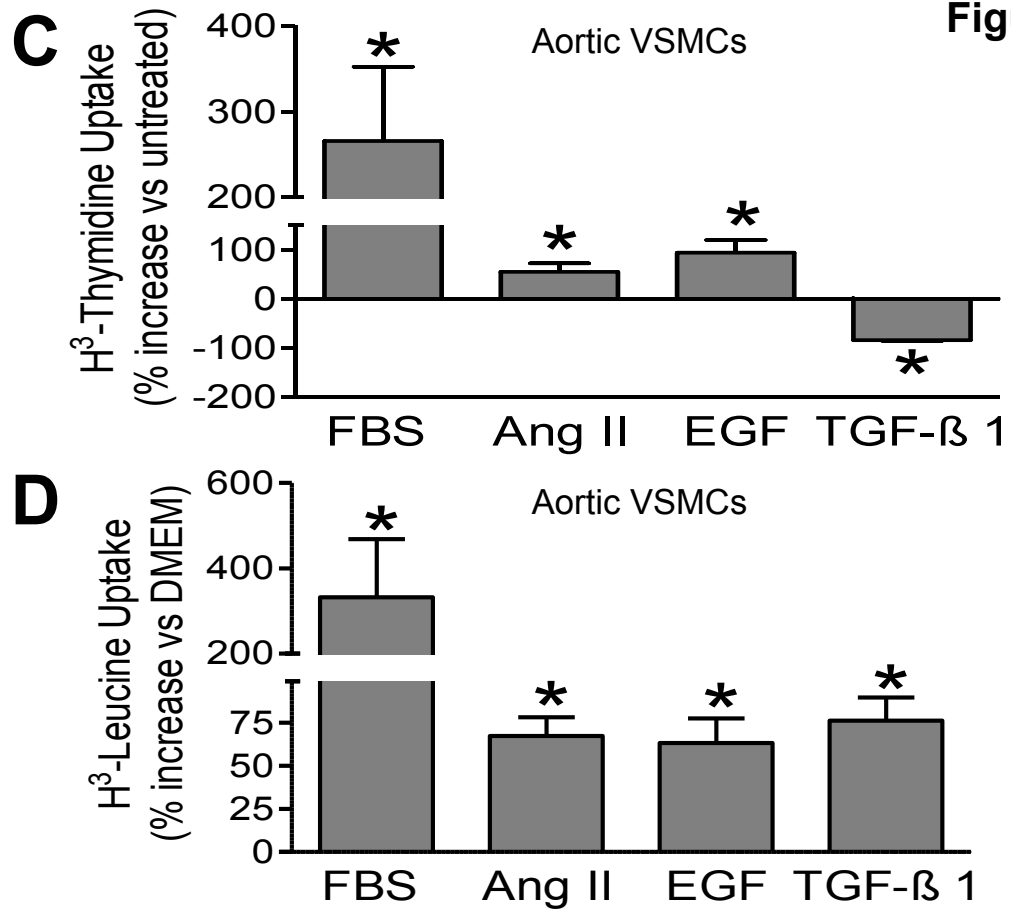


Figure 3E

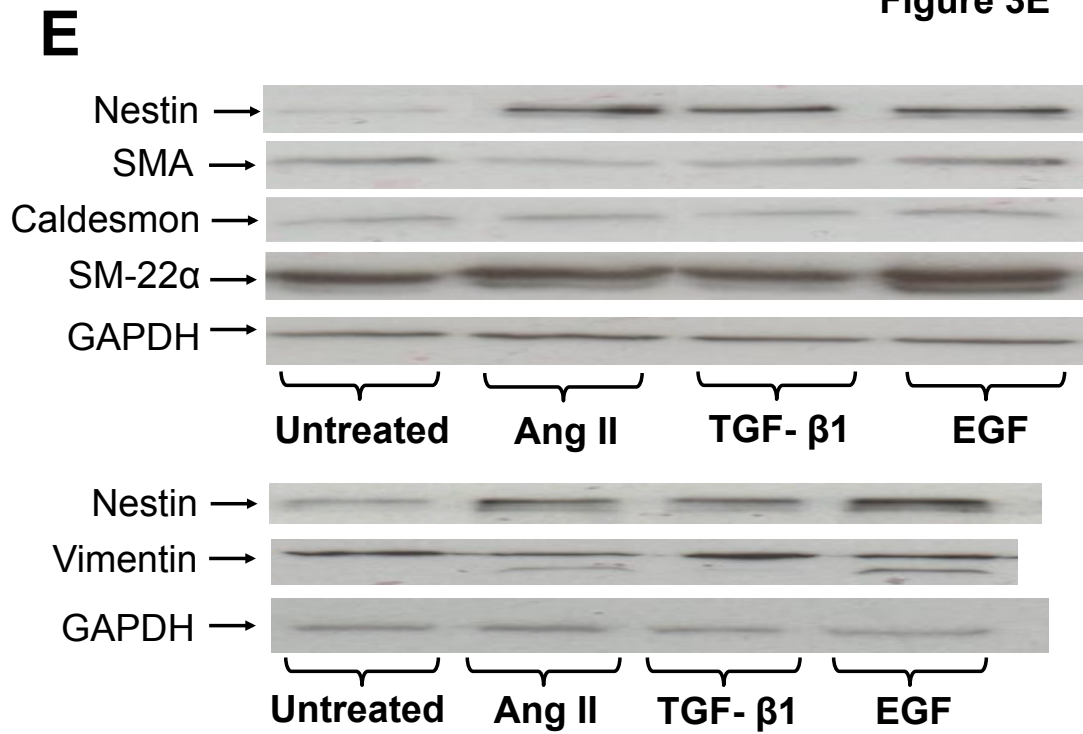


Figure 3F

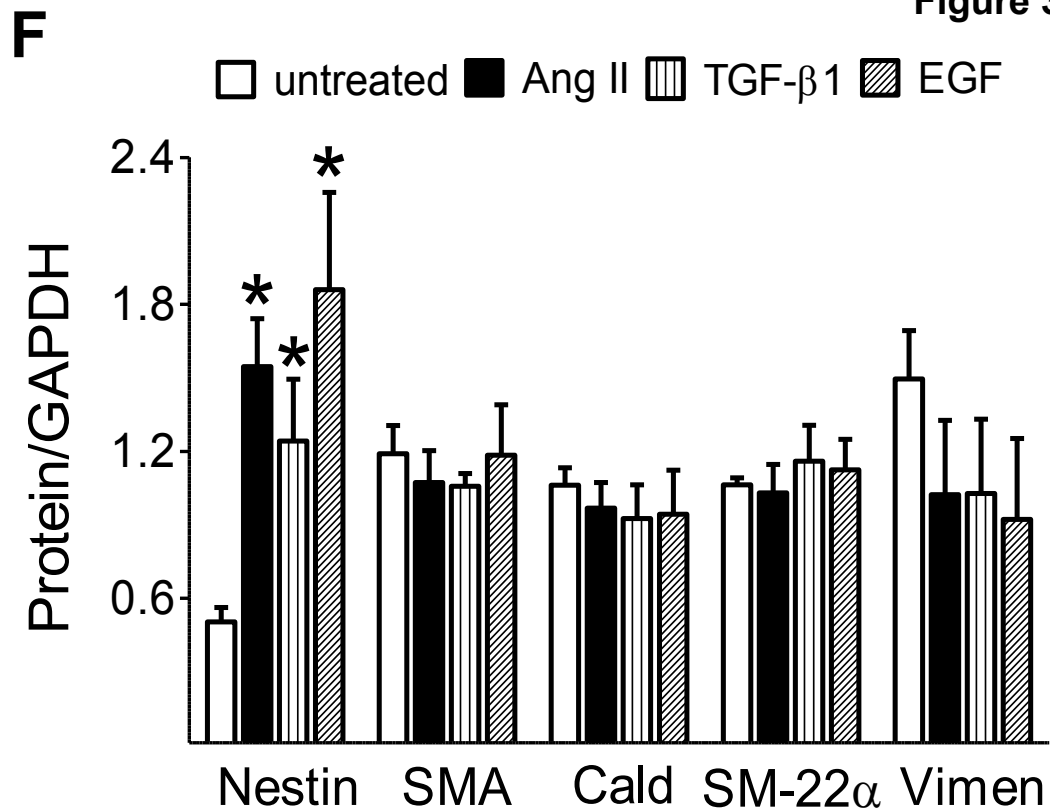


Figure 3G

G

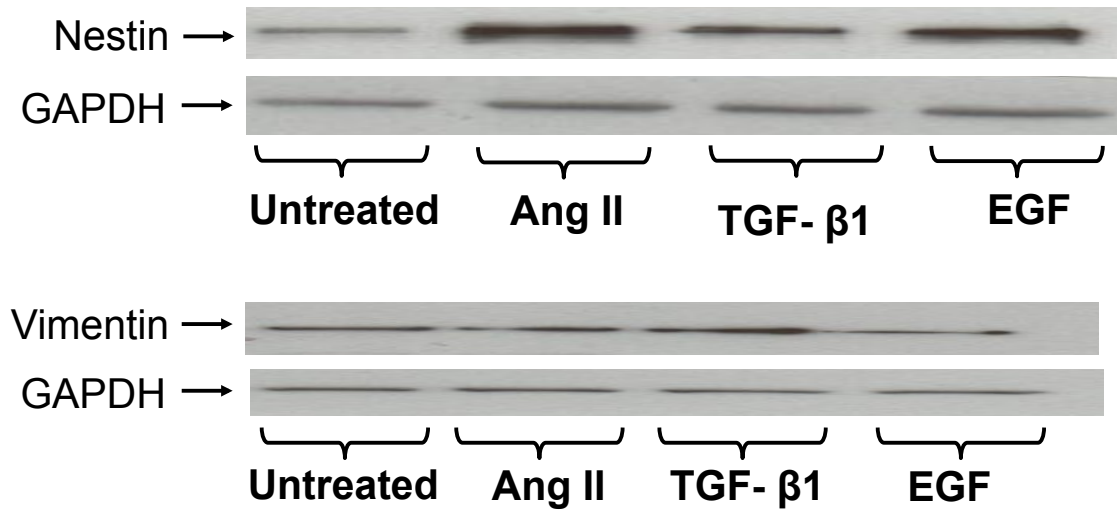
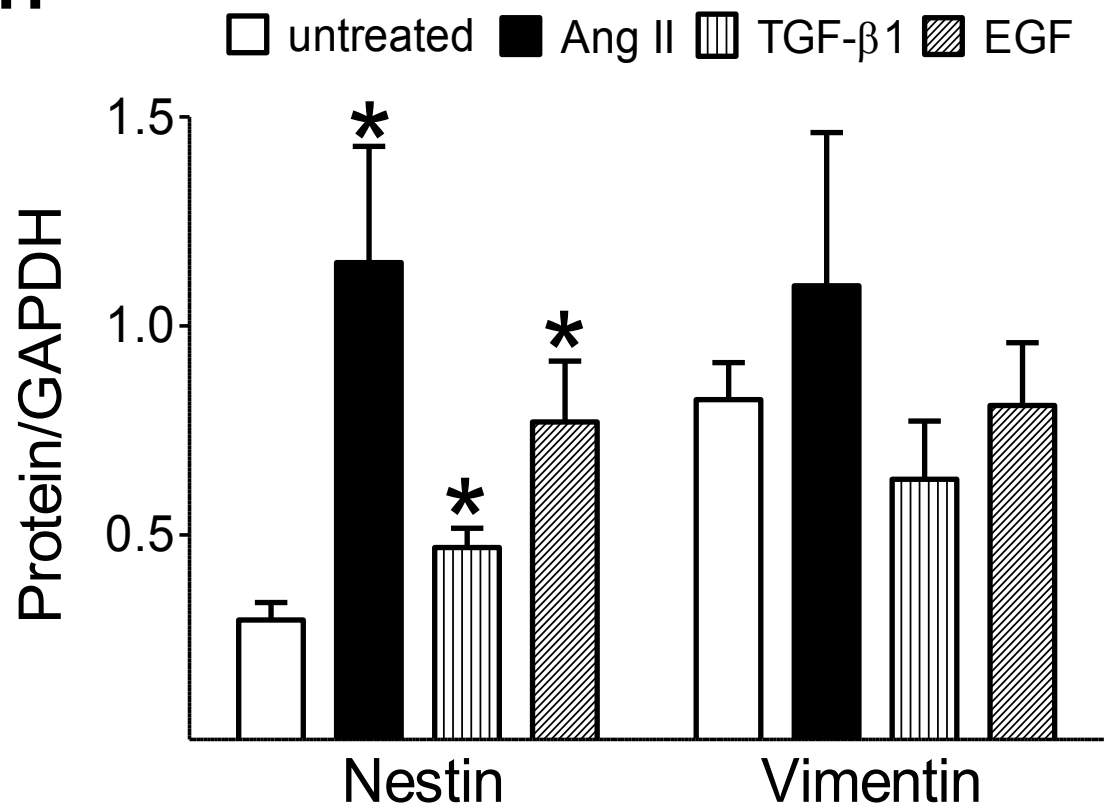


Figure 3H

H



2.2.10 Figure 4

A

Figure 4

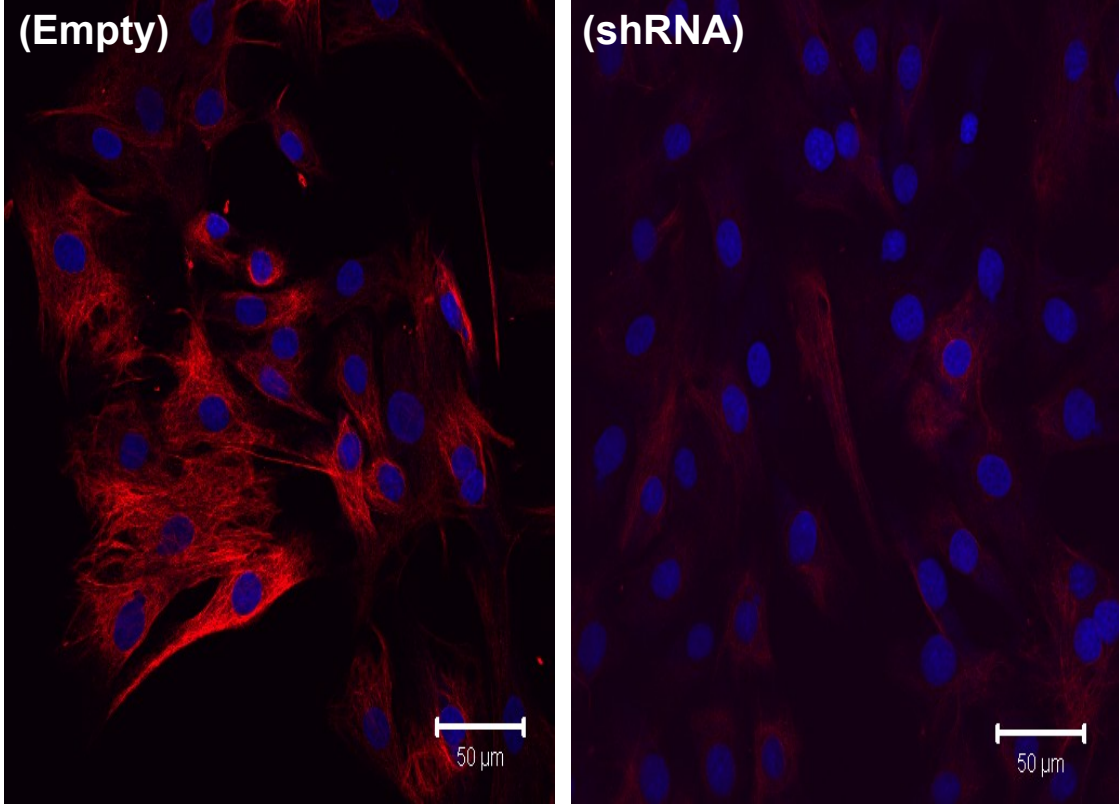


Figure 4

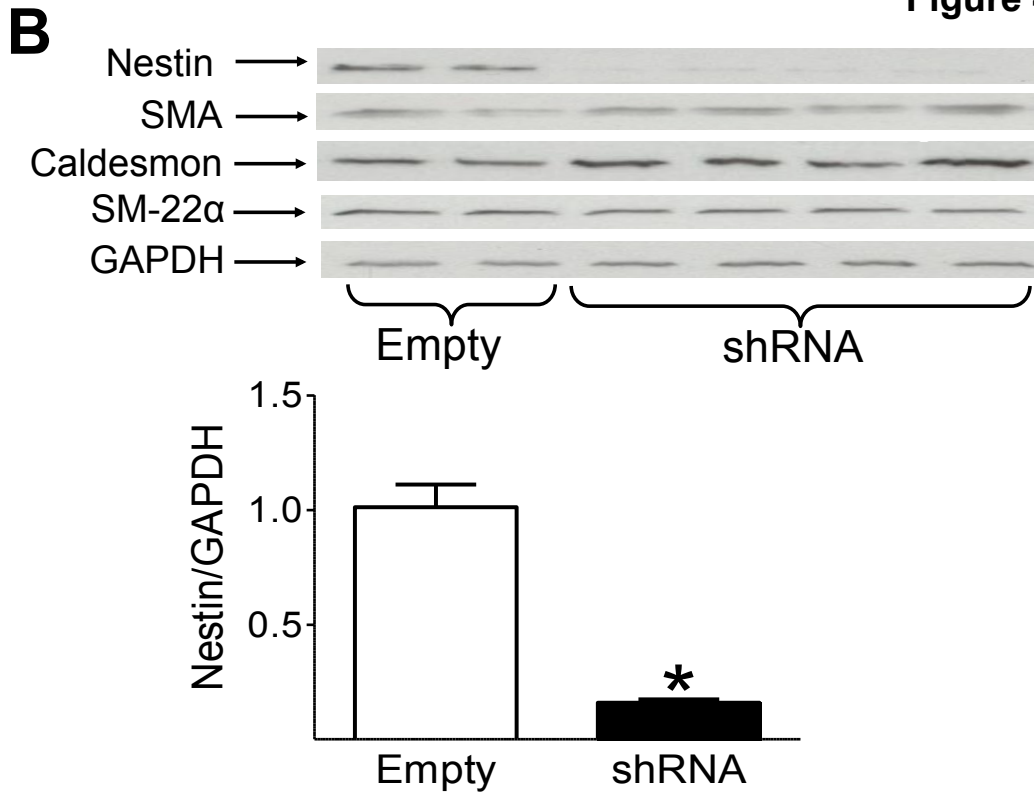
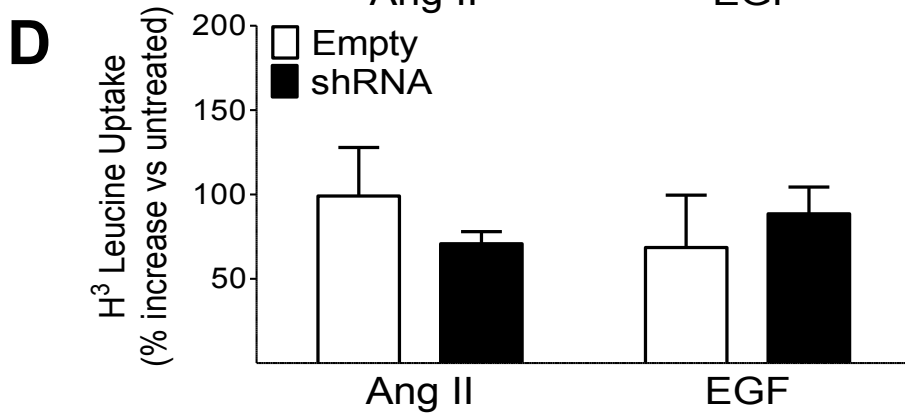
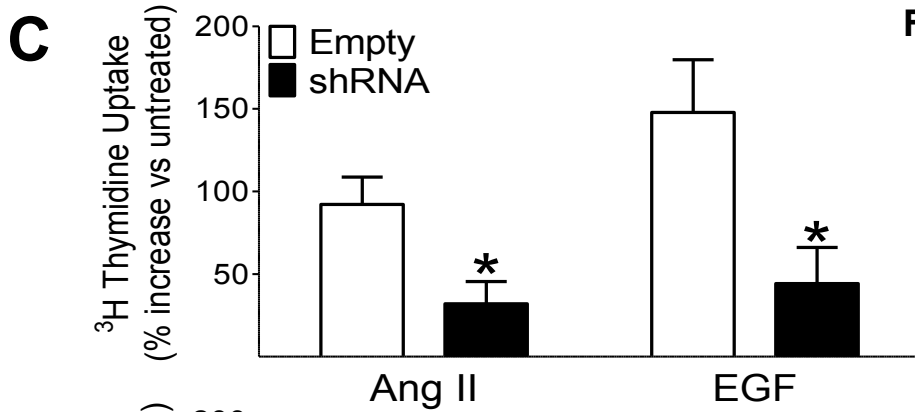


Figure 4



2.2.11 Table 1. Hemodynamics of Sham and 2-Week Suprarenal Abdominal Aortic Constricted (SAC) Rats

	MAP (mmHg)	HR (BPM)	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	+ dP/dT (mmHg/sec)	-dP/dT (mmHg/sec)
Sham (n=10)	112±6	272±8	145±8	10±2	6176±216	5194±189
SAC (n=8)	132±6*	269±15	185±9*	8±1	7860±155*	7850±523*

MAP indicates mean arterial pressure, HR, Heart rate, LVSP, left ventricular systolic pressure, LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure, +dp/dt, rate of contraction; -dp/dt rate of relaxation, LV, left ventricle, LR, right ventricle. Data are presented as mean ± SEM, analyzed by an unpaired t-test (*) represents p<0,05 versus sham and (n) number of rat examined.

2.2.12 Table 2. Body and Heart Weight of Sham and 2-Week Suprarenal Abdominal Aortic Constricted (SAC) Rats

	BW (g)	Heart (g)	LV (mg)	LV/BW (mg/g)	RV (mg)	RV/BW (mg/g)
Sham (n=7)	401±5	1.14±0.07	612±23	1.44±0.08	237±12	0.57±0.04
SAC (n=8)	383±13	1.54±0.06*	789±45*	2.09±0.12*	245±13	0.69±0.02

BW indicates body weight; LV, left ventricle and RV, right ventricle. Data are presented as mean ± SEM, analyzed by an unpaired t-test, (*) represents p<0,05 versus sham and (n) number of rat examined.

2.2.13 Table 3 Vessel morphology of sham and 2 week suprarenal abdominal aortic constricted (SAC) rats

	Carotid artery		Aortic arch		Thoracic Aorta	
	Sham (n=12)	SAC (n=7)	Sham (n=9-10)	SAC (n=7)	Sham (n=8-10)	SAC (n=7)
wall thickness (mm)	0.054±0.002	0.076±0.004*	0.112±0.008	0.164±0.007*	0.092±0.004	0.122±0.004*
media area (mm ²)	0.125±0.007	0.213±0.018*	0.68±0.05	1.06±0.05*	0.50±0.02	0.67±0.03*
total number of nuclei	259±18	617±76*	1830±145	2332±177*	1562±113	1856±44*
number of nuclei/mm ²	2132±193	2991±345*	2660±258	2251±234	3201±132	2794±123

Data are presented as mean ± SEM, analyzed by an unpaired t-test, (*) represents p<0,05 versus sham, (a) p=0.059 versus sham and (n) number of rats examined

3 Discussion

L'objectif global de ces travaux de thèse était d'étudier l'expression de la protéine Nestin dans les vaisseaux de gros calibres durant le développement physiologique ainsi qu'en présence de pathologies comme le DT1 et l'hypertension. Le remodelage vasculaire joue un rôle primordial dans la réponse d'adaptation des vaisseaux au cours du développement et suite aux changements hémodynamiques et biochimiques qui se produisent lors de l'instauration d'une pathologie. La protéine de filament intermédiaire Nestin joue un rôle dans le remodelage vasculaire via la prolifération et la différenciation de plusieurs types cellulaires. La présence de cette protéine au niveau vasculaire, principalement dans l'endothélium de vaisseaux nouvellement formés nous a incité à nous interroger sur la fonction que cette protéine peut remplir au niveau vasculaire et qui, jusqu'à maintenant, n'est pas totalement comprise.

Les résultats obtenus et associés au premier objectif de ces travaux nous ont permis de démontrer que la protéine Nestin est fortement exprimée dans l'aorte de rats néonataux et que son expression est modulée au cours du développement. La protéine Nestin est retrouvée principalement dans l'endothélium et dans la première couche de CML des aortes de rats néonataux. Par la suite, l'expression de Nestin diminue dans l'aorte au cours du développement. Cependant, la protéine Nestin est conservée dans l'intima et la média de l'aorte et des carotides des rats. Chez le rat adulte, la protéine Nestin est retrouvée autant au niveau des CE qu'au niveau d'une sous-population de CML dans l'aorte et la carotide. Toutefois, la distribution de la protéine Nestin dans la média des vaisseaux n'est plus aussi uniforme comparativement aux rats néonataux. Notre étude sur l'expression de Nestin dans un modèle animal de DT1, induit par une injection de streptozotocin, nous a permis d'établir une relation entre l'expression de Nestin et la capacité proliférative des CML tant *in vivo* qu'*in vitro*. (Voir Annexe 1 Modèles animaux : 1.1 Induction du diabète par injection de streptozotocin chez le rat) La perte de l'expression de la protéine Nestin est corrélée avec la diminution de la phosphorylation de la protéine phosphohistone 3, un marqueur d'activité du cycle cellulaire. D'ailleurs, la diminution de l'expression de Nestin, à l'aide d'un shARN, entraîne une perte de la capacité proliférative des CML isolées d'aortes et de carotides sans affecter leur phénotype *in vitro*. Cette perte de capacité proliférative survient de façon précoce

et précède l'instauration de la dysfonction endothéliale *in vivo*. Cette observation nous permet de mieux comprendre l'importance de la protéine Nestin au niveau vasculaire et son rôle potentiel dans le maintien de l'intégrité vasculaire en assurant la capacité d'adaptation de la paroi vasculaire.

Dans le cadre du second objectif de ce projet, nous avons déterminé que l'hypertension induite par une constriction aortique abdominale surrénale accroît l'expression de Nestin au niveau de la paroi vasculaire des carotides et de l'aorte. (Voir Annexe 1 Modèles animaux : 1.2 Constriction aortique abdominale surrénale chez le rat) Dans ce modèle animal, la constriction aortique abdominale surrénale augmente la post-charge et diminue le flot sanguin alimentant les reins entraînant une relâche plus importante de rénine et de ce fait une augmentation de la production de l'ang II. Cette activation du système rénine-angiotensine-aldostérone induit une augmentation de la pression sanguine ainsi qu'une hypertrophie cardiaque et un remodelage vasculaire important. Cette étude a permis de mettre en évidence une corrélation entre la pression sanguine mesurée (pression artérielle et ventriculaire systolique) ainsi que le taux d'expression de la protéine de filament intermédiaire Nestin. L'augmentation de son expression en lien avec le remodelage vasculaire suggère son implication dans l'hyperplasie des CML *in vivo*. Les analyses *in vitro* sur les CML isolées d'aortes et de carotides stimulées avec l'ang II, ont permis de moduler l'expression de la protéine Nestin ainsi que la prolifération des CML. De plus, une diminution de l'expression de Nestin par un shARN entraîne une perte de la capacité proliférative des cellules sans affecter le phénotype des CML *in vitro*. La protéine Nestin pourrait donc être impliquée dans le remodelage vasculaire par l'augmentation de la capacité des CML à proliférer afin de s'adapter aux changements de pression sanguine que l'aorte et les carotides subissent en situation d'hypertension

3.1 L'effet du diabète de type 1 sur la capacité proliférative des cellules vasculaires : Implication de la protéine Nestin

La régénération physiologique suite à une blessure vasculaire est cruciale dans le maintien de l'homéostasie des vaisseaux sanguins. Toutefois, en situations pathologiques, la réponse vasculaire peut être grandement altérée. En situation de DT1, une résistance à l'insuline, une hyperglycémie chronique et l'instauration d'un état pro-inflammatoire entraînent des désordres dans le renouvellement de la paroi vasculaire menant au développement de pathologies telle que l'athérosclérose. Le DT1 exerce des effets néfastes sur le remodelage vasculaire, sur la capacité des vaisseaux à s'ajuster aux facteurs hémodynamiques changeant mais également sur le contrôle de la pression sanguine ainsi que sur la fonctionnalité de l'endothélium. Ces événements ont des répercussions sur toutes les couches cellulaires de la paroi vasculaire.

3.1.1 L'effet du diabète de type 1 sur la paroi vasculaire.

Au niveau cardiovasculaire, le diabète est lié à un remodelage pathologique des vaisseaux, à une mauvaise réparation vasculaire ainsi qu'à une altération des mécanismes d'angiogenèse. [257] La résistance à l'insuline et l'hyperglycémie compromettent les fonctions des CE et des CML des vaisseaux sanguins menant à la perte de réactivité vasculaire. Elles initient la dysfonction endothéliale puis surviennent alors des changements structuraux au niveau des grandes et des petites artères. Ces altérations reprennent, dans une version accélérée, le processus de remodelage artériel associé avec la sénescence cellulaire qui se produit durant le vieillissement normal des vaisseaux. [437]

3.1.1.1 Le remodelage et la réactivité vasculaire des artères aortique et carotidienne dans un modèle de diabète de type 1 chez le rat

Le remodelage vasculaire est responsable de plusieurs pathologies liées au diabète et il peut s'observer dans les artères de la micro- et de la macro-vasculature. Dans notre étude sur l'expression de la protéine Nestin dans les vaisseaux sanguins, nous nous sommes intéressés aux vaisseaux de gros calibres tels que les artères carotidienne et aortique. Nous avons travaillé avec ces artères élastiques puisqu'elles subissent un remodelage important en réponse aux changements hémodynamiques et chimiques qui peuvent se produire en situation de DT1. Ces vaisseaux, puisqu'ils sont situés près du cœur, peuvent subir très tôt les changements hémodynamiques qui découlent des altérations pathologiques de la fonction cardiaque en situation de DT1. Dans un premier temps, nous avons évalué l'impact du DT1 sur la morphologie et la réactivité vasculaire de ces vaisseaux afin d'établir l'ampleur de l'atteinte vasculaire qu'ils subissent.

Dans notre étude, nous avons choisi de travailler avec un modèle où le diabète est chimiquement induit par l'injection d'une dose de streptozotocin (STZ). Cela initie une réaction auto-immunitaire qui résulte en la destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans dans le pancréas. [438] Une dose de 60mg/kg de STZ résulte en une toxicité des cellules bêta avec l'émergence du diabète dans les 2 à 4 jours qui suivent l'injection. [439] Bien qu'une distinction existe entre les modèles de DT1 et DT2, les rats qui reçoivent une injection de STZ (DT1) développent une hyperglycémie qui altère les fonctions cardiaques et vasculaires de façon similaire à celles qui se produisent dans les modèles de rats DT2 en particulier les rats diabétiques Zucker (*Zucker Diabetic Fatty rats*). [356] En effet, la glycémie mesurée chez les rats ayant reçu une injection de STZ est fortement augmentée deux semaines après l'injection de STZ en comparaison avec les rats sains (Sham). Avec ce modèle DT1 nous n'avons pas une accumulation de facteurs de risque comme dans les modèles de rats DT2 qui peuvent présenter de l'obésité, une hyperinsulinémie, hyperlipidémie et de l'hypertension. Nous pouvons donc étudier l'impact de l'hyperglycémie sur la fonction vasculaire.

Nous avons procédé à l'analyse morphologique par une coloration à l'hématoxyline-phloxine-safran (HPS) des carotides et des aortes de rats Sham et STZ. Ces analyses ont permis d'établir qu'il n'y a pas eu de remodelage vasculaire apparent suite à l'établissement d'une hyperglycémie chronique dans les rats DT1 suite à l'injection de STZ. En effet, l'analyse de l'aire et de l'épaisseur de la média a permis de déterminer qu'il n'y avait pas de différence entre les vaisseaux des rats sains et DT1. Cette absence de remodelage est valable pour la carotide ainsi que pour les trois sections analysées de l'aorte : l'arche aortique, l'aorte thoracique et l'aorte abdominale. Ces résultats démontrent que l'instauration de l'hyperglycémie doit se prolonger au-delà de deux semaines pour affecter le remodelage vasculaire dans notre modèle de DT1. Cependant, comme l'expression de Nestin est associée avec la capacité proliférative des cellules, son niveau d'expression lors de l'initiation du diabète était crucial pour notre étude. De plus, nous savons que l'expression de Nestin est grandement diminuée dans d'autres organes en situation de DT1, par exemple dans le cœur. En effet, au niveau du cœur la perte de l'expression de Nestin est associée avec une diminution de la capacité réparatrice du tissu cardiaque suite à un infarctus du myocarde. [407] Donc, si les rats DT1 avaient présenté un stade avancé de diabète, il aurait été difficile d'étudier le rôle de Nestin puisque l'atteinte vasculaire aurait été trop sévère et son expression possiblement complètement abolie.

À plus long terme, les vaisseaux sanguins de gros calibres seraient plus sujets à subir un remodelage hypertrophique en raison d'une augmentation de la pression sanguine sous l'influence de l'activation du système rénine-angiotensine par le DT1. D'ailleurs, chez les modèles de rats spontanément diabétiques ou suite à une injection de STZ, l'ARN et l'expression de la protéine rénine sont augmentées dans les cellules des tubules proximaux et juxtaglomérulaires des reins en plus d'une augmentation de la production d'ang II. [440] Comme dans notre étude ces rats ont été analysés deux semaines suivant l'injection de STZ. Cependant, cette analyse est principalement réalisée sur les reins et ne renseigne d'aucune façon sur les valeurs hémodynamiques de ces rats. Il est possible que cette augmentation de la rénine et de l'ang II soit trop précoce pour avoir des répercussions au niveau de la fonction cardiovasculaire. D'ailleurs, les valeurs hémodynamiques que nous avons mesurées chez les rats diabétiques étaient significativement à la baisse en comparaison avec les rats Sham. Les

pressions artérielles et ventriculaires systoliques sont toutes les deux diminuées. Ces résultats sont en accord avec les précédentes études réalisées avec ce modèle de DT1. [355, 356, 441] Comme une plus faible pression s'exerce sur la paroi des vaisseaux, les rats DT1 ne subissent pas un changement important de pression qui entraînerait un remodelage vasculaire, et ce, deux semaines après l'injection de STZ. Toutefois, le diabète et l'hypertension sont étroitement liés dans le développement de la pathologie vasculaire diabétique. D'ailleurs, l'apparition de l'hypertension en situation diabétique est responsable du remodelage cardiaque et potentiellement du remodelage vasculaire. [442] Des analyses supplémentaires sur une plus longue période de temps pourraient nous permettre d'observer si de tels changements hémodynamiques se produisent dans notre modèle de DT1. De plus, une analyse complémentaire des ratios de la média / la lumière des vaisseaux serait pertinente afin de confirmer l'absence de remodelage vasculaire. Le calcul de ces ratios est important, car l'aire de la média peut demeurer inchangé même s'il y a une hypertrophie, comme c'est le cas dans l'hypertrophie eutrophique. De ces mêmes expériences, nous avons également procédé à un compte des noyaux des CML des parois des carotides et des aortes afin de déterminer s'il y avait eu une augmentation du nombre de CML. Un nombre similaire de noyaux a été obtenu entre les rats Sham et DT1 indiquant qu'il n'y avait pas eu d'hyperplasie des CML dans les différents vaisseaux analysés. Par la suite, puisque l'apparition de la fibrose est un élément du remodelage vasculaire et qu'elle est impliquée dans l'augmentation de la rigidité artérielle, le contenu en collagène des carotides et des aortes des rats Sham et DT1 a été analysé par une coloration au trichrome de Masson. (Résultats non montrés) Cette analyse nous a permis de confirmer que les vaisseaux ciblés n'ont pas subi de changements dans la composition des parois vasculaires. Ces résultats suggèrent que les rats DT1 de notre étude sont à un stade précoce du diabète et que le remodelage vasculaire n'a pas encore eu lieu. Cependant, l'état d'hyperglycémique est bien instauré.

Ensuite, nous nous sommes concentrés sur l'analyse de la fonction endothéliale en situation de DT1. La dysfonction endothéliale est un événement précoce dans l'établissement de la pathologie diabétique. [443] Lorsqu'elle survient, l'endothélium n'est plus capable de maintenir l'intégrité physique et fonctionnelle de la paroi vasculaire. En effet, la perte de la modulation du tonus vasculaire survient progressivement suite à la dysfonction endothéliale, et

ce, de façon accélérée en situation diabétique. [443] Dans notre étude, malgré l'état hyperglycémique confirmé des rats DT1, la dysfonction endothéliale n'a pas été observée. En effet, l'expression des marqueurs endothéliaux vasculaires CD31 et eNOS n'était pas altérée et était similaire à celle retrouvée chez les rats Sham. Ces résultats démontrent que l'expression de eNOS, protéine essentielle au maintien de la fonction endothéliale, n'est pas encore altérée par la pathologie. Bien que l'expression de eNOS est demeurée inchangée chez les rats DT1 traités avec le STZ, nous n'avons pas été en mesure d'établir si l'activité enzymatique de eNOS ou la biodisponibilité du NO étaient en cause. Nous avons tout de même procédé à l'analyse de la réactivité vasculaire de l'aorte en chambre d'organe. Les aortes ont été soumises à une pré-contraction avec la phényléphrine puis la vasodilatation induite par l'acétylcholine a été mesurée. Des études précédentes ont démontré une réduction de la vasodilatation à l'acétylcholine et à la bradykinine dans les petites et grosses artères chez des patients souffrants de DT2 [248, 249, 444-446] et DT1 [447, 448] Dans notre étude, la condition diabétique des rats DT1 n'a pas été suffisante pour entraîner une altération dans la réponse à l'acétylcholine. Ainsi, nous n'avons pas observé de différence dans la réactivité vasculaire entre l'aorte des rats Sham et des rats DT1. Ces résultats confirment que la période de temps choisie pour notre étude n'est pas assez longue pour observer l'atteinte vasculaire induite par le diabète.

Dans cette étude, nous voulons étudier l'effet de l'hyperglycémie lors de l'initiation de la pathologie vasculaire et déterminer si la perte de la capacité de régénération vasculaire en situation de DT1 était lié à l'expression de la protéine Nestin. Nos premières analyses morphologiques et fonctionnelles des carotides et des aortes saines et DT1 nous ont permis d'établir que malgré une situation d'hyperglycémie, l'intégrité de la paroi vasculaire n'est pas altérée. Les vaisseaux analysés n'ont pas présenté pas de signes évidents de remodelage, de fibrose ou de perte de réactivité vasculaire. Cependant, dans notre modèle, même si aucune atteinte vasculaire ne semble être apparue deux semaines suivant l'induction du DT1, nous avons pu remarquer que les rats diabétiques présentaient une atteinte dans leurs fonctions cardiaques. Parmi les rats DT1, la contractilité du cœur était affectée suivant l'initiation de la pathologie. En effet, la mesure des forces de contraction (+dp/dt) et de relaxation (-dp/dt) des cœurs était altérée. (Voir section 2.2.11) Nos résultats sont similaires avec ceux de la

littérature qui rapportent que les fonctions systoliques et diastoliques sont significativement compromises chez les rats DT1 suite à une injection de STZ. [356, 449, 450] D'ailleurs, Joffe et al., a rapporté que les cœurs des rats DT1 injectés avec le STZ développent une hypertrophie excentrique. [449] De telles altérations des fonctions cardiaques en situation diabétique peuvent mener au développement de l'insuffisance cardiaque. Il a été démontré que l'atteinte des fonctions cardiaques était due aux changements métaboliques plutôt qu'à des altérations structurelles du myocarde en situation diabétique. [451] Ainsi, les altérations métaboliques, dont l'hyperglycémie chronique, affectent plus précocement la fonction cardiaque que la fonction vasculaire.

3.1.2 Cellules vasculaires prolifératives en situations physiologiques et pathologiques

Durant l'embryogénèse et le développement post-natal, les CML démontrent une grande capacité répliquative ainsi que l'induction rapide de l'expression de plusieurs gènes conduisant à la différenciation des CML. [90] [452] Avec la différenciation cellulaire et la maturation des vaisseaux sanguins du système cardiovasculaire, le rythme de la division cellulaire diminue rapidement. D'ailleurs, il est généralement accepté que les cellules de la paroi vasculaire (CE et CML) soient des cellules matures qui ne prolifèrent qu'à un très faible taux. Celles-ci restent dans un état quiescent mais différencié et en contact continu les unes avec les autres durant une longue période de temps. Toutefois, les CE et les CML matures ont la capacité, selon l'environnement local, de quitter cet état quiescent et de proliférer. En effet, les CE répondent à une augmentation de la sécrétion de VEGF afin de participer au processus d'angiogenèse. [453] Quant aux CML, elles répondent à une relâche de TGF- β et de PDGF pour proliférer principalement suite à une blessure vasculaire. [454, 455] Les cellules vasculaires peuvent également quitter leur état de quiescence pour assurer le remplacement des cellules apoptotiques ainsi que l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la paroi vasculaire. Les analyses de la capacité proliférative des cellules vasculaires nous ont permis de démontrer que contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature, un grand nombre de CE

et de CML possèdent une activité mitotique en situation physiologique. En effet, nous avons observé une forte proportion des CE et CML des artères carotidiennes et aortiques possédant un cycle cellulaire actif, par la détection de la phosphorylation de l'histone 3 (PHH3), une protéine qui est phosphorylée durant la fin de la phase G2 juste avant l'entrée en mitose. [456] [457] Cette différence peut s'expliquer par l'utilisation d'un marqueur précis d'une phase du cycle cellulaire et pas d'un marqueur plus général comme le Ki-67. Ainsi que par la sensibilité de la méthode utilisée pour identifier les cellules prolifératives.

3.1.2.1 L'expression de Nestin dans les cellules endothéliales prolifératives

La capacité proliférative des CE est très importante dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium en condition physiologique et cette fonction est altérée avec l'initiation du diabète. [458] La protéine Nestin est associée avec une capacité proliférative des CE dans plusieurs mécanismes physiologiques et pathologiques. [358, 387, 400-405] Au niveau endothélial, Nestin est fortement exprimée durant le développement, mais est absente dans les CE adultes de vaisseaux de gros calibres comme l'aorte. [354] D'ailleurs, une étude a démontré que l'expression de Nestin était spécifique aux CML dans l'aorte. [354] D'autres études démontrent cependant, que l'expression de Nestin au niveau des CE adultes est possible. En effet, la protéine Nestin est retrouvée dans les CE lors de la vascularisation des tumeurs et est caractéristique de l'endothélium répliatif dans les capillaires. [353] Elle ré-apparaît dans la néovascularisation de la cicatrice cardiaque [407] et lors de la formation de la néointima lors d'une blessure par ballon. [354] Il n'est donc pas clairement établi que l'expression de la protéine Nestin est statique dans le temps et qu'elle est confinée à certaines localisations vasculaires précises. En effet, l'expression de Nestin au niveau vasculaire semble plutôt très dynamique et dépendante de la préparation des tissus pour l'analyse. De façon intéressante, nos analyses réalisées par immunofluorescence avec une co-expression de Nestin et CD31 nous ont permis d'observer l'expression de Nestin dans l'endothélium des aortes de rats néonataux et adultes. La co-expression de ces deux protéines a également été observée sur

les carotides de rats adultes, démontrant ainsi la présence de Nestin dans l'endothélium vasculaire à différents stades de développement.

Une étude réalisée par Oikawa et al. sur l'expression de Nestin dans l'aorte au cours du développement de rat a démontré que son expression était transitoire dans la média de l'aorte. Les CE analysées avec l'expression du marqueur Van Willbrand n'exprimaient pas Nestin. [354] L'utilisation de différents marqueurs endothéliaux peut expliquer cette différence d'expression au niveau endothélial entre notre étude et l'étude de Oikawa et al. [354] Notre étude démontre que l'expression de Nestin est maintenue dans les CE chez les rats sains, et ce, possiblement en raison de leur nécessité de prolifération afin d'accomplir le remplacement des CE en situation physiologique. La présence de Nestin, dans les vaisseaux de conduction qui sont soumis à une forte pression, peut être liée à un besoin plus grand de régénération endothéliale. D'ailleurs, l'étude de Schwartz et Benditt a démontré qu'il existait des zones dans l'aorte où les taux prolifératifs des CE étaient plus grands et d'autres plus faibles. [33] Des analyses par immunofluorescence sur la phosphorylation de l'histone 3 (PHH3) et de Nestin nous a permis d'observer qu'une grande proportion des CE était Nestin⁺/PHH3⁺. Ces observations confirment que la protéine Nestin est exprimée chez les CE de l'aorte et de la carotide de rats adultes qui ont un cycle cellulaire actif. Ainsi, notre étude sur les vaisseaux sains de rats adultes démontre qu'une grande proportion des CE ne sont pas des cellules quiescentes, mais des cellules prolifératives ayant un cycle cellulaire actif. En condition physiologique, Nestin est probablement exprimée pour assumer son rôle de structure dans les cellules en division. Le maintien de l'intégrité de l'endothélium est alors assuré par une prolifération continue due à l'activation bien contrôlée du cycle cellulaire des CE.

Cependant, l'expression de la protéine Nestin ainsi que la capacité proliférative des CE est compromise avec le diabète. L'analyse semi-quantitative en immunofluorescence des carotides et des arches aortiques de rats STZ nous ont permis d'observer une diminution du signal correspondant à Nestin dans les CE Nestin⁺CD31⁺. (Voir Annexe 2 Figure 1. Diminution de l'expression des cellules Nestin⁺ *in vivo*.) De plus, nous savons que la perte de la capacité proliférative des cellules vasculaires survient de façon précoce durant l'instauration de la dysfonction vasculaire en situation diabétique. De façon intéressante, une diminution ou une perte de la phosphorylation de l'histone 3 a été observée, autant chez les CE de l'aorte que

celles de la carotide. Chez les rats DT1. La perte de la capacité proliférative des CE peut résulter en une incapacité de s'adapter aux changements hémodynamiques qui surviennent et qui conduisent à des complications pathologiques vasculaires liées au diabète dont le développement de plaques d'athéroscléroses.

3.1.2.2 L'expression de Nestin dans les cellules musculaires lisses prolifératives

Les CML de la paroi vasculaire ont un phénotype dit contractile. Ce phénotype n'est généralement pas assujéti à une prolifération active des CML. [459] Comme les CE, les CML possèdent une activité mitotique très faible. [460] Cependant, les CML ont la capacité de réactiver leur cycle cellulaire et de proliférer. Leur prolifération en situations pathologiques est toutefois mieux comprise que leur remplacement en condition physiologique. Dans les vaisseaux sains, les CML participent au contrôle normal de la prolifération cellulaire par une régulation des facteurs de survie et des facteurs mitogéniques ainsi que par le maintien de l'inhibition de contact. [94]

Les différentes études sur l'expression de Nestin dans les vaisseaux mettent en évidence son absence de la paroi des vaisseaux de gros calibres dans les modèles animaux adultes. [353, 354, 399, 406-410] Son expression, présente au cours du développement, est régulée à la baisse et la protéine est progressivement remplacée par la protéine Desmine dans les cellules musculaires. [369] Toutefois, une blessure vasculaire peut induire sa réexpression. Par exemple, lors d'une angioplastie, la protéine Nestin est exprimée au niveau de la néointima. [354] Notre étude sur les carotides et les aortes de rats sains adultes démontre que leurs CML contiennent une sous population de cellules qui expriment Nestin. Une observation très intéressante faite au cours de cette étude est que l'expression de Nestin est localisée de façon spécifique dans l'aorte. En effet, l'expression protéique de Nestin diminue graduellement en s'éloignant du cœur. Cette observation confirme un résultat déjà obtenu par Oikawa et al.. [354] Le pourcentage de cellules Nestin⁺ parmi les CML totales de la paroi aortique suit le même schéma avec 20% dans l'arche aortique, 11% dans l'aorte thoracique et 6 % dans l'aorte abdominale. Cette perte d'expression de Nestin peut être associée avec la

diminution de la prolifération des CML qui suit la même tendance en s'éloignant du cœur. [33] De plus, il est observé que les CE subissent un remplacement plus rapide dans certaines zones de l'aorte. [33] Il est alors possible que les CML, selon leur localisation dans l'aorte, aient des taux de remplacement différents d'une zone à l'autre, mais analogue à celui des CE.

Les cellules du muscle squelettique ou des myocytes cardiaques qui sont des cellules différenciées de façon terminale n'effectuent pas de ré-activation dans leur cycle cellulaire pour se diviser. Contrairement à ces cellules, les CML de la paroi vasculaire conservent une plasticité et peuvent subir des altérations réversibles de leur phénotype afin de s'adapter aux changements de leur environnement local. [94] Dans un contexte physiologique, il est admis que les CML ne prolifèrent que très peu. Plusieurs études réalisées avec différentes techniques démontrent que la prolifération des CML n'est pas fréquente dans un contexte physiologique. Oikawa et al. a démontré qu'une incorporation *in vivo* de bromodéoxyuridine (BRDU) dans l'ADN des CML d'aortes de rats est possible, mais qu'elle diminuait durant le développement. Les CML aortiques perdent progressivement leur capacité de réplication durant le développement et ainsi la paroi vasculaire serait composée de CML post-mitotiques. [354] L'utilisation d'un autre marqueur comme le Ki-67, un marqueur général de la prolifération cellulaire, a démontré qu'une très faible proportion des CML de la paroi vasculaire d'artères mammaires et coronaires sont activement en prolifération. [461] L'utilisation d'un anticorps contre l'antigène nucléaire des cellules prolifératives (PCNA pour *proliferating cell nuclear antigen*) a démontré des résultats similaires au Ki-67 sur les mêmes types d'artères. [461] Finalement, la mesure *ex vivo* de [³H] thymidine, qui s'incorpore dans l'ADN lors de sa synthèse, a démontré également une faible prolifération des CML dans des aortes humaines *ex vivo*. [462] [463] Toutefois, cette procédure ne permet pas de démontrer une correspondance réelle de la prolifération cellulaire *in vivo*. [460] Malgré la disparité de la précision entre les techniques ainsi que les différents vaisseaux utilisés, la faible proportion de CML prolifératives en situation physiologique est toujours observée. Un contrôle strict du cycle cellulaire permet un maintien de la fonction des CML alors qu'en situations pathologiques, comme lors de la formation de la néointima, leur prolifération rapide est induite. Un grand nombre de facteurs environnementaux comme les forces de cisaillement [103], les facteurs de croissance, les ROS [104], les médiateurs inflammatoires [101, 102, 464], les composants de

la matrice extracellulaire [100, 465] et des interactions entre les cellules ont démontré avoir un rôle dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des CML. [94] Des études ont également démontré qu'il y a une grande proportion des CML qui accomplissent de multiples rondes de division cellulaire durant le développement de pathologies dont les plaques d'athérosclérose dans un modèle porcin. [466] D'ailleurs, une augmentation de la prolifération des CML est observée *in vivo* dans les plaques d'athérosclérose de patients diabétiques. [215] Clowes et al. a mesuré la cinétique de prolifération des CML dans la carotide suite à une dénudation vasculaire par ballon chez le rat. Avec un marquage à la [³H] thymidine, ils ont démontré qu'environ 50% des CML subissaient une ré-activation du cycle cellulaire, seulement 48 heures après la blessure. [467] De plus, dans l'aorte, une blessure induite par ballon permet l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la croissance cellulaire tels c-fos et c-jun qui sont responsables du contrôle de la progression du cycle cellulaire. En effet, c-fos et c-jun sont considérés comme des facteurs de transcription et ensemble, ils activent la transcription d'une multitude de protéines impliquées dans la différenciation et prolifération cellulaire. [112] Par contre, en situation diabétique, des études contradictoires réalisées *in vitro* ont démontré aussi bien une augmentation qu'une diminution de la prolifération des CML. [241, 468-471] Dans notre étude, nous avons utilisé le marqueur cellulaire PHH3 qui est spécifiquement activé lors de la phase G2 du cycle cellulaire. Nous avons trouvé qu'une sous-population de CML exprimant Nestin avait subi une phosphorylation de l'histone 3, indiquant une activité mitotique dans la paroi cellulaire des carotides et des aortes de rats adultes en absence de pathologie. En situation diabétique, la diminution de l'expression de Nestin est concomitante à la diminution du nombre de cellules Nestin⁺PHH3⁺, autant dans la carotide que dans l'arche aortique des rats DT1. Cette diminution importante de la phosphorylation de l'histone 3 correspond à une diminution importante de l'activité mitotique des CML en condition d'hyperglycémie *in vitro*. Dans la paroi vasculaire, les CML qui prolifèrent subissent une diminution de l'expression des protéines contractiles et une augmentation de l'expression de protéines non contractiles. [459, 472] Cette dédifférenciation en un phénotype prolifératif joue un rôle important dans le remodelage lors des complications vasculaires liées au diabète. Ainsi, lors de l'instauration du diabète l'atteinte vasculaire est telle que les cellules de la paroi vasculaire ne pourront plus s'ajuster aux changements hémodynamiques se produisant et perdront leur capacité

d'adaptation. Il peut survenir alors des complications vasculaires et une augmentation de la prolifération des CML, par exemple pendant le développement de plaques d'athérosclérose ou encore lors du remodelage de la paroi vasculaire suite à l'instauration de l'hypertension en situation diabétique.

Dans notre étude, nous avons analysé *in vivo et in vitro* le phénotype des CML des artères carotidiennes et aortiques. Puisque la prolifération dépend du phénotype, les protéines contractiles α -SMA et caldesmone ont été utilisées comme marqueurs lors d'une analyse en immunofluorescence *in vivo*. Les carotides et les aortes des rats Sham et DT1 démontrent un marquage similaire pour ces marqueurs. (Résultats non montrés) Donc, la perte d'expression de Nestin dans les CML isolées de carotides et d'aortes ne semble pas affecter le phénotype contractile *in vivo* dans les vaisseaux analysés deux semaines suivant l'induction du DT1. Il est possible que la prolifération des CML ne requière pas une dédifférenciation cellulaire ni une perte des protéines contractiles. En effet, Lee et al., a observé que la prolifération et la différenciation des CML se produisent simultanément durant le développement des vaisseaux sanguins. [473] Il est possible que l'activité mitotique observée dans les carotides et les aortes de rats adultes sains se fasse de la même façon. De plus, il est à noter qu'un lien de causalité direct entre l'établissement d'une pathologie vasculaire diabétique et le changement phénotypique des CML *in vivo* n'est pas clairement établi. [474]

Par la suite, les CML isolées de carotides et d'aortes de rats sains ont été analysées pour l'expression des protéines contractiles α -SMA, SM-22 α et caldesmone. Les CML de premier et deuxième passages ont été utilisées pour minimiser la perte du phénotype contractile. Nous avons analysé *in vitro* l'impact de l'hyperglycémie sur le changement de phénotype des CML. L'expression de Nestin diminue dans les CML de carotide après un traitement hyperglycémique (D-glucose 30mM) de 24 heures alors qu'elle ne change pas avec les traitements contrôles (L-glucose 30mM (métaboliquement inactif) et mannitol 30mM (métaboliquement actif)). Un traitement prolongé à 48 heures diminue l'expression de Nestin dans les CML de carotides, mais ne semble pas avoir d'effet sur les CML de l'arche aortique *in vitro*. Toutefois, autant pour les CML des carotides que des aortes, le phénotype des CML ne semble pas affecté par le traitement au D-glucose après 24 heures. L'impact de l'hyperglycémie est spécifique à la modulation de l'expression de Nestin et peut être un signe

de la diminution de la capacité de prolifération des CML. Des données contradictoires sont recensées dans la littérature concernant l'impact du D-glucose sur la prolifération des CML *in vitro*. Certaines études ont rapporté qu'une forte concentration de D-glucose entraîne la prolifération de CML isolées d'aortes humaines et de rats ainsi que d'artères ombilicales [468-470] Une autre étude a rapporté que cet effet est médié par la diminution de l'activation de la PKC. [475] Alors que d'autres études n'ont relevé aucun effet mitogénique du D-glucose. Par exemple, une forte concentration de glucose sur les CML isolées d'artères humaines et porcines, n'entraîne pas de modulation de la prolifération cellulaire. [241, 471]

Par la suite, la capacité proliférative des CML *in vitro* a été analysée par l'incorporation de [³H] thymidine. Une forte concentration de D-glucose a permis d'inhiber la croissance des CML isolées de carotides et d'aortes se traduisant par la diminution de l'incorporation de [³H] thymidine. Cette diminution est corrélée avec une diminution de l'expression de Nestin dans les CML isolées de carotides et d'aortes soumises aux mêmes traitements. Afin de déterminer si la perte de l'expression de la protéine Nestin correspondait à une perte de la capacité proliférative des CML *in vitro*, nous avons utilisé un shARN contre Nestin. Ce shARN se lie à l'ARN messager de Nestin et empêche sa traduction en protéine. L'expression basale de la protéine Nestin est donc grandement diminuée suite à l'action du shARN. Ainsi, nous avons confirmé que la perte d'expression basale de la protéine Nestin correspondait à une diminution de la prolifération des CML isolées de carotides et d'aortes *in vitro*. Durant ces mêmes analyses, nous avons procédé à des essais d'incorporation de [³H] leucine, qui correspond à la synthèse protéique *de novo*. Nous cherchions à déterminer s'il y avait une augmentation de la synthèse protéique pouvant être associée avec une activité mitogénique plus importante. Les analyses ne nous ont pas permis de confirmer cette synthèse *de novo* de protéines. Il est toutefois possible que le traitement au D-glucose ait pu induire une réaction menant à la mort cellulaire, des mécanismes affectant évidemment la synthèse protéique. D'ailleurs, l'exposition cellulaire à une forte concentration de D-glucose mène à une augmentation de l'apoptose. [415] Dans la poursuite de notre étude, il serait alors pertinent d'évaluer l'impact du traitement au D-glucose sur l'activation des mécanismes d'apoptose et de la viabilité cellulaire des CML isolées de carotides et d'aortes traitées au D-glucose.

Au cours de ce projet, nous n'avons pas obtenu les mêmes résultats entre les CML de carotides et d'aortes. Est-il possible que la localisation de ces vaisseaux ait un impact important sur la prolifération *in vitro* ? Est-il également possible que les CML qui composent ces vaisseaux n'aient pas les mêmes réponses cellulaires puisqu'elles n'ont pas les mêmes origines ? Il a été suggéré, dans la littérature, que la divergence des observations faites avec les CML *in vitro* et *in vivo* sont dues à un nombre inégale de passages cellulaires et aux différents protocoles utilisés pour quantifier la prolifération des CML. Il est aussi probable que les CML possèdent des capacités prolifératives intrinsèques qui sont différentes entre les artères et les veines, mais également entre les différents lits vasculaires. [476] Dans notre modèle, l'hyperglycémie provoque une diminution de l'expression de Nestin *in vivo* et *in vitro*. La perte de l'expression ou la diminution de la phosphorylation de la PHH3 concomitante avec l'expression de Nestin, suggère une diminution de la capacité proliférative des CML des carotides et des aortes, et ce, avant la perte de la fonction endothéliale. La perte précoce de la capacité proliférative des CML les rendraient incapables de réagir aux divers stress (chimiques ou physiques) qui s'exercent sur la paroi des aortes et des carotides. Ainsi, nous pensons que le DT1 conditionne les CML à perdre leur capacité à participer au remodelage qui vise le rétablissement de l'homéostasie des vaisseaux atteints.

3.1.3 Implication de la protéine Nestin dans la régulation du cycle cellulaire

La prolifération et la différenciation des CML sont considérées comme des mécanismes opposés. En effet, la différenciation cellulaire est normalement accompagnée d'une sortie irréversible du cycle cellulaire. [477] [478] De plus, les facteurs qui stimulent la prolifération bloquent généralement la différenciation des CML. Cependant, certaines études tendent à démontrer que ces deux mécanismes d'action ne sont pas mutuellement exclusifs. En effet, la sortie du cycle cellulaire ne mène pas nécessairement à la différenciation des CML vasculaires. Par exemple, l'héparine, un puissant inhibiteur de la croissance des CML *in vitro*

et *in vivo*, n'a pas d'effets sur la différenciation des CML d'aortes humaines. [479] [480] [481] Il apparaît plutôt que les mécanismes de différenciation et de prolifération sont étroitement liés. En effet, la protéine kinase liée au cycle cellulaire 7 (*cdc7* pour *Cell division cycle 7-related protein kinase*) provoque la différenciation et la prolifération des CML suite à une stimulation au TGF- β . [482] La prolifération peut également être régulée par les protéines de filaments intermédiaires. Elles assurent généralement un rôle de structure cellulaire, mais peuvent également intervenir dans l'organisation des organites dans le cytoplasme. [1] Depuis peu, il a été démontré que les protéines de filaments intermédiaires sont impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Il a été établi qu'elles servent de protéine d'échafaudage pour des molécules impliquées dans la régulation de voie de signalisation. [483] Ces interactions régulent l'état de phosphorylation et l'assemblage des filaments intermédiaires, mais également l'activité des protéines kinases du cycle cellulaire. [484-486] Les protéines de filaments intermédiaires interviendraient dans différents processus dont la réponse à un stress, la survie et la croissance cellulaire. [484-486] D'ailleurs, de récentes études suggèrent un rôle de Nestin dans la distribution et l'organisation de facteurs de régulation de la prolifération, de la survie et de la différenciation cellulaire. [384, 487-489]

L'expression de la protéine Nestin peut affecter plusieurs mécanismes cellulaires comme la progression du cycle cellulaire, la survie, et la régulation de voies de signalisation dans les cellules cancéreuses. En effet, la régulation à la baisse de la protéine Nestin dans ces cellules permet l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G2/M et accroît l'apoptose dans les cellules cancéreuses *in vitro*. [405] Au niveau musculaire, la régulation génique dirigeant la sortie du cycle cellulaire ainsi que l'induction de la différenciation myogénique est grandement affectée par l'expression de la protéine Nestin. [422] Dans notre étude, la dégradation ou la perte d'expression de la protéine Nestin représente un évènement précoce dans la maladie vasculaire en situation de DT1. Le nombre de CML qui se divise activement dans la paroi des carotides et des aortes diminue suite à l'apparition de l'état l'hyperglycémique, comme le démontre la réduction du nombre de CML PHH3⁺Nestin⁺ dans les carotides et les aortes.

3.1.3.1 L'interaction de la protéine Nestin avec des protéines du cycle cellulaire

Une protéine d'intérêt dans les interactions avec la protéine de filament intermédiaire Nestin et le cycle cellulaire est la cycline dépendante de la protéine kinase 5 (CDK5 *pour cyclin-dependent kinase 5*). La CDK5 est une protéine régulatrice clé dans le développement et la fonction neuronale. [417, 490, 491] De plus, il a été démontré que la protéine CDK5 joue un rôle dans la modulation de la maturation cellulaire, la différenciation, la migration et l'apoptose d'une variété de cellules telles que les cellules neuronales, endothéliales, musculaires et du pancréas. [492-494] CDK5 est également un régulateur important de la différenciation, de l'organisation et de la transduction de signal dans les CML. [419, 420, 495] L'interaction de CDK5 et de sa protéine d'échafaudage Nestin permet l'organisation, la stabilité et l'activité du complexe signalétique CDK5 /p35 impliqué dans la différenciation myogénique au cours du développement. [414] (Voir Figure 16. Rôle régulateur de Nestin dans le cycle cellulaire des myocytes.)

De plus, puisque la protéine Nestin joue un rôle dans la régulation de CDK5, une protéine du cycle cellulaire impliquée dans la maturation des cellules, il est possible que la diminution de l'expression de Nestin intervienne dans l'arrêt de la progression du cycle cellulaire des CML via la régulation à la hausse de CDK5. Les myoblastes non-différenciés expriment fortement Nestin, mais très faiblement les facteurs CDK5 et p35. La protéine Nestin étant impliquée dans la différenciation cellulaire par son interaction avec CDK5 et la régulation de la formation du complexe CDK5/p35, il a été démontré que l'inhibition de l'activité kinase de CDK5 est impliquée dans la régulation du renouvellement de Nestin. En effet, la phosphorylation de Nestin mène à son ubiquitination et à sa dégradation durant la différenciation myogénique. [414] La phosphorylation de Nestin par CDK5 accroît la solubilité de Nestin ainsi que sa désorganisation dans la cellule. [370] L'état de phosphorylation de Nestin ainsi que son interaction avec le complexe CDK5 et p35 serait une voie intéressante dans la compréhension des mécanismes impliquant Nestin dans la prolifération des CML dans les carotides et les aortes.

3.1.3.2 Les protéines Nestin, CDK5 et p35 dans les cellules musculaires lisses vasculaires en situation diabétique.

L'hyperglycémie accroît le nombre de cellules sénescents, inhibe l'activité de la télomérase, augmente la proportion de cellules en phase G0/G1 et réduit celle en phase S. [496] Toutefois, lors d'une atteinte vasculaire comme lors du développement de plaques d'athérosclérose, les CML vasculaires prolifèrent anormalement. L'hyperglycémie, les facteurs de croissance et les cytokines stimulent alors l'activation du cycle cellulaire des CML. [497] [498] Dans notre étude, l'hyperglycémie entraîne une perte de la capacité proliférative des CML au niveau des carotides et des aortes que ce soit *in vivo* et *in vitro*. Nous avons débuté l'analyse de l'expression des protéines CDK5 et p35 dans les CML isolées de carotides et d'aorte de rats sains. L'expression protéique de CDK5 et p35 est faible dans les CML et n'a pas pu être observé par immunobuvardage de type Western en raison du manque de sensibilité de la technique. Toutefois, nos résultats préliminaires, obtenus en immunofluorescence avec les CML des carotides, nous ont permis d'observer que le niveau basal de CDK5 (Voir Annexe 2 Figure 2. Expression de CDK5 dans les cellules du muscle lisse vasculaire.) et p35 (Voir Annexe 2 Figure 3 L'hyperglycémie inhibe la translocation de p35 dans les cellules du muscle lisse vasculaire) est très bas. Une stimulation au FBS augmente la prolifération des CML et accroît l'expression protéique de CDK5 et de p35. Lors de cette stimulation, nous avons observé une localisation cytoplasmique de CDK5 lorsque les CML isolées des carotides prolifèrent. Il a été démontré que la présence et l'activité de CDK5 pouvaient être autant nucléaires que cytoplasmiques et qu'une localisation différente avait des conséquences opposées. En effet, la localisation nucléaire de CDK5 peut être associée à une toxicité alors que sa localisation cytoplasmique est associée à des effets protecteurs. [499] Par exemple, en situation de stress oxydant, la présence de Nestin maintient le complexe CDK5 /p35 dans le cytoplasme ce qui accroît la stabilité de p35 et réduit la production de p25. [414] La protéine p25 est une protéine activatrice qui résiste à la dégradation et permet au complexe CDK5/p35/p25 de résister à la dégradation protéique. Il est possible qu'un traitement avec une forte concentration de D-glucose entraîne le même phénomène de rétention cytoplasmique du complexe CDK5/p35. Cependant, nos résultats préliminaires obtenus avec un traitement au D-

glucose ne nous ont pas permis d'observer un changement d'expression ni de la localisation de la protéine CDK5. Bref, bien que la protéine CDK5 soit connue pour interagir avec la protéine Nestin et qu'elles forment ensemble une boucle de rétrocontrôle, dans nos expériences avec les CML isolées de carotides traitées au D-glucose, la protéine CDK5 ne semble pas être impliquée de façon prédominante. Des études complémentaires pour déterminer la modification de l'expression de CDK5 ainsi que des états de phosphorylation des protéines sont à privilégier dans la poursuite de l'étude de l'implication de la protéine Nestin dans les mécanismes de prolifération cellulaire des CML au niveau des carotides et des aortes.

Une relation inverse existe entre l'expression de la protéine Nestin et CDK5 durant la différenciation neuronale [357, 500] et musculaire. [358, 419, 501] Lorsque Nestin est régulée à la baisse, CDK5 est activée. Nos résultats préliminaires tendent à infirmer cette relation puisque les CML isolées des carotides traitées avec le FBS, expriment fortement Nestin et que l'expression de la protéine CDK5 est augmentée comparativement avec la condition basale, soit le milieu de culture seul. De plus, l'utilisation de la roscovitine, un inhibiteur de CDK5, nous permettrait de déterminer s'il y a une interaction fonctionnelle entre Nestin et CDK5 dans nos CML vasculaires. Il nous serait également possible de déterminer si CDK5 est réellement impliquée dans la diminution de l'expression de Nestin en situation de DT1 comme c'est le cas pour d'autres types cellulaires. [502]

Nous avons également procédé à une analyse en immunofluorescence de l'expression de p35 dans les CML isolées des carotides et des aortes. La protéine Nestin exerce également son effet directement sur l'ubiquitination et la dégradation de p35. En parallèle de l'activité de CDK5, Nestin détermine la séquestration et le renouvellement de p35. [414] Nous avons observé que lorsque les CML prolifèrent la protéine p35 est retrouvée au niveau cytoplasmique et nucléaire. Un traitement au D-glucose empêche la translocation nucléaire de p35. (Voir Annexe 2 Figure 3 L'hyperglycémie inhibe la translocation de p35 dans les cellules du muscle lisse vasculaire) Il est possible qu'une translocation au noyau soit nécessaire pour que le complexe CDK5/p35 puisse activer les mécanismes de différenciation ou de division cellulaire. Comme il a été possible d'observer un changement de localisation de la protéine p35 sans corrélation avec celle de la protéine CDK5, il est possible que la protéine p35 présente un intérêt beaucoup plus grand dans la poursuite de l'étude de l'implication de la

protéine Nestin dans les processus de prolifération cellulaire dans les CML de la paroi des carotides et des aortes. Il est également possible que la protéine p35, comme CDK5, ait des effets différents selon sa localisation cytoplasmique et nucléaire. Il a été démontré qu'en situation de stress oxydant, la présence de Nestin maintient le complexe CDK5 /p35 dans le cytoplasme augmentant la stabilité de p35. [414] Nos résultats préliminaires semblent indiquer qu'une réaction similaire est produite dans les CML des carotides par un traitement au D-glucose. Nous observons que p35 demeure dans le cytoplasme. Toutefois il est impossible de conclure à une augmentation de sa stabilité ou d'un changement dans la formation de p25. D'autres analyses de l'interaction entre Nestin/p35 ainsi que sur l'état de phosphorylation de ces protéines sont nécessaires afin de déterminer si ces interactions sont impliquées dans l'inhibition de la prolifération des CML en situation diabétique.

3.2 Implication de la protéine Nestin dans le remodelage cardiovasculaire chez les rats hypertendus.

L'hypertension est un facteur de risque important dans le développement des maladies cardiovasculaires. [503] Elle entraîne des altérations importantes au niveau du système cardiovasculaire et contribue à la dysfonction cardiaque et vasculaire. Ces changements se traduisent par des modifications hémodynamiques, moléculaires et morphologiques dans le cœur et les vaisseaux. L'hypertension provoque aussi une surcharge de pression sur le cœur qui subit un remodelage afin de s'ajuster à l'augmentation de la post-charge. Ces modifications se répercutent également au niveau des vaisseaux qui subiront un remodelage de leur paroi afin de s'adapter aux changements de pression sanguine qui s'applique désormais. Dans cette étude, nous avons procédé à une caractérisation des changements survenant dans les artères de gros calibres, dont les artères carotidiennes et aortiques ainsi que dans le cœur dans un modèle d'hypertension induite par une constriction aortique abdominale surrénale. (Voir Annexe 1 Modèles animaux : 1.2 Constriction aortique abdominale surrénale chez le rat)

3.2.1 Effet de la constriction aortique abdominale surrénale sur le système cardiovasculaire du rat

La réduction de la lumière d'un vaisseau situé près des reins entraîne une diminution de l'apport sanguin à ces organes résultant en des changements de pression sanguine. Le premier modèle de constriction vasculaire fut un modèle canin de constriction rénovasculaire qui fut utilisé afin d'étudier les effets de l'hypertension. [504] Il existe différentes variantes de ce modèle soit la constriction rénale unilatérale, bilatérale ou encore une constriction au niveau de l'aorte abdominale. [347] (Révisé dans [505]) Il a été démontré que ces techniques

induisent une hypertension chez le rat [506], le lapin [507], le chien [508], le porc [509], les singes [510], et la souris [511]. L'induction de l'hypertension suite à une constriction aortique abdominale surrénale affecte la totalité du système cardiovasculaire dans notre modèle de rat. La réduction de la lumière de l'aorte en amont de l'artère rénale entraîne une diminution de l'apport sanguin aux reins. Les cellules juxtaglomérulaires libèrent alors une plus grande quantité de rénine. [508] (Voir section 1.3.2 Le système rénine-angiotensine-aldostérone) En effet, il a été démontré que la diminution de la pression de perfusion rénale provoque l'augmentation de la synthèse de rénine et d'ang II via un effet vasculaire direct qui augmente la résistance périphérique et la pression sanguine. [512] L'augmentation de la pression dans le modèle de constriction rénovasculaire est due à la présence de l'ang II qui est sécrétée en plus grande quantité. Il est logique de penser que l'ang II joue un rôle similaire dans notre modèle de constriction aortique. McCubbin et al. [513] a démontré qu'une infusion d'ang II systémique permet l'induction d'une augmentation progressive de la pression artérielle par un mécanisme de stress oxydatif. [514] La constriction de l'aorte entraîne également une augmentation de la post-charge et, de ce fait, les changements hémodynamiques et morphologiques observés dans notre modèle sont grandement dus à l'augmentation d'une contrainte mécanique.

3.2.1.1 Les vaisseaux de rat hypertendus

Il existe une relation entre la pression exercée sur la paroi des vaisseaux sanguins et leur structure. En effet, il a été démontré que la pression sanguine exercée à chaque pulsation (pression systolique) ainsi que le rythme cardiaque sont d'une importance capitale dans la définition de la structure des vaisseaux sanguins. [515] L'effet de l'hypertension peut entraîner une restructuration des composants de la paroi des vaisseaux sanguins. Un remodelage ainsi que la fibrose vasculaire sont apparents dans les vaisseaux en situation d'hypertension. L'hypertension entraîne des altérations importantes au niveau vasculaire, entre autre, une dysfonction endothéliale, une hypertrophie et/ou une hyperplasie des CML ainsi qu'un dépôt de collagène composant la fibrose. Nous avons procédé à une caractérisation des changements

morphologiques survenant dans les artères carotidiennes et aortiques des rats afin de déterminer l'impact de l'hypertension induite par une constriction aortique abdominale surrénale sur le remodelage de la paroi.

3.2.1.1.1 Les changements morphologiques

L'effet de l'augmentation de la post-charge ainsi que de la force de contraction se répercute également dans l'augmentation de la pression artérielle. Afin de s'ajuster à cette augmentation de pression qui est exercée sur la paroi des vaisseaux, d'importants changements morphologiques se produisent. D'ailleurs, il a été démontré que le ratio média/lumière est corrélé de manière décroissante avec la pression pulsatile (*pulse pressure*) puis avec la pression systolique, la pression moyenne et la pression diastolique. [515] La réduction de l'amplitude et de la fréquence cardiaque sont également d'une grande importance dans la prévention du développement d'une résistance anormale dans la structure des artères en situation d'hypertension. [515] La variation des facteurs mécaniques qui s'appliquent sur la paroi vasculaire représente les facteurs les plus importants dans la modulation du ratio média/lumière.

Le remodelage hypertrophique est prédominant dans les modèles animaux d'hypertension. Ce phénomène se retrouve essentiellement dans les artères de résistance dans les modèles où le SRAA joue un rôle important comme dans les rats spontanément hypertendus [516] et dans les modèles de constriction rénovasculaire [517]. Dans les artères plus petites, la résistance vasculaire périphérique est augmentée par un phénomène de raréfaction de la densité des artérioles qu'il soit temporaire (fonctionnel) ou permanent (structurel). Ces changements sont observés dans les modèles animaux d'hypertension comme dans les rats Dahl [518], lors d'une constriction bilatérale, [519] lors d'une constriction unilatérale [520], dans les rats DOCA, [521] et dans les rats spontanément hypertendus. [346] Le changement le plus commun qui est observé dans les artères de gros calibres en situation d'hypertension est le remodelage hypertrophique, qui est détecté par l'augmentation du diamètre du vaisseau, l'épaississement de la paroi et la diminution de la lumière vasculaire.

Cette hypertrophie peut impliquer une augmentation du nombre des CML (hyperplasie) [124] ou de leur taille (hypertrophie) [125] ou encore une combinaison des deux phénomènes. [126] Cet épaissement de la média peut également résulter d'une augmentation du dépôt de matrice extracellulaire qui se traduit par une augmentation de la fibrose. Il est donc possible d'observer une hypertrophie, une hyperplasie ou un réarrangement des éléments existants. Dans ce dernier cas, un nombre supérieur de couches cellulaires entrecoupées de fibres de collagène dans la paroi vasculaire est observé.

Dans notre étude, les vaisseaux étudiés ont tous subi un important remodelage. Tout d'abord, l'analyse des aortes abdominales à l'endroit où nous avons effectué la constriction nous permet d'observer les grands changements qui s'opèrent suite à la chirurgie. (Voir Annexe 2 Figure 4A. Changements morphologiques des artères carotidiennes et aortiques suite à une constriction aortique abdominale surrénale) La morphologie des artères normales, en comparaison avec l'artère qui a subi un remodelage important, est significativement différente. En effet, les analyses morphologiques nous ont permis de constater que l'hypertension a entraîné un épaissement de 40% de la paroi des vaisseaux des rats hypertendus. L'hypertension a également entraîné une augmentation de l'aire de la média des vaisseaux de 85% pour la carotide, de 55% pour l'arche aortique et de 34 % pour l'aorte thoracique en comparaison avec les rats Sham. (Voir Annexe 2 Figure 4B. Changements morphologiques des artères carotidiennes et aortiques suite à une constriction aortique abdominale surrénale) De plus, nous avons procédé au décompte des noyaux dans les carotides et les aortes de rats hypertendus. Cela nous a permis d'observer une augmentation du nombre de noyaux, indiquant une hyperplasie des CML en situation d'hypertension pour chacun des segments analysés. Toutefois, lorsque nous avons normalisé avec l'aire des vaisseaux, nous avons obtenu un nombre similaire de noyaux entre les rats Sham et les rats hypertendus, à l'exception de la carotide où le nombre de noyaux est demeuré supérieur pour les rats hypertendus. Cette observation suggère que l'augmentation de l'épaisseur ainsi que celle de l'aire de la paroi vasculaire sont dues à une hypertrophie des CML ainsi qu'à un dépôt de matrice extracellulaire. Exception faite pour les carotides où l'hyperplasie des CML semble prédominante à l'hypertrophie, il est possible que l'hypertrophie des CML au niveau aortique provoque les changements morphologiques de la paroi vasculaire. De plus, il est possible qu'il

y ait une augmentation de la ploïdie des CML. Cependant, sans marqueur de membrane, il est difficile d'établir si l'augmentation du nombre de noyaux est due à une augmentation du nombre de cellules ou à l'augmentation de la proportion des cellules qui sont diploïdes ou plus. De plus, il a été démontré que la ploïdie augmente proportionnellement à la pression sanguine. [522] Il est donc possible que dans la carotide, l'augmentation de la ploïdie, qui reflète la prolifération des CML, soit plus importante que dans l'aorte.

Un autre changement morphologique important qui est observé dans les artères des rats hypertendus est la fibrose. Cette fibrose se traduit par une augmentation du contenu en collagène qui altère les propriétés fonctionnelles et mécaniques des vaisseaux. Cette augmentation contribue à l'amplification de la rigidité des vaisseaux et à leur perte de réactivité. En situation d'hypertension, il est considéré bénéfique pour les CE et les CML que la paroi vasculaire soit plus rigide, de façon à réduire la tension exercée sur la paroi lors de l'augmentation de la pression sanguine. [523] Dans les artères normales, le collagène de type I et II sont les constituants majeurs de la paroi vasculaire. [524] Les changements dans l'organisation ainsi que dans l'expression des protéines de la matrice extracellulaire qui se produisent durant le remodelage affectent le phénotype des CML [525] et favorisent leur prolifération. Par exemple, le collagène de type I sensibilise la réponse des CML à certains facteurs de croissance comme le PDGF-B. [526]

Les forces mécaniques peuvent augmenter l'expression de protéines de la matrice extracellulaire dans la paroi vasculaire des carotides et des aortes. L'application d'une force mécanique physiologique *in vitro* sur des CML isolées d'aortes humaines induit une augmentation de la synthèse de collagène, de la fibronectine et des MMP. [527] Ceci indique que la force mécanique appliquée sur les CML est un facteur de causalité dans le remodelage actif de la paroi vasculaire par les CML. [527] Il a été démontré que la synthèse de collagène est augmentée par les CML lors de l'hypertension. [528] L'accumulation de collagène peut ainsi altérer la relation passive pression/diamètre des artères lors de l'application de pressions plus élevées et induire une augmentation progressive de la rigidité de la paroi vasculaire. [529] Dans les carotides et les arches aortiques analysées, nous avons observé une augmentation du contenu en collagène de 38% et de 22% respectivement. De plus, lors du prélèvement des

artères, la rigidité des vaisseaux était observable à l'œil. (Voir Annexe 2 Figure 5. Analyse de la fibrose vasculaire.)

3.2.1.1.2 L'impact de l'angiotensine sur l'hypertrophie des vaisseaux

L'ang II a des effets directs sur les CE et sur les CML des vaisseaux sanguins. En effet, l'ang II stimule la production de collagène de type I et des protéines de la matrice extracellulaire via les récepteurs AT1 et AT2. [530] L'ang II est un vasoconstricteur puissant dans les vaisseaux périphériques et induit la croissance des CML, stimulant ainsi leur hyperplasie. [531] De plus, l'ang II peut causer l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et une hypertrophie des CML isolées de l'aorte des rats. [522] L'activation des récepteurs AT1 serait impliquée dans le remodelage des protéines de la matrice extracellulaire alors que les récepteurs AT2 seraient impliqués dans l'hypertrophie et l'hyperplasie des CML. [532] [533] Il a été démontré que l'accumulation de collagène est atténuée par l'inhibition de ACE [534] ou par les antagonistes de l'aldostérone, démontrant ainsi un rôle pour les composants du SRAA. [535] D'ailleurs, les vaisseaux sanguins, tout comme le cœur, possèdent un SRAA local. [536] En effet, les vaisseaux sont capables de produire de l'ang II *de novo*. Cependant, cette production vasculaire locale n'a qu'une faible contribution sur l'effet de l'ang II sur les vaisseaux. Ce système utilise la rénine qui est présente dans la circulation sanguine. [537] D'ailleurs, l'utilisation d'un inhibiteur de ACE a préalablement établi l'importance de ce système dans la maintenance de la pression sanguine élevée. [538] Il a également été démontré que dans un modèle de constriction rénovasculaire, il y a une augmentation de la conversion de l'ang I en ang II de façon locale dans la paroi des vaisseaux sanguins. [539] Une quantification de la concentration de l'ang II systémique et locale ainsi que l'utilisation d'inhibiteur de ACE auraient été nécessaires afin de déterminer l'apport du SRAA vasculaire dans le remodelage des carotides et des aortes dans notre modèle. Toutefois, comme notre modèle repose également une augmentation de la post-charge, il n'est pas certain que le SRAA ait joué un grand rôle dans le remodelage, mais un rôle plus important dans l'hypertension et dans la formation de la fibrose vasculaire.

3.2.2 Effet de l'hypertension sur l'expression de Nestin dans la paroi vasculaire.

Les vaisseaux ne subissent pas tous les mêmes changements morphologiques en situation d'hypertension. Alors que les gros vaisseaux subissent un remodelage de leur constituant, les capillaires vont subir un processus de raréfaction fonctionnel ou structurel, avec pour conséquences une diminution de la densité cellulaire par unité de tissus. [540] D'ailleurs, cette raréfaction a été observée chez les patients souffrants d'hypertension. [10] Le processus de remodelage mène à une altération de la relâche des vasodilatateurs normalement présents. [12] La lumière des vaisseaux se rétrécit ce qui augmente la résistance périphérique même lorsque le vaisseau atteint sa dilatation maximale, soit en absence de tonus vasculaire. [523] Le remodelage vasculaire regroupe l'altération de la fonction et du phénotype des CE et des CML ainsi qu'un changement dans la structure et la composition des protéines de la matrice extracellulaire menant à l'altération du ratio lumière/épaisseur de la paroi vasculaire [128] Le remodelage important subit par les vaisseaux sanguins représente une réponse d'adaptation suite aux changements hémodynamiques. Il existe une corrélation entre l'hypertrophie vasculaire et l'hypertension. [541] En effet, l'augmentation de la pression sanguine entraîne une restructuration des composants de la paroi vasculaire. Les CE et les CML ainsi que les fibroblastes présents dans la paroi vasculaire subissent ces modulations. Cela se traduit en une altération de la compliance ainsi qu'une perte de la réactivité des vaisseaux. Dans notre étude, nous avons analysé l'expression de la protéine Nestin dans les artères carotidiennes et aortiques des rats hypertendus suite à une constriction aortique abdominale surrénale. Notre étude est la première démontrant une relation entre Nestin et le remodelage de la paroi vasculaire en situation d'hypertension. Ces vaisseaux subissent de grandes altérations morphologiques en réponse à une augmentation de la pression sanguine. Nous avons cherché à déterminer si les changements vasculaires secondaires à l'hypertension étaient caractérisés par une augmentation de l'expression de la protéine Nestin dans les cellules vasculaires.

3.2.2.1 L'expression de Nestin dans les cellules endothéliales

L'analyse de l'expression de marqueurs endothéliaux (CD31 et eNOS) nous a révélé que ces molécules ne semblaient pas affectées par l'hypertension induite par la constriction aortique abdominale surrénale sur une période de temps de deux semaines chez nos rats. Comme nous avons observé une grande augmentation du contenu en collagène ainsi qu'une plus grande rigidité vasculaire, il est raisonnable de penser que ces changements ont pu affecter la fonction endothéliale. Il a été démontré que la relaxation dépendante de l'endothélium est réduite dans les artères de différents modèles animaux d'hypertension, comme les rats spontanément hypertendus. (Révisé dans [108]) De façon similaire, la réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium est grandement atténuée chez l'humain hypertendu. [84] Cette perte de réactivité est attribuée à un déséquilibre dans la relâche des EDRF et des EDCF. (Révisé dans [108])

De façon surprenante, les analyses en microscopie confocale suggèrent une augmentation de l'expression de Nestin dans l'endothélium des artères carotidiennes et aortiques de rats hypertendus. Associée à une capacité proliférative, l'expression de Nestin peut être impliquée dans l'augmentation de la prolifération des CE en situation d'hypertension. Une élévation de la pression sanguine peut mener à l'altération de la fonction endothéliale et même à la mort de ces cellules. Il est donc possible que les CE présentent une capacité proliférative augmentée, du moins lors de l'instauration de l'hypertension, en réponse aux changements hémodynamiques qui s'opèrent. Il est important de se questionner à savoir si ces CE sont encore fonctionnelles, si elles perdent leur fonctionnalité et doivent être remplacées rapidement et surtout si c'est ce mécanisme qui induit l'augmentation de l'expression de Nestin dans les CE. Pour répondre à ces questions, il est nécessaire de faire des analyses de la réactivité vasculaire en chambre d'organe en plus d'analyser la prolifération *in vivo* des CE par l'évaluation de l'activité de leur cycle cellulaire. De plus, il serait nécessaire d'isoler les CE des carotides et des arches aortiques afin de déterminer l'expression de la protéine Nestin et d'analyser les différents stimuli qui peuvent moduler son expression. Ces analyses nous permettraient ultimement d'identifier les voies de signalisation qui sont impliquées dans l'expression de la protéine Nestin. D'ailleurs, des résultats préliminaires,

obtenus suite à l'isolement de CE primaire de souris, démontrent une expression faible de Nestin *in vitro*. (Résultats non montrés)

Dans notre modèle, il serait également intéressant de déterminer si l'ang II peut moduler l'expression de Nestin dans les CE. Il a été déterminé que l'ang II exerçait des effets négatifs sur les CE telle que la régulation de la production de NO par l'activité de la eNOS. [70] L'ang II augmente le stress oxydatif qui affecte la relaxation et la fonction des CE. [337] En effet, les ROS induisent l'apoptose, augmentent l'état thrombotique [338] et inflammatoire [340] en plus d'induire l'expression des molécules d'adhésion. [339] De ce fait, l'ang II exerce des effets plutôt négatifs sur l'endothélium et il est difficile de déterminer quel rôle peut jouer l'augmentation de Nestin lors d'une stimulation à l'ang II dans les CE. Comme l'ang II peut avoir des effets directs et indirects, une autre molécule du SRAA peut avoir des effets sur les CE, par exemple l'aldostérone. Cette molécule intervient dans l'inhibition de la vasodilatation médiée par le NO dépendant de l'endothélium. [542] De plus, *in vitro*, une forte concentration d'aldostérone augmente la taille, la rigidité ainsi que la perte de protéines dans les CE. [543] L'hypertrophie des CE ainsi produites peut entraîner l'augmentation de l'expression de la protéine Nestin puisqu'elle sert de protéine d'échafaudage à de certaines molécules de signalisation. [422] De ce fait, une plus grande expression de Nestin peut être attribuée, non à une hyperplasie des CE mais à leur hypertrophie.

Il est également possible que les forces mécaniques soient suffisantes pour induire un changement de l'expression de Nestin dans les CE. Comme Nestin est une protéine de filaments intermédiaires son rôle de structure peut être grandement sollicité en réponse aux changements hémodynamiques qui surviennent en situation d'hypertension. Une augmentation de cette protéine de structure peut permettre aux CE de conserver leur forme et leur organisation interne. D'ailleurs, l'augmentation de la force mécanique peut également stimuler l'expression de nouvelles molécules impliquées dans la croissance cellulaire, l'inflammation et la coagulation. [544]

3.2.2.2 L'expression de Nestin dans les cellules musculaires lisses *in vivo*

Les forces mécaniques (force de cisaillement et l'effet du stress sur la circonférence de la paroi vasculaire) ainsi que le stade hypoxique sont déterminants dans le remodelage vasculaire en situation d'hypertension. [545] Le remodelage vasculaire observé est dû aux changements dans la média, principalement caractérisé par la prolifération et l'hypertrophie des CML. [546] Nous avons observé une augmentation de l'expression de Nestin dans les carotides et dans les arches aortiques des rats hypertendus suite à une constriction aortique abdominale surrénale. Des analyses par microscopie confocale nous ont permis de déterminer que l'expression de la protéine Nestin augmente dans une sous-population de CML chez les rats hypertendus. Cette augmentation est observée autant dans les carotides que dans les arches aortiques analysées. De façon intéressante, nous avons pu établir une corrélation entre l'expression protéique de Nestin par les CML de la carotide et les valeurs de la pression artérielle et systolique ventriculaire. Cette corrélation est également obtenue avec l'expression de la protéine Vimentine par les CML de la carotide, le partenaire protéique de Nestin dans la paroi vasculaire. La protéine Vimentine est la protéine de filaments intermédiaires qui est retrouvée en plus grande quantité dans les cellules en général. Elle est également retrouvée dans les CE, les CML et les fibroblastes d'une grande variété de vaisseaux sanguins tels les artères élastiques et les artérioles. [369] La protéine Vimentine forme un réseau qui aide à garder le noyau et les organelles à des places définies dans la cellule. De plus, elle est fréquemment associée avec les microtubules qui sont importants dans la division cellulaire. [363] Il est intéressant de constater que l'augmentation de Nestin est concomitante avec le partenaire avec lequel elle se dimérise. Toutefois, cette corrélation entre la pression sanguine et l'expression de la protéine Nestin n'est pas obtenue dans l'arche aortique des rats hypertendus. Malgré une augmentation de l'expression de Nestin et de Vimentine, il n'existe pas de corrélation entre l'expression protéique et la pression sanguine dans l'arche aortique des rats hypertendus. D'ailleurs, l'expression de Nestin augmente dans la paroi de l'arche aortique, mais cette augmentation est davantage variable comparativement à celle observée dans la carotide. Afin d'expliquer cette différence entre ces deux artères élastiques, il est important d'analyser leur origine, leur fonction et leur localisation. Bien que ce soit des artères

élastiques qui sont à proximité l'une de l'autre et que les CML qui les composent soient issues de la crête neurale, leur développement n'est pas le même. (Voir Figure 2. Changements morphologiques du cœur et remodelage des vaisseaux au cours du développement chez les vertébrés.) Cette différence dans le développement des artères peut contribuer à induire des différences au niveau de la composition de la paroi vasculaire et ainsi influencer sa réponse aux changements hémodynamiques. Cependant, leur emplacement ainsi que la façon dont le sang est propulsé contre les parois vasculaires jouent un grand rôle dans leur réponse à l'hypertension. En effet, l'arche aortique subit la variation de la pression directement sur sa paroi lorsque le sang est éjecté du ventricule gauche alors que le sang qui se retrouve propulsé dans la carotide a déjà perdu de sa vitesse. La répercussion de la pression sanguine sur la paroi de la carotide est moins importante que sur celle de l'arche aortique ce qui permet à la carotide de potentiellement mieux s'adapter aux changements de pression sanguine contrairement à l'arche aortique qui subit des altérations sans avoir le temps nécessaire pour s'adapter. D'ailleurs, il a été démontré que la prolifération des CML décroît à mesure que les segments aortiques s'éloignent du cœur dans un vaisseau sain. Il est possible qu'en situation d'hypertension, cette fonction soit altérée ou perdue. Puisque l'expression de la protéine Nestin est associée à la capacité proliférative des cellules, si les CML de l'aorte peuvent répondre à l'augmentation de la pression sanguine, à long terme il est possible que les CML perdent cette faculté d'où une variation dans l'expression de la protéine Nestin. La tension cyclique qui résulte de la pression pulsatile produite par le cœur entraîne une distorsion cyclique dans la paroi vasculaire. [547] Les forces de compression peuvent également s'exercer sur la paroi vasculaire. Les forces mécaniques jouent un rôle important dans la modulation de la fonction et du phénotype cellulaire. L'impact de la pression cyclique sur les CML inclut l'altération de la prolifération, de l'alignement cellulaire et de l'expression des protéines contractiles. [547] Il est intéressant de constater que la réponse proliférative va dépendre du phénotype initial des CML. En effet, il a été observé que les CML ayant un phénotype contractile ont une réponse proliférative suite à l'application de forces mécaniques alors que les CML ayant un phénotype synthétique n'en ont pas. [548] Ce concept est intéressant puisqu'il supporte l'idée que ce n'est pas uniquement l'environnement mécanique qui affecte le phénotype cellulaire, mais également la réponse mécano-sensible qui elle-même dépend du phénotype des CML touchées par ces forces. [547] D'ailleurs, une stimulation

mécanique accroît l'expression des enzymes impliquées dans le remodelage vasculaire. [549] Il a été observé que les battements cardiaques, autant chez l'adulte (90 battements/min) que chez les nouveau-nés (165 battements/min), entraînent l'augmentation des MMP et du dépôt de collagène dans les parois vasculaires. [550] La structure physique du vaisseau est donc altérée par la pression sanguine qui s'exerce sur la paroi du vaisseau. De plus, des résultats similaires ont été obtenus *in vitro*. L'application d'une distension cyclique à long terme augmente la production d'élastine par les CML dans un modèle de matrice de collagène en trois dimensions. [551] Il est logique de suggérer que la force mécanique ainsi appliquée sur la paroi vasculaire stimule l'expression de la protéine Nestin impliquée dans la prolifération des CML de la carotide et de l'aorte. Cette augmentation de la prolifération des CML se ferait en fonction de l'augmentation de la pression sanguine afin de s'adapter à ces changements. La prolifération des CML de la carotide et de l'aorte se refléterait dans l'expression de Nestin, mais également en fonction de la pression qui est exercée sur la paroi. Afin de déterminer si les cellules exprimant la protéine Nestin sont bien engagés dans le cycle cellulaire, une analyse avec le PHH3 serait pertinente dans ce contexte afin de départager l'implication de la protéine Nestin dans les processus d'hyperplasie et d'hypertrophie qui sont possible dans les différents vaisseaux.

3.2.2.3 L'expression de Nestin dans les cellules musculaires lisses *in vitro*

Pour cette partie du projet, nous nous sommes intéressés à identifier les facteurs, impliqués dans le remodelage vasculaire, qui peuvent moduler l'expression de la protéine Nestin. Pour ce faire, les CML isolées de carotides et d'aortes de rats Sham ont été analysées pour l'expression des protéines contractiles α -SMA, SM-22 α et caldesmone afin de confirmer le phénotype des CML avant une stimulation avec différents facteurs pouvant moduler leur phénotype. Par la suite, nous avons analysé *in vitro* l'impact de l'ang II, du EGF et du TGF- β 1 sur le changement phénotypique des CML. Il est intéressant de constater que le phénotype des CML est maintenu et que seule la protéine Nestin est influencée par ces stimulations. Ainsi, une augmentation de l'expression de Nestin avec les trois traitements dans les CML

isolées des carotides et des aortes est observée. Cette expression est également associée à une augmentation de la prolifération cellulaire par ces différents traitements. Tout d'abord, l'ang II augmente l'incorporation de [³H] thymidine, associée à la division cellulaire, et de [³H] Leucine, associée la synthèse protéique. Ces deux synthèses peuvent être associées à une prolifération cellulaire. Mais la synthèse protéine peut également être associé à l'apoptose des CML. L'induction de l'apoptose des CML est également dépendante du phénotype cellulaire. En effet, il a été démontré que l'ang II induit l'apoptose des CML de formes épithéliales, mais non des CML fusiformes isolées d'aortes de rats. [552] Des analyses préliminaires de l'expression de Bax/Bcl-2 suggèrent qu'il n'y a pas de modulation de ces molécules suite au traitement. (Résultats non montrés) Donc, la synthèse protéique ne serait pas due à l'apoptose des CML, mais à un phénomène d'hyperplasie de ces cellules. De plus, l'ang II peut causer un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et une hypertrophie des CML. [553] Il a été démontré qu'un traitement à l'ang II induit l'hyperplasie des CML isolées de l'aorte de rats spontanément hypertendus, mais qu'il entraîne une hypertrophie des CML isolées de rats normaux. [554] Comme nos CML isolées des carotides et des arches aortiques proviennent de rats normaux, il est donc possible que nous observions une hypertrophie cellulaire suite au traitement à l'ang II. De ce fait, l'augmentation de l'incorporation de [³H] Leucine par les CML isolées des carotides et des arches aortiques pourrait être attribuée à une hypertrophie cellulaire. De surcroît, l'ang II peut stimuler à la fois de l'hyperplasie et de l'hypertrophie des CML *in vitro* et peut être associé à ce qui est observé *in vivo* dans l'arche aortique. Ainsi, *in vitro*, la stimulation de ces CML par l'ang II conduit à des réponses hypertrophiques et hyperplasiques.

Il a été démontré que des forces de cisaillement élevées augmentent le nombre de récepteurs à l'ang II. [555]. L'expression des récepteurs AT1 et AT2 n'a pas été analysée au cours de ce projet, mais il est possible que l'augmentation de la pression sanguine ainsi que de la concentration de l'ang II en circulation aient contribué à la modulation de ces récepteurs. Ce qui a pu entraîner une plus grande prolifération des CML et ainsi augmenter l'expression de la protéine Nestin. D'ailleurs, il a été démontré que l'utilisation d'un inhibiteur de ACE est efficace pour contrôler ou pour renverser le remodelage vasculaire qui n'est pas dépendant des effets hypertenseurs. [556] De cette façon, l'utilisation d'un inhibiteur de ACE permettrait de

déterminer si les effets vus *in vivo* seraient dus à l'ang II ou aux forces hémodynamiques qui s'exercent sur la paroi.

Les effets observés avec le TGF- β 1 peuvent être également liés à l'hyperplasie des CML. Le TGF- β 1 diminue l'incorporation de [3 H] thymidine, associée à la division cellulaire, et stimule l'incorporation de [3 H] Leucine, associée à la synthèse protéique, dans les CML des carotides. Ces résultats sont davantage associés à l'hyperplasie des CML qu'à la prolifération cellulaire. Les isoformes de TGF- β 1 sont essentiels dans l'induction du phénotype contractile. Il a été démontré qu'une stimulation au TGF- β 1 augmente l'expression des molécules contractiles comme la α -SMA, la SM-MHC et la SM-calponine *in vitro*. [102] Le TGF- β est parmi les facteurs de croissance les plus puissants pour la stimulation de la différenciation des CML. [557] Toutefois, les effets du TGF- β sur les CML restent controversés. Il a été rapporté que le TGF- β exerce des effets inhibiteurs sur la croissance des CML aortiques induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. [558] Cependant, Stouffer et al. a démontré que le TGF- β accroît la prolifération des CML aortiques [559], et ce, via les voies de signalisation Smad3, ERK et MAPK. [560] De plus, d'autres facteurs de croissance comme le PDGF, le FGF et le EGF ont démontré qu'ils pouvaient stimuler la prolifération des CML ou les maintenir avec un phénotype dédifférencié. [561] Dans notre étude, le TGF- β induit une augmentation de l'expression de Nestin sans toutefois accroître l'incorporation de [3 H] thymidine, associée à la prolifération cellulaire. Il est intéressant de constater qu'*in vitro*, le TGF- β pourrait jouer un rôle plus important dans l'hypertrophie que dans l'hyperplasie des CML. Sa contribution au remodelage vasculaire pourrait différer du rôle de l'ang II qui peut promouvoir à la fois l'hyperplasie et l'hypertrophie des CML. Ainsi, la prolifération des CML et le remodelage vasculaire sont les résultats d'une grande combinaison de facteurs qui peuvent stimuler l'expression de Nestin. Cette protéine peut être impliquée dans divers processus cellulaires qui ne sont pas encore identifiés à ce jour. En effet, son rôle potentiel dans l'hypertrophie des CML reste inexploré. Enfin, nous avons analysé l'impact d'un dernier facteur sur l'expression de la protéine Nestin, le EGF qui est déjà reconnu pour stimuler l'expression de Nestin. [354] Dans notre étude, le EGF augmente l'expression de Nestin, mais également l'incorporation de [3 H] thymidine, associée à la division cellulaire, et stimule l'incorporation de [3 H] Leucine, associée la synthèse protéique, dans les CML des carotides.

Ce traitement est impliqué dans la prolifération des CML mais peut également jouer un rôle dans leur hypertrophie. En effet, l'hypertrophie induite par une augmentation de la pression requière une interaction entre l'ang II et le récepteur EGF. (Révisé dans [562])

Dans la première étude, nous avons confirmé que la perte d'expression de la protéine Nestin correspondait à une diminution de la prolifération des CML *in vitro*. Dans cette deuxième partie de projet, nous avons utilisé le même shARN contre Nestin afin de déterminer si la stimulation avec l'ang II et le EGF pouvait dépendre de l'expression de Nestin. Nos résultats démontrent que la diminution de l'expression basale de Nestin entraîne une diminution de l'action de l'ang II et du EGF sur les CML isolées des carotides et des aortes. Ceci suggère donc que la protéine Nestin est impliquée dans les processus de remodelage vasculaire en situation d'hypertension.

3.2.3 Le cœur du rat hypertendu

L'ang II est un médiateur de SRAA et joue un rôle physiologique dans l'homéostasie cardiovasculaire. Il est également un facteur de croissance pour l'ensemble des cellules du cœur (CML, cardiomyocytes, CE et fibroblastes) sur lesquelles il peut exercer autant des effets bénéfiques que pathologiques. L'ang II est connu pour son rôle important dans la régulation physiologique du tonus vasculaire et de la pression sanguine. Cependant, une exposition chronique induit une hyperplasie et une hypertrophie des CML cardiaques, des cardiomyocytes ainsi qu'un remodelage cardiaque et une fibrose. [563, 564] Nous avons procédé à une analyse des cœurs des rats hypertendus afin de déterminer l'efficacité de la constriction aortique abdominale surrénale à induire des changements au niveau cardiaque.

3.2.3.1 Les changements hémodynamiques

Les facteurs hémodynamiques sont grandement altérés suite à la constriction aortique abdominale surrénale. Dans notre modèle, les changements hémodynamiques et morphologiques surviennent rapidement. En effet, ces changements sont apparus après deux semaines suivant la constriction aortique abdominale surrénale. Ce modèle repose sur l'augmentation de la post-charge, mais également sur l'action directe de l'ang II sur le cœur. Bien que le rythme cardiaque ne soit pas grandement différent entre les rats Sham et les rats hypertendus, la pression systolique est grandement augmentée. Lorsqu'une plus grande charge est appliquée sur le cœur, cela provoque une augmentation de la force de contraction du ventricule afin de préserver la fonction systolique. [1] Ainsi, nous avons constaté que les forces de contraction et de relaxation étaient augmentées deux semaines suivant l'induction de la constriction aortique abdominale surrénale. Une étude a aussi démontré que sur une plus longue période de temps, une rigidité ventriculaire s'installe et la fonction diastolique au repos demeure élevée dans un modèle de constriction rénovasculaire. La dysfonction diastolique est entraînée par une dilatation de la chambre ventriculaire et par une réduction de la fraction d'éjection. [565]

3.2.3.2 Les changements morphologiques

Deux changements morphologiques majeurs se produisent en situation d'hypertension soit l'hypertrophie ventriculaire concentrique et une augmentation de la fibrose cardiaque. Le cœur normal contient différentes populations cellulaires. Il contient des CE qui se retrouvent dans les vaisseaux sanguins qui irriguent le cœur et qui contrôle la réactivité vasculaire, dont les coronaires. [566] Il contient également les CML des coronaires et des artérioles du myocarde et qui, comme les CE, participent au contrôle de la réactivité vasculaire. [567] Le cœur contient également des fibroblastes qui sont responsables de la production et de la dégradation des protéines de structure, comme le collagène et l'élastine, dans l'interstice des cardiomyocytes. Les fibroblastes sont également responsables de la synthèse de collagène I et

III [568, 569] qui, dans le myocarde, constitue le réseau normal de protéines de structure. [570] Ces types de collagènes sont impliqués dans la fibrose interstitielle et périvasculaire dans le myocarde. [571] Dans notre modèle, l'hypertension induite par une constriction aortique abdominale surrénale mène à une hypertrophie cardiaque. (Voir Annexe 2 Figure 6. Hypertrophie du cœur) En effet, l'analyse morphologique des cœurs de rats hypertendus nous a permis de confirmer la présence d'une hypertrophie concentrique dans notre modèle d'hypertension. Il a été rapporté que la taille du cœur peut augmenter de 20 à 50 % en présence d'hypertension. [572] Dans notre étude, une augmentation de 40% de la circonférence totale des cœurs de rats hypertendus a été observée. De plus, ces cœurs ont subi un important remodelage du ventricule gauche. La circonférence de la chambre du ventricule gauche des rats hypertendus est 40% plus grande en comparaison avec les rats Sham. Un important épaississement de la paroi du ventricule gauche est également visible. En effet, le ventricule gauche des rats hypertendus est 43% plus épais que celui des rats Sham. Cette hypertrophie a été confirmée par le poids des cœurs entiers et celui du ventricule gauche qui sont augmentés alors que le poids du ventricule droit demeure inchangé.

Le cœur sain contient des protéines de la matrice extracellulaire qui assurent un support structurel des cellules et contribuent à la fonction de pompe cardiaque en assurant la transmission de la force générée par les cardiomyocytes. [573] Le collagène de type I et de type III constituent la majorité des protéines de la matrice extracellulaire retrouvées dans le myocarde. [570] Le collagène est élastique et permet au cœur de se contracter sans se déformer. Le collagène de type I représente 75% du collagène total dans le myocarde adulte. [570] Or, le collagène de type III est le composant majeur de la fibrose observée dans les modèles d'hypertension induit génétiquement ou chirurgicalement. [570] D'ailleurs, une concentration élevée en collagène III est caractéristique d'une réponse précoce de réparation. [571] Cette perturbation cause une dysfonction systolique et affecte la contractilité du cœur suite à une altération dans la transduction du signal responsable de la contraction des cardiomyocytes. [574] Les interactions entre les protéines situées dans les interstices des cardiomyocytes, comme la laminine ou le collagène, avec leurs récepteurs respectifs peuvent jouer un rôle important dans l'homéostasie des cardiomyocytes. [575] La fibrose peut aussi résulter en un déplacement des cardiomyocytes menant à une diminution du nombre de

couches musculaires dans le ventricule ainsi qu'à une dilatation de la chambre ventriculaire. [576] Dans notre étude, nous avons observé un arrangement moins compact des cardiomyocytes dans les cœurs de rats hypertendus en comparaison avec les rats sains. (Voir Annexe 2 Figure 7. Formation de la fibrose dans les cœurs des rats ayant subi une constriction aortique abdominale surrénale.) L'hypertension entraîne une surcharge de pression qui résulte en une fibrose cardiaque associée avec une augmentation de la rigidité de la paroi du ventricule et aux fonctions diastoliques et systoliques altérées. [573] Les analyses de la contractilité des cœurs hypertendus révèlent des altérations qui peuvent être associées à une augmentation de la rigidité de la paroi ventriculaire en raison de l'instauration d'une fibrose.

La fibrose cardiaque se manifeste de deux façons. Une augmentation du dépôt de collagène est observée entre les fibres musculaires cardiaques ainsi que de façon périvasculaire. L'accumulation périvasculaire des fibres de collagène débute dans l'adventice des vaisseaux et s'étend aux espaces interstitiels dans le muscle cardiaque. [577] Nous avons fait des observations similaires dans notre étude, à savoir que des fibres de collagène ont été observées, intercalées entre les cardiomyocytes et de façon périvasculaire. (Voir Annexe 2 Figure 7. Formation de la fibrose dans les cœurs des rats ayant subi une constriction aortique abdominale surrénale.) Le contenu en collagène s'est révélé déjà assez important après deux semaines d'hypertension. De plus, dans un cœur normal, le collagène occupe de 2 à 4 % du ventricule gauche. [578] Capasso et al. a démontré que, dans un modèle d'hypertension induit par une constriction rénovasculaire après 32 semaines, le collagène occupe 18% du ventricule gauche, soit une augmentation de 6 fois en comparaison avec un cœur sain. [565] Cette augmentation du contenu en collagène a un impact sur la rigidité et sur la fonctionnalité systolique et diastolique du cœur. [579] Les analyses du contenu de collagène des cœur de rats hypertendus nous ont permis de déterminer qu'une fibrose s'est bien installée dans le myocarde de ces rats, aussi bien entre les cardiomyocytes que de façon périvasculaire. On dénote aussi une augmentation de la lumière des vaisseaux dans le myocarde des rats hypertendus. Les vaisseaux de ces cœurs subissent également un remodelage de leur paroi et un étirement de leur lumière. Un épaississement de la média suggère un remodelage hypertrophique. Ces analyses permettent également de mieux comprendre la différence dans l'organisation des cardiomyocytes dans les cœurs de rats Sham et celle des rats hypertendus.

Les cardiomyocytes des rats hypertendus sont plus distancés en raison des fibres de collagène alors que les cardiomyocytes des rats Sham sont très serrées et en continuité. En observant ces changements morphologiques, il est plus facile de comprendre les changements des fonctions cardiaques.

3.2.3.3 L'impact de l'angiotensine sur l'hypertrophie du cœur

L'hypertrophie cardiaque qui est observée dans notre modèle de constriction aortique abdominale surrénale résulte à la fois de l'augmentation de la post-charge imposée au cœur et de l'action de la l'ang II produite suite à la relâche plus importante de rénine par les reins. Aceto et Baker ont démontré que l'ang II entraîne la croissance des cardiomyocytes de façon directe et indépendante de la post-charge. [580] Ces effets sont produits via l'activation des récepteurs AT1 et AT2 exprimés par les cardiomyocytes et les fibroblastes. [581] De plus, la croissance induite par l'ang II dans le myocarde est inhibée par le losartan, un antagoniste du récepteur AT1. Ceci suggère que le récepteur AT1 médie la croissance induite par l'ang II dans le myocarde. [582] L'étude des pathologies cardiovasculaires a permis de démontrer que la plupart des effets de l'ang II seraient liés au récepteur AT1. (Révisé dans [297]) D'ailleurs, dans un modèle de constriction aortique, il a été démontré que l'ang II, par l'activation du récepteur AT1, induit directement l'hypertrophie des cardiomyocytes, la reprogrammation génique, la prolifération des fibroblastes et la formation de fibrose, et ce, de façon indépendante de la pression sanguine. [582, 583] L'ang II permet également l'activation de MMP et la production de protéines de matrice extracellulaire. Chez les modèles animaux où l'ang II est infusée, elle entraîne une augmentation de la pression sanguine [513], de l'hypertension [584] et de l'hypertrophie cardiaque. [585] Ces effets sont bloqués par l'utilisation d'un inhibiteur de récepteur d'ang II. Cependant, chez ces modèles animaux, la réduction de l'hypertrophie cardiaque est dépendante du type de constriction qui est appliquée. D'ailleurs, une constriction au niveau de l'aorte abdominale entre les artères rénales, comme dans notre étude, entraîne une hypertrophie cardiaque qui peut être prévenue ou réduite avec un inhibiteur de ACE. [586] Mais une hypertrophie cardiaque induite par une constriction au

niveau de la crosse aortique ne peut pas être prévenue ou réduite par le même type d'inhibiteur. Ceci s'explique par le fait que dans le premier cas, l'ang II et la postcharge peuvent agir sur l'hypertension alors que dans le deuxième cas, seule l'augmentation de la post-charge est responsable de l'hypertrophie cardiaque. [587]

Il existe également un système local SRAA responsable de la production d'ang II dans le cœur. [588] Toutefois, la production locale d'ang II ne semble pas suffisante pour induire une hypertrophie, mais le serait pour l'induction de la fibrose. La présence d'un système local SRAA pourrait expliquer l'efficacité thérapeutique des inhibiteurs de SRAA dans l'amélioration de la pression sanguine, mais également dans la réduction des dommages induits par l'hypertension. (Révisé dans [562]) De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de ACE vient contrecarrer l'effet de l'ang II sur la formation de la fibrose et l'hypertrophie de ventricule gauche. [589]

3.2.4 La protéine Nestin dans le cœur de rat hypertendu : Implication dans le remodelage ?

Suite aux analyses vasculaires nous nous sommes intéressés à l'expression de la protéine Nestin dans les tissus cardiaques. Nous avons cherché à déterminer s'il y avait une augmentation de l'expression de cette protéine suite au remodelage ventriculaire et s'il était possible de la retrouver dans la zone de remodelage vasculaire dans le tissu cardiaque. Notre étude préliminaire du cœur des rats ayant subi une constriction aortique abdominale surrénale démontre une forte expression de Nestin dans le myocarde ainsi que dans les zones où se trouvent les vaisseaux sanguins du cœur.

3.2.4.1 L'expression de Nestin dans le myocarde

L'hypertrophie concentrique observée dans le cœur des rats hypertendus est accompagnée par une augmentation de l'expression de la protéine Nestin. (Voir Annexe 2

Figure 8 Expression de la protéine Nestin dans les cœurs) Les analyses en microscopie confocale ont permis de visualiser et de confirmer l'augmentation de l'expression de la protéine Nestin dans le myocarde dans les cellules situées entre les cardiomyocytes, comme il a été déjà rapporté. [396] (Voir Annexe 2 Figure 9 Expression de la protéine Nestin dans les cardiomyocytes et les fibroblastes du myocarde) Ces cellules exprimant Nestin ont été identifiées comme une population de cellules impliquées dans la cicatrisation du cœur et dans son innervation suite à un infarctus du myocarde. [590] Dans notre modèle d'hypertension, cette population peut remplir une fonction similaire. Ces cellules peuvent être impliquées dans le remodelage du tissu cardiaque et dans la prolifération des myofibroblastes qui sécrètent le collagène. De plus, l'expression de Nestin est également retrouvée dans les cardiomyocytes disséminés dans le myocarde. (Voir Annexe 2 Figure 9 Expression de la protéine Nestin dans les cardiomyocytes et les fibroblastes du myocarde) Cette observation, déjà rapportée par notre laboratoire [396], démontre que des cellules ressemblantes à des myocytes, positifs pour l'expression de Nestin, sont présentes dans les cœurs de rats sains et hypertendus. Il a été suggéré que ces cellules immatures contribuent à la réparation du tissu cardiaque. Dans notre étude, la présence de ces cellules pourrait être associée à l'hypertrophie du ventricule en situation d'hypertension. D'une part, la présence des myocytes Nestin⁺ peut suggérer une activité mitotique des cellules dans le myocarde et d'une autre part l'expression de Nestin peut être induite suite à une ischémie dans le tissu cardiaque. L'association de l'expression de la protéine Nestin en situation ischémique, comme lors d'un infarctus du myocarde, pourrait s'appliquer dans une moindre proportion à un tissu cardiaque subissant une hypertrophie. En effet, l'augmentation de la quantité de collagène dans le ventricule induit une faible ischémie et pourrait induire une plus grande expression de Nestin dans ces cellules ressemblant à des myocytes. Ces cellules, issues de cellules souches cardiaques, pourraient induire une augmentation de la masse des cœurs et contribuer à la normalisation de la fonction cardiaque suite à l'augmentation du travail qui lui ait appliqué en situation d'hypertension.

L'expression de Nestin peut également être régulée par l'hypoxie. En effet, Nestin est ré-exprimée suite à un dommage ischémique dans le cœur, probablement en réponse à l'environnement hypoxique. [590] Une étude a démontré que l'expression de Nestin est augmentée en situation hypoxique via des mécanismes qui requièrent certains membres de la

famille des facteurs de transcription HIF-1. [591] De plus, le facteur de croissance VEGF est augmenté en situation hypoxique sous le contrôle de HIF-1 α . [592] La même étude a démontré qu'un traitement avec un inhibiteur de VEGF atténue l'augmentation du VEGF et l'expression de la protéine Nestin induites par l'hypoxie *in vitro* dans les cellules mésenchymales. [591] Donc, l'augmentation de la fibrose cardiaque diminue la disponibilité de l'oxygène aux tissus, ce qui peut créer une légère hypoxie capable de stimuler l'expression de Nestin.

Dans notre modèle, une plus grande production d'ang II peut stimuler la relâche de TGF- β par le tissu cardiaque, qui contribue à la prolifération des fibroblastes et à l'hypertrophie du myocarde. [593] Une réponse à l'ang II est également associée à une augmentation de l'hypertrophie des cardiomyocytes et du ventricule. Nous observons une augmentation de l'expression de la protéine Nestin dans le tissu cardiaque de notre modèle animal d'hypertension. Cela peut être attribuée à une augmentation de la stimulation par l'ang II qui est produite suite à l'instauration de l'hypertension. Il a été observé dans le modèle de rats spontanément hypertendus que les récepteurs AT1 étaient présents en plus grand nombre dans leur les cœurs de ces animaux. [594] Nous n'avons pas étudié l'expression des récepteurs à l'ang II puisque dans notre modèle d'hypertension, les changements hémodynamiques et morphologiques observés sont grandement dus à une augmentation de la post-charge et donc à une contrainte mécanique. Toutefois, l'étude de l'expression des récepteurs pourrait s'avérer pertinente dans le cas où nous tenterions d'évaluer l'effet de l'augmentation de l'ang II sur l'augmentation de l'expression de Nestin dans les cellules cardiaques.

3.2.4.2 L'expression de Nestin dans les vaisseaux du myocarde

L'expression de Nestin est également retrouvée dans les CE de vaisseaux du cœur. (Voir Annexe 2 Figure 10. Analyse de l'expression de Nestin dans la fibrose du myocarde) Une observation similaire a été faite dans les vaisseaux situés dans les régions endommagées du cœur comme la région infarctée du myocarde chez le rat. [406] Cette expression est attribuée à la formation de nouvelles structures vasculaires. [353, 410, 595] Toutefois, bien que

l'expression de Nestin peut être attribuée à une formation *de novo* de capillaires afin d'augmenter la vascularisation d'un tissu lésé, dans notre étude, les CE Nestin⁺ ne semblent pas être des CE appartenant à de nouveaux vaisseaux. D'ailleurs, les CE des vaisseaux des rats Sham expriment également la protéine Nestin. Nous croyons plutôt que les CE des vaisseaux dans le cœur exprime Nestin de façon physiologique afin de palier à la perte des CE et ainsi faciliter leur remplacement normal. Dans ce contexte, l'expression de la protéine de filament intermédiaire Nestin ne serait pas exclusive aux cellules post-mitotiques, du moins dans les vaisseaux du cœur.

Une observation intéressante que nous avons faite, durant notre étude préliminaire, est que l'expression de Nestin est augmentée dans la zone périvasculaire des vaisseaux du myocarde, soit la zone de fibrose périvasculaire. Une analyse de colocalisation avec le collagène et α -SMA a été faite afin de déterminer si ces cellules Nestin⁺ étaient des fibroblastes responsables de la sécrétion de collagène ainsi que de la formation de la fibrose. Ces analyses ont démontré que les cellules Nestin⁺ de la zone périvasculaire ne colocalisent pas avec α -SMA et qu'une petite proportion des cellules colocalise avec le collagène. (Voir Annexe 2 Figure 11. Analyse de l'expression de Nestin dans zones périvasculaires) Ceci indique qu'une partie des cellules Nestin⁺ seraient des fibroblastes et confirme les résultats obtenus *in vitro* indiquant que les myofibroblastes expriment Nestin. Toutefois, comme ces cellules ne semblent pas être toutes des fibroblastes nous nous sommes intéressés à un autre marqueur soit l'antigène 1 des cellules souches (Sca-1, pour *stem cell antigen -1*), un marqueur de cellules progénitrices. Le marqueur Sca-1 a aussi été identifié dans les fibroblastes et son implication dans la fibrose a déjà été rapportée. [596-598] Un marquage avec sca-1 a donc été effectué afin de déterminer l'identité de ces cellules Nestin⁺ dans la zone périvasculaire. Ce marquage a révélé que les cellules Nestin⁺ dans la zone périvasculaire dans les cœurs de rats dans notre modèle de constriction aortique abdominale surrénale sont, pour la plupart, Sca-1⁺. Il a été démontré que sa surexpression est associée avec une diminution de l'hypertrophie cardiaque ainsi qu'avec le développement de la fibrose périvasculaire et myocardique. [598] Dans notre modèle, l'expression de Nestin et de Sca-1 par les cellules de la zone périvasculaire pourrait donc être impliquée dans la réponse adaptative du cœur suite à l'augmentation de la pression sanguine. Cette augmentation de l'expression de Sca-1 pourrait être un mécanisme précoce mis en place pour tenter de limiter le dépôt de collagène ainsi que

de la formation de la fibrose périvasculaire lors de l'instauration de l'hypertension. Dans notre étude, nous avons observé une fibrose réparatrice qui coïncide avec l'augmentation de la protéine Nestin. Nous avons également déterminé que bien qu'une augmentation de l'expression de Nestin soit observée dans le myocarde, une grande proportion des cellules Nestin⁺ est retrouvée dans la zone périvasculaire correspondant à la zone de fibrose. Comme ce sont les myofibroblastes du cœur qui sont responsables de la sécrétion de collagène et que la protéine Nestin joue un rôle dans la prolifération cellulaire, il est possible que ces cellules contribuent à la croissance et à la prolifération des myofibroblastes du cœur. Les cellules Nestin⁺Sca-1⁺ pourraient représenter un nouveau phénotype de myofibroblastes impliqués dans le remodelage de la zone périvasculaire en situation d'hypertension. D'ailleurs, la protéine Nestin est également exprimée dans une plus faible proportion dans le tissu cardiaque normal. [397] Il est donc possible que lors de l'établissement de la fibrose réparatrice, le phénomène de migration des cellules Nestin⁺ du myocarde vers les vaisseaux sanguins se produise. Ceci se produirait afin qu'elles participent à la formation de la fibrose périvasculaire et ainsi à la réponse d'adaptation suite au développement de l'hypertension. La fibrose périvasculaire ainsi que l'expression de Nestin dans les cellules de cette région ne sont pas observées chez les rats Sham et seraient associées au processus de fibrose périvasculaire en situation d'hypertension.

4 Conclusion

En conclusion, nos travaux démontrent que la protéine de filament intermédiaire Nestin est impliquée dans les mécanismes de remodelage vasculaire dans des modèles animaux distinct de diabète de type 1 et d'hypertension induite par une constriction aortique. (Voir Annexe 1 Modèles animaux)

Nous avons démontré que la protéine Nestin est fortement exprimée dans l'aorte des rats néonataux et que cette expression est modifiée au cours du développement, mais qu'elle n'est pas abolie. L'expression de Nestin est retrouvée dans une sous-population de CML dans les carotides et les aortes de rats. Dans notre modèle de diabète de type 1, la perte de l'expression de cette protéine est associée à la diminution de la phosphorylation de la phosphohistone 3, une protéine impliquée dans la progression du cycle cellulaire. La perte de l'expression de Nestin et de la capacité de prolifération des CML survient précocement dans l'instauration de la pathologie diabétique, soit avant l'apparition de la dysfonction endothéliale et pourrait participer à la diminution de la capacité d'adaptation vasculaire en situation diabétique.

Nous avons également démontré que l'expression de la protéine Nestin peut être modulée en fonction du remodelage vasculaire en situation d'hypertension. En effet, l'expression de Nestin est corrélée avec la pression sanguine et le remodelage vasculaire. Cette corrélation suggère que les cellules vasculaires expriment Nestin lorsqu'elles prolifèrent afin de s'adapter aux changements hémodynamiques qui surviennent en situation d'hypertension. La protéine Nestin ne joue pas un rôle exclusif dans la prolifération, mais également dans l'hypertrophie des CML. Conséquemment, cibler la protéine Nestin de façon pharmacologique dans les pathologies comme l'hypertension ne serait probablement pas suffisant pour supprimer cette réponse hypertrophique. Ceci met en évidence la nécessité d'élucider les voies de signalisation et les interactions protéiques de la protéine Nestin dans les mécanismes de prolifération et d'hypertrophie cellulaire.

Ces études démontrent que la perte de la protéine Nestin est primordiale dans la capacité proliférative des cellules vasculaire et peut représenter une protéine importante dans les mécanismes d'adaptation vasculaire physiologique et pathologique. L'expression de la protéine Nestin n'est pas exclusive aux vaisseaux sanguins. En effet, cette protéine est

retrouvée dans plusieurs organes comme le rein, le foie et le cerveau. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires qui impliquent la protéine Nestin nous permettrait de mieux comprendre ce qui module son expression. Ceci nous permettrait alors de pouvoir bloquer l'expression de cette protéine lors de la prolifération cellulaire et dans les mécanismes d'angiogenèse pathologique comme lors de la vascularisation d'une tumeur cancéreuse.

5 Bibliographie

1. Tortora, G.J., and Grabowski, S.R., *Principes d'anatomie et de physiologie*. 2001: Éditions du renouveau pédagogique inc.
2. *Cardiac Muscle and Electrical Activity*. Anatomy & Physiology : 2013 [cited 2014 25 mai]; Available from: http://cnx.org/content/m46664/latest/2018_Conduction_System_of_Heart.jpg.
3. Waldo, K., et al., *Cardiac neural crest cells provide new insight into septation of the cardiac outflow tract: aortic sac to ventricular septal closure*. *Dev Biol*, 1998. **196**(2): p. 129-44.
4. Gilbert, S.F., *Biologie du développement*. 2e édition, traduction de la 7e édition de *Developmental biology* ed. 2004.
5. Kirby, M.L. and K.L. Waldo, *Neural crest and cardiovascular patterning*. *Circ Res*, 1995. **77**(2): p. 211-5.
6. Poelmann, R.E., T. Mikawa, and A.C. Gittenberger-de Groot, *Neural crest cells in outflow tract septation of the embryonic chicken heart: differentiation and apoptosis*. *Dev Dyn*, 1998. **212**(3): p. 373-84.
7. Waldo, K., et al., *A novel role for cardiac neural crest in heart development*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(11): p. 1499-507.
8. Jiang, X., et al., *Fate of the mammalian cardiac neural crest*. *Development*, 2000. **127**(8): p. 1607-16.
9. Kirby, M.L., T.F. Gale, and D.E. Stewart, *Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation*. *Science*, 1983. **220**(4601): p. 1059-61.
10. Kirby, M.L. and K.L. Waldo, *Role of neural crest in congenital heart disease*. *Circulation*, 1990. **82**(2): p. 332-40.
11. Cheng, G., et al., *Development of the cardiac conduction system involves recruitment within a multipotent cardiomyogenic lineage*. *Development*, 1999. **126**(22): p. 5041-9.
12. Kattman, S.J., T.L. Huber, and G.M. Keller, *Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages*. *Dev Cell*, 2006. **11**(5): p. 723-32.
13. Le Douarin, N.K., C. The neural crest. Le Douarin, NM.; Kalcheim, C., editors. Cambridge University Press; Cambridge, UK: 1999.
14. Stennard, F.A. and R.P. Harvey, *T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart*. *Development*, 2005. **132**(22): p. 4897-910.
15. Liu, C., et al., *Pitx2c patterns anterior myocardium and aortic arch vessels and is required for local cell movement into atrioventricular cushions*. *Development*, 2002. **129**(21): p. 5081-91.
16. Sumida, H., N. Akimoto, and H. Nakamura, *Distribution of the neural crest cells in the heart of birds: a three dimensional analysis*. *Anat Embryol (Berl)*, 1989. **180**(1): p. 29-35.
17. Snider, P., et al., *Cardiovascular development and the colonizing cardiac neural crest lineage*. *ScientificWorldJournal*, 2007. **7**: p. 1090-113.
18. Yanagisawa, H., et al., *Role of Endothelin-1/Endothelin-A receptor-mediated signaling pathway in the aortic arch patterning in mice*. *J Clin Invest*, 1998. **102**(1): p. 22-33.

19. Le Lievre, C.S., Le Douarin, N.M., , *Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos*. . J Embryol Exp Morphol, 1975. **34**(1): p. 125-154.
20. Fishman, M.C. and M.L. Kirby, *Fallen arches, or how the vertebrate got its head*. J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 1-3.
21. Wendling, O., et al., *Retinoid signaling is essential for patterning the endoderm of the third and fourth pharyngeal arches*. Development, 2000. **127**(8): p. 1553-62.
22. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
23. Simons, M., *Angiogenesis: where do we stand now?* Circulation, 2005. **111**(12): p. 1556-66.
24. Bento, C.F. and P. Pereira, *Regulation of hypoxia-inducible factor 1 and the loss of the cellular response to hypoxia in diabetes*. Diabetologia, 2011. **54**(8): p. 1946-56.
25. *Principles of human anatomy and physiology, Chapter 18: Blood Vessels and Circulation* 2012 [cited 2014 25 mai]; Available from: <http://hap1nuo1group3.blogspot.ca/2012/03/chapter-18-blood-vessel-and-circulation.html>.
26. Scott, N.A., et al., *Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries*. Circulation, 1996. **93**(12): p. 2178-87.
27. Majesky, M.W., *Developmental basis of vascular smooth muscle diversity*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(6): p. 1248-58.
28. Burton, A.C., *Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels*. Physiol Rev, 1954. **34**(4): p. 619-42.
29. Xiong, J.W., *Molecular and developmental biology of the hemangioblast*. Dev Dyn, 2008. **237**(5): p. 1218-31.
30. Adams, R.H. and K. Alitalo, *Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(6): p. 464-78.
31. Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3527-61.
32. Malek, A.M. and S. Izumo, *Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress*. J Cell Sci, 1996. **109 (Pt 4)**: p. 713-26.
33. Schwartz, S.M. and E.P. Benditt, *Clustering of replicating cells in aortic endothelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(2): p. 651-3.
34. Sankar, S., et al., *Modulation of transforming growth factor beta receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis*. J Clin Invest, 1996. **97**(6): p. 1436-46.
35. Schwartz, S.M. and E.P. Benditt, *Aortic endothelial cell replication. I. Effects of age and hypertension in the rat*. Circ Res, 1977. **41**(2): p. 248-55.
36. Cheng, C., et al., *Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress*. Circulation, 2006. **113**(23): p. 2744-53.
37. Sholley, M.M., M.A. Gimbrone, Jr., and R.S. Cotran, *Cellular migration and replication in endothelial regeneration: a study using irradiated endothelial cultures*. Lab Invest, 1977. **36**(1): p. 18-25.
38. Torsney, E. and Q. Xu, *Resident vascular progenitor cells*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(2): p. 304-11.

39. Vanhoutte, P.M., *Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis*. *Circ J*, 2009. **73**(4): p. 595-601.
40. Félétou, M., *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells Focus on Endothelium-derived Vasoactive Mediators*, Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael 2011.
41. Vanhoutte, P.M., *Regeneration of the endothelium in vascular injury*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2010. **24**(4): p. 299-303.
42. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. *Nature*, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
43. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. *Nature*, 1988. **333**(6174): p. 664-6.
44. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. *Nature*, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
45. Palmer, R.M., et al., *L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988. **153**(3): p. 1251-6.
46. Dessy, C., O. Feron, and J.L. Balligand, *The regulation of endothelial nitric oxide synthase by caveolin: a paradigm validated in vivo and shared by the 'endothelium-derived hyperpolarizing factor'*. *Pflugers Arch*, 2010. **459**(6): p. 817-27.
47. Datta, B., Tufnell-Barrett, T., Bleasdale, R.A., Jones, C.J., Beeton, I., Frenneaux, V.P.M., and James, P., *Red blood cell nitric oxide as an endocrine vasoregulator: a potential role in congestive heart failure*. *Circulation*, 2004. **109**: p. 1339–1342.
48. Yanagisawa, M. and T. Masaki, *Endothelin, a novel endothelium-derived peptide. Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control*. *Biochem Pharmacol*, 1989. **38**(12): p. 1877-83.
49. Tang, E.H., et al., *Endothelium-dependent contractions occur in the aorta of wild-type and COX2-/- knockout but not COX1-/- knockout mice*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005. **46**(6): p. 761-5.
50. Cersosimo, E. and R.A. DeFronzo, *Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2006. **22**(6): p. 423-36.
51. Ross, R., *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. *Am Heart J*, 1999. **138**(5 Pt 2): p. S419-20.
52. Gimbrone, M.A., Jr., *Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis*. *Am J Pathol*, 1999. **155**(1): p. 1-5.
53. Quijano, C., et al., *Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **293**(6): p. H3404-14.
54. Anderson, T.J., *Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans*. *J Am Coll Cardiol*, 1999. **34**(3): p. 631-8.
55. Vanhoutte, P.M., *Endothelial dysfunction and atherosclerosis*. *Eur Heart J*, 1997. **18 Suppl E**: p. E19-29.
56. Toda, N., T. Imamura, and T. Okamura, *Alteration of nitric oxide-mediated blood flow regulation in diabetes mellitus*. *Pharmacol Ther*, 2010. **127**(3): p. 189-209.

57. Busse, R. and I. Fleming, *Nitric oxide, nitric oxide synthase, and hypertensive vascular disease*. *Curr Hypertens Rep*, 1999. **1**(1): p. 88-95.
58. Francois, M. and G. Kojda, *Effect of hypercholesterolemia and of oxidative stress on the nitric oxide-cGMP pathway*. *Neurochem Int*, 2004. **45**(6): p. 955-61.
59. Toda, N. and H. Toda, *Nitric oxide-mediated blood flow regulation as affected by smoking and nicotine*. *Eur J Pharmacol*, 2010. **649**(1-3): p. 1-13.
60. Toda, N. and K. Ayajiki, *Vascular actions of nitric oxide as affected by exposure to alcohol*. *Alcohol Alcohol*, 2010. **45**(4): p. 347-55.
61. Toda, N. and K. Arakawa, *Salt-induced hemodynamic regulation mediated by nitric oxide*. *J Hypertens*, 2011. **29**(3): p. 415-24.
62. Di Francescomarino, S., et al., *The effect of physical exercise on endothelial function*. *Sports Med*, 2009. **39**(10): p. 797-812.
63. Toda, N.N.-T., M. , *How mental stress affects endothelial function*. *Eur. J Physiol* 2011. **462**: p. 779–794.
64. Toda, N., *Age-related changes in endothelial function and blood flow regulation*. *Pharmacol Ther*, 2012. **133**(2): p. 159-76.
65. Guzik, T.J., et al., *Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase*. *Circulation*, 2002. **105**(14): p. 1656-62.
66. Romero, M.J., et al., *Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity*. *Circ Res*, 2008. **102**(1): p. 95-102.
67. Xiong, Y., et al., *Elevated levels of the serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and metabolic control in rats with streptozotocin-induced diabetes*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2003. **42**(2): p. 191-6.
68. Shi, Y. and P.M. Vanhoutte, *Oxidative stress and COX cause hyper-responsiveness in vascular smooth muscle of the femoral artery from diabetic rats*. *Br J Pharmacol*, 2008. **154**(3): p. 639-51.
69. Higashi, Y., et al., *Oxidative stress and endothelial dysfunction: Clinical evidence and therapeutic implications*. *Trends Cardiovasc Med*, 2014. **24**(4): p. 165-169.
70. Schena, M., et al., *Vasoactive hormones induce nitric oxide synthase mRNA expression and nitric oxide production in human endothelial cells and monocytes*. *Am J Hypertens*, 1999. **12**(4 Pt 1): p. 388-97.
71. Sowers, J.R., *Hypertension, angiotensin II, and oxidative stress*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(25): p. 1999-2001.
72. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. *Circ Res*, 2000. **87**(10): p. 840-4.
73. August, M., et al., *Mechanisms underlying dysfunction of carotid arteries in genetically hyperlipidemic rabbits*. *Nitric Oxide*, 2006. **15**(3): p. 241-51.
74. Pierce, G.L., et al., *Weight loss alone improves conduit and resistance artery endothelial function in young and older overweight/obese adults*. *Hypertension*, 2008. **52**(1): p. 72-9.
75. Watts, K., et al., *Exercise training normalizes vascular dysfunction and improves central adiposity in obese adolescents*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **43**(10): p. 1823-7.
76. Rahman, M.M. and I. Laher, *Structural and functional alteration of blood vessels caused by cigarette smoking: an overview of molecular mechanisms*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2007. **5**(4): p. 276-92.

77. Briet, M., et al., *Endothelial function and chronic exposure to air pollution in normal male subjects*. Hypertension, 2007. **50**(5): p. 970-6.
78. Leung, F.P., et al., *Therapeutic concentrations of raloxifene augment nitric oxide-dependent coronary artery dilatation in vitro*. Br J Pharmacol, 2007. **152**(2): p. 223-9.
79. Williams, J.K., et al., *Short-term administration of estrogen and vascular responses of atherosclerotic coronary arteries*. J Am Coll Cardiol, 1992. **20**(2): p. 452-7.
80. Knowlton, A.A. and D.H. Korzick, *Estrogen and the female heart*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **389**(1-2): p. 31-39.
81. Cernadas, M.R., et al., *Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats*. Circ Res, 1998. **83**(3): p. 279-86.
82. Charpie, J.R., et al., *Endothelium dependency of contractile activity differs in infant and adult vertebral arteries*. J Clin Invest, 1994. **93**(3): p. 1339-43.
83. Katusic, Z.S., *Mechanisms of endothelial dysfunction induced by aging: role of arginase I*. Circ Res, 2007. **101**(7): p. 640-1.
84. Taddei, S., et al., *Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans*. Hypertension, 2001. **38**(2): p. 274-9.
85. Chou, T.C., et al., *Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats*. Hypertension, 1998. **31**(2): p. 643-8.
86. Tschudi, M.R., et al., *Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery*. J Clin Invest, 1996. **98**(4): p. 899-905.
87. Joshi, C.N., et al., *Control of vascular smooth muscle cell growth by connexin 43*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 220.
88. Ko, Y.S., et al., *Differential expression of connexin43 and desmin defines two subpopulations of medial smooth muscle cells in the human internal mammary artery*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(7): p. 1669-80.
89. Miano, J.M., et al., *Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis*. Circ Res, 1994. **75**(5): p. 803-12.
90. Owens, G.K., *Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells*. Physiol Rev, 1995. **75**(3): p. 487-517.
91. Worth, N.F., et al., *Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins*. Cell Motil Cytoskeleton, 2001. **49**(3): p. 130-45.
92. Ross, R. and J.A. Glomset, *Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis*. Science, 1973. **180**(4093): p. 1332-9.
93. Tang, Z., et al., *Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 875.
94. Owens, G.K., M.S. Kumar, and B.R. Wamhoff, *Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease*. Physiol Rev, 2004. **84**(3): p. 767-801.
95. Hao, H., G. Gabbiani, and M.L. Bochaton-Piallat, *Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(9): p. 1510-20.
96. Alexander, M.R. and G.K. Owens, *Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease*. Annu Rev Physiol, 2012. **74**: p. 13-40.

97. Gomez, D. and G.K. Owens, *Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis*. Cardiovasc Res, 2012. **95**(2): p. 156-64.
98. Beamish, J.A., et al., *Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering*. Tissue Eng Part B Rev, 2010. **16**(5): p. 467-91.
99. Neuville, P., et al., *Cellular retinol-binding protein-1 is expressed by distinct subsets of rat arterial smooth muscle cells in vitro and in vivo*. Am J Pathol, 1997. **150**(2): p. 509-21.
100. Hedin, U., et al., *A substrate of the cell-attachment sequence of fibronectin (Arg-Gly-Asp-Ser) is sufficient to promote transition of arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype*. Dev Biol, 1989. **133**(2): p. 489-501.
101. Corjay, M.H., et al., *Differential effect of platelet-derived growth factor- versus serum-induced growth on smooth muscle alpha-actin and nonmuscle beta-actin mRNA expression in cultured rat aortic smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1989. **264**(18): p. 10501-6.
102. Hautmann, M.B., C.S. Madsen, and G.K. Owens, *A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements*. J Biol Chem, 1997. **272**(16): p. 10948-56.
103. Reusch, P., et al., *Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1996. **79**(5): p. 1046-53.
104. Su, B., et al., *Redox regulation of vascular smooth muscle cell differentiation*. Circ Res, 2001. **89**(1): p. 39-46.
105. Pidkovka, N.A., et al., *Oxidized phospholipids induce phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro*. Circ Res, 2007. **101**(8): p. 792-801.
106. Rong, J.X., et al., *Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13531-6.
107. Isogai, S., M. Horiguchi, and B.M. Weinstein, *The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development*. Dev Biol, 2001. **230**(2): p. 278-301.
108. Vanhoutte, P.M., et al., *Endothelial dysfunction and vascular disease*. Acta Physiol (Oxf), 2009. **196**(2): p. 193-222.
109. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P., *L'essentiel de la biologie cellulaire*. 2e édition ed. 2005. 841.
110. Wang, F. and J.M. Higgins, *Histone modifications and mitosis: countermarks, landmarks, and bookmarks*. Trends Cell Biol, 2013. **23**(4): p. 175-84.
111. Shi, X. and D.J. Garry, *Muscle stem cells in development, regeneration, and disease*. Genes Dev, 2006. **20**(13): p. 1692-708.
112. Miano, J.M., et al., *Localization of Fos and Jun proteins in rat aortic smooth muscle cells after vascular injury*. Am J Pathol, 1993. **142**(3): p. 715-24.
113. Pardee, A.B., *G1 events and regulation of cell proliferation*. Science, 1989. **246**(4930): p. 603-8.
114. Riabowol, K.T., et al., *Microinjection of fos-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblast cells*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(4): p. 1670-6.

115. Bennett, M.R., et al., *Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo by c-myc antisense oligodeoxynucleotides*. J Clin Invest, 1994. **93**(2): p. 820-8.
116. Psaltis, P.J., et al., *Resident vascular progenitor cells--diverse origins, phenotype, and function*. J Cardiovasc Transl Res, 2011. **4**(2): p. 161-76.
117. Hu, Y., et al., *Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice*. J Clin Invest, 2004. **113**(9): p. 1258-65.
118. Zengin, E., et al., *Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis*. Development, 2006. **133**(8): p. 1543-51.
119. Pasquinnelli, G., et al., *Thoracic aortas from multiorgan donors are suitable for obtaining resident angiogenic mesenchymal stromal cells*. Stem Cells, 2007. **25**(7): p. 1627-34.
120. Passman, J.N., et al., *A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sc α 1+ smooth muscle progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(27): p. 9349-54.
121. Baumbach, G.L. and D.D. Heistad, *Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension*. Hypertension, 1989. **13**(6 Pt 2): p. 968-72.
122. Intengan, H.D. and E.L. Schiffrin, *Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants*. Hypertension, 2000. **36**(3): p. 312-8.
123. Lee, R.M., *Vascular changes at the prehypertensive phase in the mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats*. Blood Vessels, 1985. **22**(3): p. 105-26.
124. Mulvany, M.J., U. Baandrup, and H.J. Gundersen, *Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional disector*. Circ Res, 1985. **57**(5): p. 794-800.
125. Korsgaard, N. and M.J. Mulvany, *Cellular hypertrophy in mesenteric resistance vessels from renal hypertensive rats*. Hypertension, 1988. **12**(2): p. 162-7.
126. Rizzoni, D., et al., *Effects of losartan and enalapril on small artery structure in hypertensive rats*. Hypertension, 1998. **32**(2): p. 305-10.
127. Feihl, F., L. Liaudet, and B. Waeber, *The macrocirculation and microcirculation of hypertension*. Curr Hypertens Rep, 2009. **11**(3): p. 182-9.
128. Mulvany, M.J., et al., *Vascular remodeling*. Hypertension, 1996. **28**(3): p. 505-6.
129. Fukuda, N., et al., *Contribution of synthetic phenotype on the enhanced angiotensin II-generating system in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats*. J Hypertens, 1999. **17**(8): p. 1099-107.
130. Sharifi, A.M., et al., *Effects of enalapril and amlodipine on small-artery structure and composition, and on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats*. J Hypertens, 1998. **16**(4): p. 457-66.
131. Intengan, H.D., et al., *Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats : effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition*. Circulation, 1999. **100**(22): p. 2267-75.
132. Dzau, V.J., G.H. Gibbons, and R.E. Pratt, *Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia*. Hypertension, 1991. **18**(4 Suppl): p. II100-5.
133. Yong, V.W., et al., *Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS*. Trends Neurosci, 1998. **21**(2): p. 75-80.

134. Palombo, D., et al., *Matrix metalloproteinases. Their role in degenerative chronic diseases of abdominal aorta*. J Cardiovasc Surg (Torino), 1999. **40**(2): p. 257-60.
135. Lemarie, C.A., P.L. Tharoux, and S. Lehoux, *Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(3): p. 433-9.
136. Francophone., U.M.V. *Pathologie vasculaire et troubles circulatoires 2010* [cited 2014 15 juillet]; Available from: http://umvf.univ-nantes.fr/anatomie-pathologique/enseignement/anapath_4/site/html/4.html.
137. Go, A.S., et al., *Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2014. **129**(3): p. e28-e292.
138. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(3): p. 569-82.
139. Burchfield, J.S., M. Xie, and J.A. Hill, *Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2*. Circulation, 2013. **128**(4): p. 388-400.
140. Gjesdal, O., D.A. Bluemke, and J.A. Lima, *Cardiac remodeling at the population level--risk factors, screening, and outcomes*. Nat Rev Cardiol, 2011. **8**(12): p. 673-85.
141. Levy, D., et al., *The progression from hypertension to congestive heart failure*. JAMA, 1996. **275**(20): p. 1557-62.
142. Grossman, W., D. Jones, and L.P. McLaurin, *Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle*. J Clin Invest, 1975. **56**(1): p. 56-64.
143. Nadal-Ginard, B. and V. Mahdavi, *Molecular basis of cardiac performance. Plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches*. J Clin Invest, 1989. **84**(6): p. 1693-700.
144. Izumo, S., B. Nadal-Ginard, and V. Mahdavi, *Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(2): p. 339-43.
145. Calderone, A., et al., *Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs*. Circulation, 1995. **92**(9): p. 2385-90.
146. Spinale, F.G., *Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function*. Physiol Rev, 2007. **87**(4): p. 1285-342.
147. Kong, P., P. Christia, and N.G. Frangogiannis, *The pathogenesis of cardiac fibrosis*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(4): p. 549-74.
148. Santé., O.M.d.l. *Diabète*. 2013 [cited 2014 14 avril]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/fr/>.
149. Creager, M.A., et al., *Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I*. Circulation, 2003. **108**(12): p. 1527-32.
150. Prevention., C.f.D.C.a. *National Diabetes Fact Sheet 2011* [cited 2014 14 avril]; Available from: <http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/general11.htm>.
151. Sinha, R., et al., *Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity*. N Engl J Med, 2002. **346**(11): p. 802-10.
152. Reaven, G.M., *Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease*. Diabetes, 1988. **37**(12): p. 1595-607.
153. Cinti, S., et al., *Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans*. J Lipid Res, 2005. **46**(11): p. 2347-55.

154. Kaur, J., *A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome*. *Cardiol Res Pract*, 2014. **2014**: p. 943162.
155. Matsuzawa, Y., et al., *Adiponectin and metabolic syndrome*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(1): p. 29-33.
156. Kazumi, T., et al., *Young men with high-normal blood pressure have lower serum adiponectin, smaller LDL size, and higher elevated heart rate than those with optimal blood pressure*. *Diabetes Care*, 2002. **25**(6): p. 971-6.
157. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. *Science*, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
158. Lehrke, M. and M.A. Lazar, *Inflamed about obesity*. *Nat Med*, 2004. **10**(2): p. 126-7.
159. Yudkin, J.S., et al., *C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(4): p. 972-8.
160. Mohamed-Ali, V., et al., *Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. **82**(12): p. 4196-200.
161. Diamant, M., et al., *The association between abdominal visceral fat and carotid stiffness is mediated by circulating inflammatory markers in uncomplicated type 2 diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(3): p. 1495-501.
162. Lundgren, C.H., et al., *Elaboration of type-1 plasminogen activator inhibitor from adipocytes. A potential pathogenetic link between obesity and cardiovascular disease*. *Circulation*, 1996. **93**(1): p. 106-10.
163. Guldiken, S., et al., *The levels of circulating markers of atherosclerosis and inflammation in subjects with different degrees of body mass index: Soluble CD40 ligand and high-sensitivity C-reactive protein*. *Thromb Res*, 2007. **119**(1): p. 79-84.
164. Pradhan, A.D., et al., *C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus*. *JAMA*, 2001. **286**(3): p. 327-34.
165. Trayhurn, P. and I.S. Wood, *Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue*. *Br J Nutr*, 2004. **92**(3): p. 347-55.
166. Saleem, U., et al., *Plasma carboxy-terminal proinsulin (C-peptide): a novel marker of insulin resistance and metabolic syndrome*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(7): p. 2558-64.
167. Tsimikas, S., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, ferritin levels, metabolic syndrome, and 10-year cardiovascular and non-cardiovascular mortality: results from the Bruneck study*. *Eur Heart J*, 2009. **30**(1): p. 107-15.
168. Jacobs, M., et al., *Low-grade inflammation can partly explain the association between the metabolic syndrome and either coronary artery disease or severity of peripheral arterial disease: the CODAM study*. *Eur J Clin Invest*, 2009. **39**(6): p. 437-44.
169. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*. *Nature*, 2011. **473**(7347): p. 317-25.
170. Cameron, A.J., J.E. Shaw, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2004. **33**(2): p. 351-75, table of contents.

171. Brownlee, M., *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1615-25.
172. Wautier, M.P., et al., *Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(5): p. E685-94.
173. Chavakis, T., A. Bierhaus, and P.P. Nawroth, *RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response*. Microbes Infect, 2004. **6**(13): p. 1219-25.
174. Zhang, L., et al., *Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries*. Circulation, 2003. **108**(4): p. 472-8.
175. Xu, B., et al., *Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products*. FASEB J, 2003. **17**(10): p. 1289-91.
176. Quehenberger, P., et al., *Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells*. Diabetes, 2000. **49**(9): p. 1561-70.
177. Death, A.K., et al., *High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes*. Atherosclerosis, 2003. **168**(2): p. 263-9.
178. Kahn, S.E., R.L. Hull, and K.M. Utzschneider, *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 840-6.
179. White, M.F., *Insulin signaling in health and disease*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1710-1.
180. Avruch, J., *Insulin signal transduction through protein kinase cascades*. Mol Cell Biochem, 1998. **182**(1-2): p. 31-48.
181. Taddei, S., et al., *Effect of insulin on acetylcholine-induced vasodilation in normotensive subjects and patients with essential hypertension*. Circulation, 1995. **92**(10): p. 2911-8.
182. Fisslthaler, B., et al., *Insulin enhances the expression of the endothelial nitric oxide synthase in native endothelial cells: a dual role for Akt and AP-1*. Nitric Oxide, 2003. **8**(4): p. 253-61.
183. Kim, J.A., et al., *Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms*. Circulation, 2006. **113**(15): p. 1888-904.
184. Muniyappa, R. and J.R. Sowers, *Role of insulin resistance in endothelial dysfunction*. Rev Endocr Metab Disord, 2013. **14**(1): p. 5-12.
185. Inoguchi, T., et al., *High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells*. Diabetes, 2000. **49**(11): p. 1939-45.
186. Stephens, J.M., J. Lee, and P.F. Pilch, *Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 971-6.
187. Stephens, J.M. and P.H. Pekala, *Transcriptional repression of the C/EBP-alpha and GLUT4 genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. Regulations is coordinate and independent of protein synthesis*. J Biol Chem, 1992. **267**(19): p. 13580-4.

188. Highlander, P. and G.P. Shaw, *Current pharmacotherapeutic concepts for the treatment of cardiovascular disease in diabetics*. Ther Adv Cardiovasc Dis, 2010. **4**(1): p. 43-54.
189. Beckman, J.A., M.A. Creager, and P. Libby, *Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management*. JAMA, 2002. **287**(19): p. 2570-81.
190. Muniyappa, R., et al., *Cardiovascular actions of insulin*. Endocr Rev, 2007. **28**(5): p. 463-91.
191. Wheatcroft, S.B., et al., *Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function*. Diabet Med, 2003. **20**(4): p. 255-68.
192. Vincent, M.A., et al., *Inhibiting NOS blocks microvascular recruitment and blunts muscle glucose uptake in response to insulin*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(1): p. E123-9.
193. Shankar, R.R., et al., *Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance*. Diabetes, 2000. **49**(5): p. 684-7.
194. Kang, K.T., et al., *Novel nitric oxide synthase--dependent mechanism of vasorelaxation in small arteries from hypertensive rats*. Hypertension, 2007. **49**(4): p. 893-901.
195. De Vriese, A.S., et al., *The impaired renal vasodilator response attributed to endothelium-derived hyperpolarizing factor in streptozotocin--induced diabetic rats is restored by 5-methyltetrahydrofolate*. Diabetologia, 2000. **43**(9): p. 1116-25.
196. Grgic, I., et al., *Endothelial Ca⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses--relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(4): p. 509-26.
197. De Vriese, A.S., et al., *Endothelial dysfunction in diabetes*. Br J Pharmacol, 2000. **130**(5): p. 963-74.
198. Shi, Y., et al., *Augmented endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxations attenuate endothelial dysfunction in femoral and mesenteric, but not in carotid arteries from type I diabetic rats*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **318**(1): p. 276-81.
199. Bornfeldt, K.E. and I. Tabas, *Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis*. Cell Metab, 2011. **14**(5): p. 575-85.
200. Balakumar, P., et al., *Recent advances in pharmacotherapy for diabetic nephropathy: current perspectives and future directions*. Pharmacol Res, 2009. **60**(1): p. 24-32.
201. Sheetz, M.J. and G.L. King, *Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications*. JAMA, 2002. **288**(20): p. 2579-88.
202. Davies, M., et al., *The prevalence, severity, and impact of painful diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2006. **29**(7): p. 1518-22.
203. Athans, W. and H. Stephens, *Open calcaneal fractures in diabetic patients with neuropathy: a report of three cases and literature review*. Foot Ankle Int, 2008. **29**(10): p. 1049-53.
204. Gandhi, R.A., et al., *Painful diabetic neuropathy is associated with greater autonomic dysfunction than painless diabetic neuropathy*. Diabetes Care, 2010. **33**(7): p. 1585-90.
205. Singh, R., L. Kishore, and N. Kaur, *Diabetic peripheral neuropathy: current perspective and future directions*. Pharmacol Res, 2014. **80**: p. 21-35.

206. Abcouwer, S.F. and T.W. Gardner, *Diabetic retinopathy: loss of neuroretinal adaptation to the diabetic metabolic environment*. Ann N Y Acad Sci, 2014. **1311**: p. 174-90.
207. Aiello, L.P., et al., *Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders*. N Engl J Med, 1994. **331**(22): p. 1480-7.
208. Reiter, C.E., et al., *Diabetes reduces basal retinal insulin receptor signaling: reversal with systemic and local insulin*. Diabetes, 2006. **55**(4): p. 1148-56.
209. Rajala, R.V., et al., *Diabetes reduces autophosphorylation of retinal insulin receptor and increases protein-tyrosine phosphatase-1B activity*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(3): p. 1033-40.
210. Kowluru, R.A. and P.S. Chan, *Oxidative stress and diabetic retinopathy*. Exp Diabetes Res, 2007. **2007**: p. 43603.
211. Dorner, G.T., et al., *Hyperglycemia affects flicker-induced vasodilation in the retina of healthy subjects*. Vision Res, 2003. **43**(13): p. 1495-500.
212. Lopez-Parra V, M.B., Egido J, Gomez-Guerrero C. Immunoinflammation in Diabetic Nephropathy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Options. In: Chan JSD. Diabetic Nephropathy. InTech, Chapters, 2012: 127-146 [DOI: 10.5772/34541].
213. El Mesallamy, H.O., et al., *Clinical significance of inflammatory and fibrogenic cytokines in diabetic nephropathy*. Clin Biochem, 2012. **45**(9): p. 646-50.
214. Cao, Z. and M.E. Cooper, *Pathogenesis of diabetic nephropathy*. J Diabetes Investig, 2011. **2**(4): p. 243-7.
215. Lavrentyev, E.N., A.M. Estes, and K.U. Malik, *Mechanism of high glucose induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2007. **101**(5): p. 455-64.
216. Bloomgarden, Z.T., *Cardiovascular disease and diabetes*. Diabetes Care, 2003. **26**(1): p. 230-7.
217. Boudina, S. and E.D. Abel, *Diabetic cardiomyopathy revisited*. Circulation, 2007. **115**(25): p. 3213-23.
218. Di Bonito, P., et al., *Early detection of diabetic cardiomyopathy: usefulness of tissue Doppler imaging*. Diabet Med, 2005. **22**(12): p. 1720-5.
219. Schannwell, C.M., et al., *Left ventricular diastolic dysfunction as an early manifestation of diabetic cardiomyopathy*. Cardiology, 2002. **98**(1-2): p. 33-9.
220. McClelland, A.D. and P. Kantharidis, *microRNA in the development of diabetic complications*. Clin Sci (Lond), 2014. **126**(2): p. 95-110.
221. Luitse, M.J., et al., *Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke*. Lancet Neurol, 2012. **11**(3): p. 261-71.
222. Wei, M., et al., *Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study*. Diabetes Care, 1998. **21**(7): p. 1167-72.
223. Wilson, P.W., et al., *Prediction of coronary heart disease using risk factor categories*. Circulation, 1998. **97**(18): p. 1837-47.
224. Bertoni, A.G., et al., *Diabetes and idiopathic cardiomyopathy: a nationwide case-control study*. Diabetes Care, 2003. **26**(10): p. 2791-5.
225. Nichols, G.A., et al., *Congestive heart failure in type 2 diabetes: prevalence, incidence, and risk factors*. Diabetes Care, 2001. **24**(9): p. 1614-9.

226. LoGerfo, F.W. and J.D. Coffman, *Current concepts. Vascular and microvascular disease of the foot in diabetes. Implications for foot care.* N Engl J Med, 1984. **311**(25): p. 1615-9.
227. Tilton, R.G., et al., *Pericyte degeneration and acellular capillaries are increased in the feet of human diabetic patients.* Diabetologia, 1985. **28**(12): p. 895-900.
228. Kullo, I.J., et al., *Ethnic differences in peripheral arterial disease in the NHLBI Genetic Epidemiology Network of Arteriopathy (GENOA) study.* Vasc Med, 2003. **8**(4): p. 237-42.
229. Schainfeld, R.M., *Management of peripheral arterial disease and intermittent claudication.* J Am Board Fam Pract, 2001. **14**(6): p. 443-50.
230. McDermott, M.M., et al., *Functional decline in peripheral arterial disease: associations with the ankle brachial index and leg symptoms.* JAMA, 2004. **292**(4): p. 453-61.
231. Adler, A.I., et al., *Lower-extremity amputation in diabetes. The independent effects of peripheral vascular disease, sensory neuropathy, and foot ulcers.* Diabetes Care, 1999. **22**(7): p. 1029-35.
232. Dickinson, P.J., et al., *Neurovascular disease, antioxidants and glycation in diabetes.* Diabetes Metab Res Rev, 2002. **18**(4): p. 260-72.
233. Prior, J.O., et al., *Coronary circulatory dysfunction in insulin resistance, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes mellitus.* Circulation, 2005. **111**(18): p. 2291-8.
234. Ferrannini, E. and A. Natali, *Essential hypertension, metabolic disorders, and insulin resistance.* Am Heart J, 1991. **121**(4 Pt 2): p. 1274-82.
235. Malhotra, A., et al., *Angiotensin II promotes glucose-induced activation of cardiac protein kinase C isozymes and phosphorylation of troponin I.* Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1918-26.
236. Morse, S.A., et al., *Hypertension and the metabolic syndrome.* Am J Med Sci, 2005. **330**(6): p. 303-10.
237. Briones, A.M., et al., *Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction.* Hypertension, 2012. **59**(5): p. 1069-78.
238. Williams, S.B., et al., *Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.* J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(3): p. 567-74.
239. Nugent, A.G., et al., *Impaired vasoconstriction to endothelin 1 in patients with NIDDM.* Diabetes, 1996. **45**(1): p. 105-7.
240. Hattori, Y., et al., *High-glucose-induced nuclear factor kappaB activation in vascular smooth muscle cells.* Cardiovasc Res, 2000. **46**(1): p. 188-97.
241. Suzuki, L.A., et al., *Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels.* Diabetes, 2001. **50**(4): p. 851-60.
242. Fukumoto, H., et al., *Immunohistochemical and morphometric evaluations of coronary atherosclerotic plaques associated with myocardial infarction and diabetes mellitus.* J Atheroscler Thromb, 1998. **5**(1): p. 29-35.
243. Uemura, S., et al., *Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress.* Circ Res, 2001. **88**(12): p. 1291-8.
244. Mulvany, M.J. and C. Aalkjaer, *Structure and function of small arteries.* Physiol Rev, 1990. **70**(4): p. 921-61.

245. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. N Engl J Med 1993. **329**: p. 977-86.
246. Pathak, D., et al., *Oral targeting of protein kinase C receptor: promising route for diabetic retinopathy?* Curr Drug Deliv, 2012. **9**(4): p. 405-13.
247. Christensen, K.L. and M.J. Mulvany, *Location of resistance arteries*. J Vasc Res, 2001. **38**(1): p. 1-12.
248. Rizzoni, D., et al., *Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Circulation, 2001. **103**(9): p. 1238-44.
249. Schofield, I., et al., *Vascular structural and functional changes in type 2 diabetes mellitus: evidence for the roles of abnormal myogenic responsiveness and dyslipidemia*. Circulation, 2002. **106**(24): p. 3037-43.
250. Clark, M.G., et al., *The microvasculature in insulin resistance and type 2 diabetes*. Semin Vasc Med, 2002. **2**(1): p. 21-31.
251. Henry, R.M., et al., *Carotid arterial remodeling: a maladaptive phenomenon in type 2 diabetes but not in impaired glucose metabolism: the Hoorn study*. Stroke, 2004. **35**(3): p. 671-6.
252. Emanuele, M.A., B.J. Buchanan, and C. Abaira, *Elevated leg systolic pressures and arterial calcification in diabetic occlusive vascular disease*. Diabetes Care, 1981. **4**(2): p. 289-92.
253. Olesen, P., et al., *Calcification of human vascular smooth muscle cells: associations with osteoprotegerin expression and acceleration by high-dose insulin*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(2): p. H1058-64.
254. Piarulli, F., G. Sartore, and A. Lapolla, *Glyco-oxidation and cardiovascular complications in type 2 diabetes: a clinical update*. Acta Diabetol, 2013. **50**(2): p. 101-10.
255. Cagliero, E., et al., *Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose*. J Clin Invest, 1988. **82**(2): p. 735-8.
256. Kanzaki, T., et al., *Transforming growth factor-beta receptor and fibronectin expressions in aortic smooth muscle cells in diabetic rats*. Diabetologia, 1997. **40**(4): p. 383-91.
257. Rizzoni, D. and E.A. Rosei, *Small artery remodeling in diabetes mellitus*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2009. **19**(8): p. 587-92.
258. Keynan, S., et al., *Increased expression of endothelin-converting enzyme-1c isoform in response to high glucose levels in endothelial cells*. J Vasc Res, 2004. **41**(2): p. 131-40.
259. Orasanu, G. and J. Plutzky, *The pathologic continuum of diabetic vascular disease*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(5 Suppl): p. S35-42.
260. Sodhi, C.P., Y.S. Kanwar, and A. Sahai, *Hypoxia and high glucose upregulate AT1 receptor expression and potentiate ANG II-induced proliferation in VSM cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(3): p. H846-52.
261. Natarajan, R., et al., *Effects of high glucose on vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol, 1997. **273**(5 Pt 2): p. H2224-31.
262. Kahn, M.B., et al., *Insulin resistance impairs circulating angiogenic progenitor cell function and delays endothelial regeneration*. Diabetes, 2011. **60**(4): p. 1295-303.

263. Tepper, O.M., et al., *Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures*. *Circulation*, 2002. **106**(22): p. 2781-6.
264. Loomans, C.J., et al., *Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2004. **53**(1): p. 195-9.
265. Fadini, G.P., et al., *Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(9): p. 2140-6.
266. Fadini, G.P., et al., *Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats*. *Diabetologia*, 2006. **49**(12): p. 3075-84.
267. Schiekofer, S., et al., *Impaired revascularization in a mouse model of type 2 diabetes is associated with dysregulation of a complex angiogenic-regulatory network*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(8): p. 1603-9.
268. Boodhwani, M., et al., *Functional, cellular, and molecular characterization of the angiogenic response to chronic myocardial ischemia in diabetes*. *Circulation*, 2007. **116**(11 Suppl): p. I31-7.
269. Sodha, N.R., et al., *Endostatin and angiostatin are increased in diabetic patients with coronary artery disease and associated with impaired coronary collateral formation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **296**(2): p. H428-34.
270. Waltenberger, J., *New horizons in diabetes therapy: the angiogenesis paradox in diabetes: description of the problem and presentation of a unifying hypothesis*. *Immunol, Endocrinol Metab Agents Med Chem* 2007. **7**: p. 87-93.
271. Santé, O.M.d.l. *Questions-réponses l'hypertension artérielle*,. 2013 [cited 2014 15 mai]; Available from: <http://www.who.int/features/qa/82/fr/>.
272. Carretero, O.A. and S. Oparil, *Essential hypertension. Part I: definition and etiology*. *Circulation*, 2000. **101**(3): p. 329-35.
273. Guimaraes, S. and D. Moura, *Vascular adrenoceptors: an update*. *Pharmacol Rev*, 2001. **53**(2): p. 319-56.
274. Raisman, R., M. Briley, and S.Z. Langer, *Specific labelling of postsynaptic alpha 1 adrenoceptors in rat heart ventricle by 3H-WB 4101*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1979. **307**(3): p. 223-6.
275. Schrier, R.W., *Effects of adrenergic nervous system and catecholamines on systemic and renal hemodynamics, sodium and water excretion and renin secretion*. *Kidney Int*, 1974. **6**(5): p. 291-306.
276. Johnson, J.A. and S.B. Liggett, *Cardiovascular pharmacogenomics of adrenergic receptor signaling: clinical implications and future directions*. *Clin Pharmacol Ther*, 2011. **89**(3): p. 366-78.
277. Woo, A.Y. and R.P. Xiao, *beta-Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside*. *Acta Pharmacol Sin*, 2012. **33**(3): p. 335-41.
278. Brodde, O.E., et al., *Coexistence of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in human right atrium. Direct identification by (+/-)-[125I]iodocyanopindolol binding*. *Circ Res*, 1983. **53**(6): p. 752-8.
279. Xiao, R.P., et al., *Beta 2-adrenergic receptor-stimulated increase in cAMP in rat heart cells is not coupled to changes in Ca²⁺ dynamics, contractility, or phospholamban phosphorylation*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(29): p. 19151-6.

280. Begonha, R., D. Moura, and S. Guimaraes, *Vascular beta-adrenoceptor-mediated relaxation and the tone of the tissue in canine arteries*. J Pharm Pharmacol, 1995. **47**(6): p. 510-3.
281. Edvinsson, L. and C. Owman, *Pharmacological characterization of adrenergic alpha and beta receptors mediating the vasomotor responses of cerebral arteries in vitro*. Circ Res, 1974. **35**(6): p. 835-49.
282. O'Donnell, S.R. and J.C. Wanstall, *Beta-1 and beta-2 adrenoceptor-mediated responses in preparations of pulmonary artery and aorta from young and aged rats*. J Pharmacol Exp Ther, 1984. **228**(3): p. 733-8.
283. Shen, Y.T., et al., *Differences in beta 3-adrenergic receptor cardiovascular regulation in conscious primates, rats and dogs*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **278**(3): p. 1435-43.
284. Schrier, R.W. and J.P. Goldberg, *The physiology of vasopressin release and the pathogenesis of impaired water excretion in adrenal, thyroid, and edematous disorders*. Yale J Biol Med, 1980. **53**(6): p. 525-41.
285. Menard, J., et al., *Biochemistry and regulation of angiotensinogen*. Clin Exp Hypertens A, 1983. **5**(7-8): p. 1005-19.
286. Damy, T., Guellich, A., Vermes, E., Deswarte, G., and Hittinger, L., *Physiologie et physiopathologie du système rénine-angiotensine- aldostérone*. mt cardio,, 2007. **3**(4).
287. Zaman, M.A., S. Oparil, and D.A. Calhoun, *Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(8): p. 621-36.
288. Hackenthal, E., et al., *Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion*. Physiol Rev, 1990. **70**(4): p. 1067-116.
289. Danser, A.H., et al., *Angiotensin I-to-II conversion in the human renal vascular bed*. J Hypertens, 1998. **16**(12 Pt 2): p. 2051-6.
290. Danser, A.H., et al., *Prorenin, renin, angiotensinogen, and angiotensin-converting enzyme in normal and failing human hearts. Evidence for renin binding*. Circulation, 1997. **96**(1): p. 220-6.
291. Carey, R.M. and H.M. Siragy, *Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation*. Endocr Rev, 2003. **24**(3): p. 261-71.
292. Ng, K.K. and J.R. Vane, *Conversion of angiotensin I to angiotensin II*. Nature, 1967. **216**(5117): p. 762-6.
293. Damy, T., Guellich, A., Vermes, E., Deswarte, G., and Hittinger, L., *Physiologie et physiopathologie du système rénine-angiotensine- aldostérone*. mt cardio, , 2007. **3**(4).
294. Harmer, D., et al., *Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme*. FEBS Lett, 2002. **532**(1-2): p. 107-10.
295. Donoghue, M., et al., *A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9*. Circ Res, 2000. **87**(5): p. E1-9.
296. McKinney, C.A., et al., *Angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9): function in cardiac and vascular remodelling*. Clin Sci (Lond), 2014. **126**(12): p. 815-27.
297. Mehta, P.K. and K.K. Griendling, *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C82-97.
298. Dzau, V.J., *Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis*. Hypertension, 2001. **37**(4): p. 1047-52.

299. Diet, F., et al., *Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease*. *Circulation*, 1996. **94**(11): p. 2756-67.
300. Schmidt-Ott, K.M., S. Kagiya, and M.I. Phillips, *The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis*. *Regul Pept*, 2000. **93**(1-3): p. 65-77.
301. Brown, N.J. and D.E. Vaughan, *Prothrombotic effects of angiotensin*. *Adv Intern Med*, 2000. **45**: p. 419-29.
302. Burnier, M. and H.R. Brunner, *Angiotensin II receptor antagonists*. *Lancet*, 2000. **355**(9204): p. 637-45.
303. Bosnyak, S., et al., *Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors*. *Clin Sci (Lond)*, 2011. **121**(7): p. 297-303.
304. Flores-Munoz, M., et al., *Angiotensin-(1-9) attenuates cardiac fibrosis in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat via the angiotensin type 2 receptor*. *Hypertension*, 2012. **59**(2): p. 300-7.
305. Turner, A.J., et al., *ACEH/ACE2 is a novel mammalian metallopeptidase and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2002. **80**(4): p. 346-53.
306. Iwata, M., et al., *Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **289**(6): p. H2356-63.
307. McCollum, L.T., P.E. Gallagher, and E.A. Tallant, *Angiotensin-(1-7) abrogates mitogen-stimulated proliferation of cardiac fibroblasts*. *Peptides*, 2012. **34**(2): p. 380-8.
308. Zhang, F., et al., *Different effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on vascular smooth muscle cell proliferation and migration*. *PLoS One*, 2010. **5**(8): p. e12323.
309. Langeveld, B., et al., *Angiotensin-(1-7) attenuates neointimal formation after stent implantation in the rat*. *Hypertension*, 2005. **45**(1): p. 138-41.
310. Zeng, W., et al., *Chronic angiotensin-(1-7) administration improves vascular remodeling after angioplasty through the regulation of the TGF-beta/Smad signaling pathway in rabbits*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **389**(1): p. 138-44.
311. Yang, J.M., et al., *Angiotensin-(1-7) dose-dependently inhibits atherosclerotic lesion formation and enhances plaque stability by targeting vascular cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. **33**(8): p. 1978-85.
312. Faria-Silva, R., F.V. Duarte, and R.A. Santos, *Short-term angiotensin(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats*. *Hypertension*, 2005. **46**(4): p. 948-52.
313. Fraga-Silva, R.A., et al., *The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets*. *Mol Med*, 2008. **14**(1-2): p. 28-35.
314. Mukoyama, M., et al., *Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(33): p. 24539-42.
315. Chen, X., et al., *Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(3 Pt 2): p. F299-304.
316. de Gasparo, M., et al., *International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors*. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(3): p. 415-72.

317. Griendling, K.K., et al., *Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1987. **262**(30): p. 14555-62.
318. Lassegue, B., et al., *Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation*. Mol Pharmacol, 1995. **48**(4): p. 601-9.
319. Saavedra J.M., a.T., B., *Angiotensin receptor*. 1994.
320. Siragy, H., *Angiotensin II receptor blockers: review of the binding characteristics*. Am J Cardiol. , 1999. **18**(84(10A)): p. 3S-8S.
321. Nickenig, G., et al., *Hypercholesterolemia is associated with enhanced angiotensin AT1-receptor expression*. Am J Physiol, 1997. **272**(6 Pt 2): p. H2701-7.
322. Takayanagi, R., et al., *Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **183**(2): p. 910-6.
323. Nickenig, G., et al., *Differential effects of estrogen and progesterone on AT(1) receptor gene expression in vascular smooth muscle cells*. Circulation, 2000. **102**(15): p. 1828-33.
324. Barrett, J.D., et al., *Erythropoietin upregulates angiotensin receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells*. J Hypertens, 1998. **16**(12 Pt 1): p. 1749-57.
325. Gunther, S., M.A. Gimbrone, Jr., and R.W. Alexander, *Regulation by angiotensin II of its receptors in resistance blood vessels*. Nature, 1980. **287**(5779): p. 230-2.
326. Ullian, M.E., et al., *Regulation of vascular angiotensin II receptors by EGF*. Am J Physiol, 1997. **273**(4 Pt 1): p. C1241-9.
327. Nickenig, G., et al., *Regulation of angiotensin AT1 receptor gene expression during cell growth of vascular smooth muscle cells*. Eur J Pharmacol, 1996. **297**(3): p. 307-12.
328. Griendling, K.K., et al., *Angiotensin II receptor pharmacology*. Adv Pharmacol, 1994. **28**: p. 269-306.
329. Shanmugam, S., P. Corvol, and J.M. Gasc, *Angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in the developing cardiopulmonary system of the rat*. Hypertension, 1996. **28**(1): p. 91-7.
330. Dinh, D.T., et al., *Angiotensin receptors: distribution, signalling and function*. Clin Sci (Lond), 2001. **100**(5): p. 481-92.
331. Schiffrin, E.L., *Effects of aldosterone on the vasculature*. Hypertension, 2006. **47**(3): p. 312-8.
332. Rocha, R. and C.T. Stier, Jr., *Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues*. Trends Endocrinol Metab, 2001. **12**(7): p. 308-14.
333. Pitt, B., et al., *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1309-21.
334. Pitt, B., et al., *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 709-17.
335. Liu, S.L., et al., *Aldosterone regulates vascular reactivity: short-term effects mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation*. Circulation, 2003. **108**(19): p. 2400-6.

336. Schmidt, B.M., et al., *Rapid nongenomic effects of aldosterone on human forearm vasculature*. Hypertension, 2003. **42**(2): p. 156-60.
337. Rajagopalan, S., et al., *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, 1996. **97**(8): p. 1916-23.
338. Feener, E.P., et al., *Angiotensin II induces plasminogen activator inhibitor-1 and -2 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1995. **95**(3): p. 1353-62.
339. Pueyo, M.E., et al., *Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(3): p. 645-51.
340. Schieffer, B., et al., *Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability*. Circulation, 2000. **101**(12): p. 1372-8.
341. Ruiz-Ortega, M., et al., *Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms*. Circ Res, 2000. **86**(12): p. 1266-72.
342. Kim, S., et al., *Angiotensin blockade inhibits activation of mitogen-activated protein kinases in rat balloon-injured artery*. Circulation, 1998. **97**(17): p. 1731-7.
343. Griendling, K.K., B. Lassegue, and R.W. Alexander, *Angiotensin receptors and their therapeutic implications*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1996. **36**: p. 281-306.
344. Sharifi, A.M. and E.L. Schiffrin, *Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: effect of endothelin receptor antagonism*. J Hypertens, 1997. **15**(12 Pt 1): p. 1441-8.
345. Diep, Q.N., J.S. Li, and E.L. Schiffrin, *In vivo study of AT(1) and AT(2) angiotensin receptors in apoptosis in rat blood vessels*. Hypertension, 1999. **34**(4 Pt 1): p. 617-24.
346. Prewitt, R.L., Chen, H., and R. Dowell, *Development of microvascular rarefaction in the spontaneously hypertensive rat*. Am J Physiol, 1982. **243**(2): p. H243-51.
347. Selye, H. and H. Stone, *Pathogenesis of the cardiovascular and renal changes which usually accompany malignant hypertension*. J Urol, 1946. **56**: p. 399-419.
348. Intengan, H.D., et al., *Mechanics and composition of human subcutaneous resistance arteries in essential hypertension*. Hypertension, 1999. **33**(1 Pt 2): p. 569-74.
349. Vasa, M., et al., *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease*. Circ Res, 2001. **89**(1): p. E1-7.
350. Imanishi, T., T. Hano, and I. Nishio, *Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress*. J Hypertens, 2005. **23**(1): p. 97-104.
351. Imanishi, T., T. Hano, and I. Nishio, *Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced proliferation and network formation of endothelial progenitor cells*. Hypertens Res, 2004. **27**(2): p. 101-8.
352. Thum, T.S., K.; Fleissner, F.; Wiebking, V.; Dietrich, B.; Widder, J. D., Jazbutc, V., Hahner, S., Erti, G. and Bauersachs, J., *Impairment of endothelial progenitor cell function and vascularization capacity by aldosterone in mice and human*. European Heart Journal, 2011. **32**: p. 2175-1286.

353. Mokry, J., et al., *Nestin expression by newly formed human blood vessels*. Stem Cells Dev, 2004. **13**(6): p. 658-64.
354. Oikawa, H., et al., *Expression profiles of nestin in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro*. Exp Cell Res, 2010. **316**(6): p. 940-50.
355. Chabot, A., et al., *Nestin is a Marker of Lung Remodeling Secondary to Myocardial Infarction and Type I Diabetes in the Rat*. J Cell Physiol, 2014.
356. El-Helou, V., et al., *The cardiac neural stem cell phenotype is compromised in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy*. J Cell Physiol, 2009. **220**(2): p. 440-9.
357. Lendahl, U., L.B. Zimmerman, and R.D. McKay, *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein*. Cell, 1990. **60**(4): p. 585-95.
358. Sejersen, T. and U. Lendahl, *Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development*. J Cell Sci, 1993. **106 (Pt 4)**: p. 1291-300.
359. Vaittinen, S., et al., *Specific and innervation-regulated expression of the intermediate filament protein nestin at neuromuscular and myotendinous junctions in skeletal muscle*. Am J Pathol, 1999. **154**(2): p. 591-600.
360. Pearson education, i. *Cells - Structure and Function*. 2011 [cited 2014 4 avril]; Available from: http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/07_table_3_cytoskeleton-L.jpg.
361. Steinert, P.M. and R.K. Liem, *Intermediate filament dynamics*. Cell, 1990. **60**(4): p. 521-3.
362. Sahlgren, C.M., et al., *Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16456-63.
363. Lodish H, B.A., Kaiser CA., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., and Scott, MP., *Molecular Cell Biology* 7th edition ed. 2012. 973.
364. Cooper GM., H., RE., *The Cell: A Molecular Approach*. . 5nd edition ed. 2009. 820.
365. Fuchs, E. and K. Weber, *Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 345-82.
366. Hatzfeld, M. and K. Weber, *Tailless keratins assemble into regular intermediate filaments in vitro*. J Cell Sci, 1990. **97 (Pt 2)**: p. 317-24.
367. Sjoberg, G., et al., *Colocalization of nestin and vimentin/desmin in skeletal muscle cells demonstrated by three-dimensional fluorescence digital imaging microscopy*. Exp Cell Res, 1994. **214**(2): p. 447-58.
368. Monteiro, M.J. and D.W. Cleveland, *Expression of NF-L and NF-M in fibroblasts reveals coassembly of neurofilament and vimentin subunits*. J Cell Biol, 1989. **108**(2): p. 579-93.
369. Tang, D.D., *Intermediate filaments in smooth muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **294**(4): p. C869-78.
370. Sahlgren, C.M., et al., *Cdk5 regulates the organization of Nestin and its association with p35*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(14): p. 5090-106.
371. Vaittinen, S., et al., *The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle*. J Neuropathol Exp Neurol, 2001. **60**(6): p. 588-97.
372. Frank, E.D. and L. Warren, *Aortic smooth muscle cells contain vimentin instead of desmin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(5): p. 3020-4.

373. Hockfield, S. and R.D. McKay, *Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system*. J Neurosci, 1985. **5**(12): p. 3310-28.
374. Johansson, C.B., et al., *Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system*. Cell, 1999. **96**(1): p. 25-34.
375. Wiese, C., et al., *Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells?* Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(19-20): p. 2510-22.
376. Zimmerman, L., et al., *Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors*. Neuron, 1994. **12**(1): p. 11-24.
377. Aihara, M., et al., *Angiogenic endothelium-specific nestin expression is enhanced by the first intron of the nestin gene*. Lab Invest, 2004. **84**(12): p. 1581-92.
378. Marvin, M.J., et al., *A rod end deletion in the intermediate filament protein nestin alters its subcellular localization in neuroepithelial cells of transgenic mice*. J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 14)**: p. 1951-61.
379. Gresle, M.M., H. Butzkueven, and G. Shaw, *Neurofilament proteins as body fluid biomarkers of neurodegeneration in multiple sclerosis*. Mult Scler Int, 2011. **2011**: p. 315406.
380. Dahlstrand, J., et al., *Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments*. J Cell Sci, 1992. **103 (Pt 2)**: p. 589-97.
381. Yang, J., et al., *Mouse nestin cDNA cloning and protein expression in the cytoskeleton of transfected cells*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1520**(3): p. 251-4.
382. Chou, Y.H., et al., *Intermediate filament reorganization during mitosis is mediated by p34cdc2 phosphorylation of vimentin*. Cell, 1990. **62**(6): p. 1063-71.
383. Chou, Y.H., E. Rosevear, and R.D. Goldman, *Phosphorylation and disassembly of intermediate filaments in mitotic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(6): p. 1885-9.
384. Chou, Y.H., et al., *Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(4): p. 1468-78.
385. Cattaneo, E. and R. McKay, *Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor*. Nature, 1990. **347**(6295): p. 762-5.
386. Lendahl, U., *Transgenic analysis of central nervous system development and regeneration*. Acta Anaesthesiol Scand Suppl, 1997. **110**: p. 116-8.
387. Mujtaba, T., M. Mayer-Proschel, and M.S. Rao, *A common neural progenitor for the CNS and PNS*. Dev Biol, 1998. **200**(1): p. 1-15.
388. Kachinsky, A.M., J.A. Dominov, and J.B. Miller, *Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart*. J Histochem Cytochem, 1995. **43**(8): p. 843-7.
389. Kachinsky, A.M., J.A. Dominov, and J.B. Miller, *Myogenesis and the intermediate filament protein, nestin*. Dev Biol, 1994. **165**(1): p. 216-28.
390. Terling, C., et al., *Expression of the intermediate filament nestin during rodent tooth development*. Int J Dev Biol, 1995. **39**(6): p. 947-56.
391. Frojzman, K., et al., *The intermediate filament protein nestin occurs transiently in differentiating testis of rat and mouse*. Differentiation, 1997. **61**(4): p. 243-9.
392. Li, L., et al., *Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(17): p. 9958-61.

393. Niki, T., et al., *Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells*. Hepatology, 1999. **29**(2): p. 520-7.
394. Daniel, C., et al., *Nestin expression in repopulating mesangial cells promotes their proliferation*. Lab Invest, 2008. **88**(4): p. 387-97.
395. Michalczyk, K. and M. Ziman, *Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation*. Histol Histopathol, 2005. **20**(2): p. 665-71.
396. Drapeau, J., et al., *Nestin-expressing neural stem cells identified in the scar following myocardial infarction*. J Cell Physiol, 2005. **204**(1): p. 51-62.
397. El-Helou, V., et al., *Resident nestin⁺ neural-like cells and fibers are detected in normal and damaged rat myocardium*. Hypertension, 2005. **46**(5): p. 1219-25.
398. Quaini, F., et al., *Chimerism of the transplanted heart*. N Engl J Med, 2002. **346**(1): p. 5-15.
399. Amoh, Y., et al., *Nestin-linked green fluorescent protein transgenic nude mouse for imaging human tumor angiogenesis*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5352-7.
400. Mokry, J. and S. Nemecek, *Cerebral angiogenesis shows nestin expression in endothelial cells*. Gen Physiol Biophys, 1999. **18 Suppl 1**: p. 25-9.
401. Shimizu, T., et al., *Nestin expression in vascular malformations: a novel marker for proliferative endothelium*. Neurol Med Chir (Tokyo), 2006. **46**(3): p. 111-7.
402. Suguta, M., et al., *Nestin, a maker for multilineage potential of cells from human primary and restenotic coronary artery plaques*. Int J Cardiol, 2007. **121**(1): p. 53-6.
403. Suzuki, S., et al., *The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature*. J Histochem Cytochem, 2010. **58**(8): p. 721-30.
404. Yamahatsu, K., et al., *Nestin as a novel therapeutic target for pancreatic cancer via tumor angiogenesis*. Int J Oncol, 2012. **40**(5): p. 1345-57.
405. Zhao, Z., et al., *Nestin positively regulates the Wnt/ss-catenin pathway and the proliferation, survival, and invasiveness of breast cancer stem cells*. Breast Cancer Res, 2014. **16**(4): p. 408.
406. El-Helou, V., et al., *The rat heart contains a neural stem cell population; role in sympathetic sprouting and angiogenesis*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(5): p. 694-702.
407. El-Helou, V., et al., *Cardiac resident nestin(+) cells participate in reparative vascularisation*. J Cell Physiol, 2013. **228**(9): p. 1844-53.
408. Klein, T., et al., *Nestin is expressed in vascular endothelial cells in the adult human pancreas*. J Histochem Cytochem, 2003. **51**(6): p. 697-706.
409. Kruger, K., et al., *Microvessel proliferation by co-expression of endothelial nestin and Ki-67 is associated with a basal-like phenotype and aggressive features in breast cancer*. Breast, 2013. **22**(3): p. 282-8.
410. Mokry, J., et al., *Expression of intermediate filament nestin in blood vessels of neural and non-neural tissues*. Acta Medica (Hradec Kralove), 2008. **51**(3): p. 173-9.
411. Huang, Y.L., et al., *Thrombin induces nestin expression via the transactivation of EGFR signalings in rat vascular smooth muscle cells*. Cell Signal, 2009. **21**(6): p. 954-68.
412. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
413. Cui, Y., et al., *MiR-125b orchestrates cell proliferation, differentiation and migration in neural stem/progenitor cells by targeting Nestin*. BMC Neurosci, 2012. **13**: p. 116.

414. Sahlgren, C.M., et al., *A nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death*. EMBO J, 2006. **25**(20): p. 4808-19.
415. Liu, W., et al., *Nestin protects mouse podocytes against high glucose-induced apoptosis by a Cdk5-dependent mechanism*. J Cell Biochem, 2012. **113**(10): p. 3186-96.
416. Kaldis, P. and H.E. Richardson, *When cell cycle meets development*. Development, 2012. **139**(2): p. 225-30.
417. Ohshima, T., et al., *Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 11173-8.
418. Ohshima, T., et al., *Migration defects of cdk5(-/-) neurons in the developing cerebellum is cell autonomous*. J Neurosci, 1999. **19**(14): p. 6017-26.
419. Lazaro, J.B., et al., *Cyclin dependent kinase 5, cdk5, is a positive regulator of myogenesis in mouse C2 cells*. J Cell Sci, 1997. **110** (Pt 10): p. 1251-60.
420. Philpott, A., et al., *The role of cyclin-dependent kinase 5 and a novel regulatory subunit in regulating muscle differentiation and patterning*. Genes Dev, 1997. **11**(11): p. 1409-21.
421. de Thonel, A., et al., *Protein kinase Czeta regulates Cdk5/p25 signaling during myogenesis*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(8): p. 1423-34.
422. Pallari, H.M., et al., *Nestin as a regulator of Cdk5 in differentiating myoblasts*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(9): p. 1539-49.
423. Nakamura, T., M.C. Colbert, and J. Robbins, *Neural crest cells retain multipotential characteristics in the developing valves and label the cardiac conduction system*. Circ Res, 2006. **98**(12): p. 1547-54.
424. Tomita, Y., et al., *Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart*. J Cell Biol, 2005. **170**(7): p. 1135-46.
425. Aki, R., et al., *Nestin-expressing interfollicular blood vessel network contributes to skin transplant survival and wound healing*. J Cell Biochem, 2010. **110**(1): p. 80-6.
426. Piras, F., et al., *The stem cell marker nestin predicts poor prognosis in human melanoma*. Oncol Rep, 2010. **23**(1): p. 17-24.
427. Thomas, S.K., et al., *Nestin is a potential mediator of malignancy in human neuroblastoma cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 27994-9.
428. Krupkova, O., Jr., et al., *Analysis of nuclear nestin localization in cell lines derived from neurogenic tumors*. Tumour Biol, 2011. **32**(4): p. 631-9.
429. Veselska, R., et al., *Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 32.
430. Ehrmann, J., Z. Kolar, and J. Mokry, *Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours*. J Clin Pathol, 2005. **58**(2): p. 222-3.
431. Beguin, P.C., et al., *Nestin expression is lost in ventricular fibroblasts during postnatal development of the rat heart and re-expressed in scar myofibroblasts*. J Cell Physiol, 2012. **227**(2): p. 813-20.
432. Amoh, Y., et al., *Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(36): p. 13291-5.
433. Fernandes, K.J., et al., *A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(11): p. 1082-93.

434. Oishi, K., et al., *Angiogenesis in vitro: vascular tube formation from the differentiation of neural stem cells*. J Pharmacol Sci, 2004. **96**(2): p. 208-18.
435. Ii, M., et al., *Concurrent vasculogenesis and neurogenesis from adult neural stem cells*. Circ Res, 2009. **105**(9): p. 860-8.
436. Beguin, P.C., et al., *Nestin (+) stem cells independently contribute to neural remodelling of the ischemic heart*. J Cell Physiol, 2011. **226**(5): p. 1157-65.
437. Lakatta, E.G., *Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging*. Circulation, 2003. **107**(3): p. 490-7.
438. Weiss, R.B., *Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity*. Cancer Treat Rep, 1982. **66**(3): p. 427-38.
439. Ikebukuro, K., et al., *Treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus by transplantation of islet cells plus bone marrow cells via portal vein in rats*. Transplantation, 2002. **73**(4): p. 512-8.
440. Zimpelmann, J., et al., *Early diabetes mellitus stimulates proximal tubule renin mRNA expression in the rat*. Kidney Int, 2000. **58**(6): p. 2320-30.
441. Chabot, A., et al., *The neurogenic response of cardiac resident nestin(+) cells was associated with GAP43 upregulation and abrogated in a setting of type I diabetes*. Cardiovasc Diabetol, 2013. **12**: p. 114.
442. van Bilsen, M., et al., *Hypertension is a conditional factor for the development of cardiac hypertrophy in type 2 diabetic mice*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e85078.
443. Sena, C.M., A.M. Pereira, and R. Seica, *Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(12): p. 2216-31.
444. Johnstone, M.T., et al., *Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus*. Circulation, 1993. **88**(6): p. 2510-6.
445. Clarkson, P., et al., *Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels*. J Am Coll Cardiol, 1996. **28**(3): p. 573-9.
446. Zenere, B.M., et al., *Noninvasive detection of functional alterations of the arterial wall in IDDM patients with and without microalbuminuria*. Diabetes Care, 1995. **18**(7): p. 975-82.
447. Rizzoni, D., et al., *Endothelial dysfunction in small resistance arteries of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus*. J Hypertens, 2001. **19**(5): p. 913-9.
448. Goodfellow, J., et al., *Endothelium and inelastic arteries: an early marker of vascular dysfunction in non-insulin dependent diabetes*. BMJ, 1996. **312**(7033): p. 744-5.
449. Joffe, II, et al., *Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetic rat: noninvasive assessment with doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway*. J Am Coll Cardiol, 1999. **34**(7): p. 2111-9.
450. Trost, S.U., et al., *Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy*. Diabetes, 2002. **51**(4): p. 1166-71.
451. Litwin, S.E., et al., *Abnormal cardiac function in the streptozotocin-diabetic rat. Changes in active and passive properties of the left ventricle*. J Clin Invest, 1990. **86**(2): p. 481-8.
452. Cook, C.L., et al., *Developmentally timed expression of an embryonic growth phenotype in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1994. **74**(2): p. 189-96.

453. Gerhardt, H., et al., *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia*. J Cell Biol, 2003. **161**(6): p. 1163-77.
454. Tsai, S., et al., *TGF-beta through Smad3 signaling stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(2): p. H540-9.
455. Ferns, G.A., et al., *Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF*. Science, 1991. **253**(5024): p. 1129-32.
456. Hendzel, M.J., et al., *Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation*. Chromosoma, 1997. **106**(6): p. 348-60.
457. Van Hooser, A., et al., *Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation*. J Cell Sci, 1998. **111** (Pt **23**): p. 3497-506.
458. Avogaro, A., et al., *Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006. **16 Suppl 1**: p. S39-45.
459. Nguyen, A.T., et al., *Smooth muscle cell plasticity: fact or fiction?* Circ Res, 2013. **112**(1): p. 17-22.
460. Gordon, D., et al., *Cell proliferation in human coronary arteries*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4600-4.
461. Kamel, O.W., et al., *Thymidine labeling index and Ki-67 growth fraction in lesions of the breast*. Am J Pathol, 1989. **134**(1): p. 107-13.
462. Sims, F.H., *A comparison of coronary and internal mammary arteries and implications of the results in the etiology of arteriosclerosis*. Am Heart J, 1983. **105**(4): p. 560-6.
463. Spagnoli, L.G., et al., *Autoradiographic studies of the smooth muscle cells in human arteries*. Paroi Arterielle, 1981. **7**(3): p. 107-12.
464. Li, X., et al., *Suppression of smooth-muscle alpha-actin expression by platelet-derived growth factor in vascular smooth-muscle cells involves Ras and cytosolic phospholipase A2*. Biochem J, 1997. **327** (Pt **3**): p. 709-16.
465. Thyberg, J. and A. Hultgardh-Nilsson, *Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently*. Cell Tissue Res, 1994. **276**(2): p. 263-71.
466. Thomas, W.A., et al., *Alterations in population dynamics of arterial smooth muscle cells during atherogenesis. IV. Evidence for a polyclonal origin of hypercholesterolemic diet-induced atherosclerotic lesions in young swine*. Exp Mol Pathol, 1976. **24**(2): p. 244-60.
467. Clowes, A.W., M.A. Reidy, and M.M. Clowes, *Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium*. Lab Invest, 1983. **49**(3): p. 327-33.
468. Cifarelli, V., et al., *Human proinsulin C-peptide reduces high glucose-induced proliferation and NF-kappaB activation in vascular smooth muscle cells*. Atherosclerosis, 2008. **201**(2): p. 248-57.

469. Kobayashi, Y., et al., *Human proinsulin C-peptide prevents proliferation of rat aortic smooth muscle cells cultured in high-glucose conditions*. Diabetologia, 2005. **48**(11): p. 2396-401.
470. Nakamura, J., et al., *Glucose-induced hyperproliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells through polyol pathway hyperactivity*. Diabetologia, 2001. **44**(4): p. 480-7.
471. Madi, H.A., et al., *Inherent differences in morphology, proliferation, and migration in saphenous vein smooth muscle cells cultured from nondiabetic and Type 2 diabetic patients*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **297**(5): p. C1307-17.
472. Sobue, K., K. Hayashi, and W. Nishida, *Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation*. Mol Cell Biochem, 1999. **190**(1-2): p. 105-18.
473. Lee, S.H., et al., *Proliferation and differentiation of smooth muscle cell precursors occurs simultaneously during the development of the vessel wall*. Dev Dyn, 1997. **209**(4): p. 342-52.
474. Porter, K.E. and K. Riches, *The vascular smooth muscle cell: a therapeutic target in Type 2 diabetes?* Clin Sci (Lond), 2013. **125**(4): p. 167-82.
475. Yamamoto, M., et al., *Acute glucose-induced downregulation of PKC-betaII accelerates cultured VSMC proliferation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(3): p. C587-95.
476. Turner, N.A., et al., *Smooth muscle cells cultured from human saphenous vein exhibit increased proliferation, invasion, and mitogen-activated protein kinase activation in vitro compared with paired internal mammary artery cells*. J Vasc Surg, 2007. **45**(5): p. 1022-8.
477. Maione, R. and P. Amati, *Interdependence between muscle differentiation and cell-cycle control*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1332**(1): p. M19-30.
478. Walsh, K. and H. Perlman, *Cell cycle exit upon myogenic differentiation*. Curr Opin Genet Dev, 1997. **7**(5): p. 597-602.
479. Au, Y.P., et al., *Mechanisms of inhibition by heparin of vascular smooth muscle cell proliferation and migration*. Haemostasis, 1993. **23 Suppl 1**: p. 177-82.
480. Karnovsky, M.J., et al., *Heparin, heparan sulfate, smooth muscle cells, and atherosclerosis*. Ann N Y Acad Sci, 1989. **556**: p. 268-81.
481. Orlandi, A., P. Ropraz, and G. Gabbiani, *Proliferative activity and alpha-smooth muscle actin expression in cultured rat aortic smooth muscle cells are differently modulated by transforming growth factor-beta 1 and heparin*. Exp Cell Res, 1994. **214**(2): p. 528-36.
482. Shi, N., W.B. Xie, and S.Y. Chen, *Cell division cycle 7 is a novel regulator of transforming growth factor-beta-induced smooth muscle cell differentiation*. J Biol Chem, 2012. **287**(9): p. 6860-7.
483. Toivola, D.M., et al., *Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(11): p. 608-17.
484. Pallari, H.M., Eriksson, J.E. , *Intermediate filaments as signaling platforms*. Sci STKE, 2006. **366**(pe53).
485. Hyder, C.L., et al., *Providing cellular signposts--post-translational modifications of intermediate filaments*. FEBS Lett, 2008. **582**(14): p. 2140-8.

486. Eriksson, J.E., et al., *Introducing intermediate filaments: from discovery to disease*. J Clin Invest, 2009. **119**(7): p. 1763-71.
487. Shen, Q., et al., *Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts*. Development, 2002. **129**(20): p. 4843-53.
488. Bieberich, E., et al., *Regulation of cell death in mitotic neural progenitor cells by asymmetric distribution of prostate apoptosis response 4 (PAR-4) and simultaneous elevation of endogenous ceramide*. J Cell Biol, 2003. **162**(3): p. 469-79.
489. Bieberich, E., et al., *Selective apoptosis of pluripotent mouse and human stem cells by novel ceramide analogues prevents teratoma formation and enriches for neural precursors in ES cell-derived neural transplants*. J Cell Biol, 2004. **167**(4): p. 723-34.
490. Cheung, Z.H. and N.Y. Ip, *Cdk5: mediator of neuronal death and survival*. Neurosci Lett, 2004. **361**(1-3): p. 47-51.
491. Cruz, J.C. and L.H. Tsai, *A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease*. Curr Opin Neurobiol, 2004. **14**(3): p. 390-4.
492. Paglini, G. and A. Caceres, *The role of the Cdk5--p35 kinase in neuronal development*. Eur J Biochem, 2001. **268**(6): p. 1528-33.
493. Sharma, M.R., G.P. Tuszynski, and M.C. Sharma, *Angiostatin-induced inhibition of endothelial cell proliferation/apoptosis is associated with the down-regulation of cell cycle regulatory protein cdk5*. J Cell Biochem, 2004. **91**(2): p. 398-409.
494. Rosales, J.L. and K.Y. Lee, *Extraneuronal roles of cyclin-dependent kinase 5*. Bioessays, 2006. **28**(10): p. 1023-34.
495. Fu, A.K., et al., *Cdk5 is involved in neuregulin-induced AChR expression at the neuromuscular junction*. Nat Neurosci, 2001. **4**(4): p. 374-81.
496. Zhong, W., et al., *L-arginine attenuates high glucose-accelerated senescence in human umbilical vein endothelial cells*. Diabetes Res Clin Pract, 2010. **89**(1): p. 38-45.
497. Chan, K.C., et al., *Simvastatin inhibits cell cycle progression in glucose-stimulated proliferation of aortic vascular smooth muscle cells by up-regulating cyclin dependent kinase inhibitors and p53*. Pharmacol Res, 2008. **58**(3-4): p. 247-56.
498. Tammali, R., et al., *Aldose reductase regulates vascular smooth muscle cell proliferation by modulating G1/S phase transition of cell cycle*. Endocrinology, 2010. **151**(5): p. 2140-50.
499. O'Hare, M.J., et al., *Differential roles of nuclear and cytoplasmic cyclin-dependent kinase 5 in apoptotic and excitotoxic neuronal death*. J Neurosci, 2005. **25**(39): p. 8954-66.
500. Tsai, L.H., et al., *Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system*. Development, 1993. **119**(4): p. 1029-40.
501. Fu, W.Y., et al., *Induction of Cdk5 activity in rat skeletal muscle after nerve injury*. Neuroreport, 2002. **13**(2): p. 243-7.
502. Liu, W., Zhang, Y., Liu, S., Liu, Q., Hao, J., Shi, Y., Zhao, S., and Duan, H.. *The Expression of Intermediate Filament Protein Nestin and Its Association with Cyclin-Dependent Kinase 5 in the Glomeruli of Rats With Diabetic Nephropathy*. Am J Med Sci. , 2013. **345**(6): p. 470-477.
503. Ezzati, M., et al., *Selected major risk factors and global and regional burden of disease*. Lancet, 2002. **360**(9343): p. 1347-60.

504. Goldblatt, H., et al., *Studies on Experimental Hypertension : I. The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia*. J Exp Med, 1934. **59**(3): p. 347-79.
505. Sarikonda, K.V., et al., *Experimental animal models of hypertension*. J Am Soc Hypertens, 2009. **3**(3): p. 158-65.
506. Wilson, C. and F.B. Byrom, *Renal changes in malignant hypertension*. . Lancet 1939. **1**: p. 136-9.
507. Pickering, G.W. and M. Prinzmetal, *Experimental hypertension of renal origin in the rabbit*. . Clin Sci, 1937. **3**: p. 357-68.
508. Romero JC, F.-O.M., Schryver S. Pathophysiology of hypertension: the use of experimental models to understand the clinical features of the hypertensive disease. In: Spittel JA Jr, ed. Clinical medicine, Vol 7. Philadelphia, PA: Harper & Row, 1981:1-51., .
509. Lerman, L.O., et al., *Noninvasive evaluation of a novel swine model of renal artery stenosis*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(7): p. 1455-65.
510. Panek, R.L., et al., *Development of a high renin model of hypertension in the cynomolgus monkey*. Clin Exp Hypertens A, 1991. **13**(8): p. 1395-414.
511. Wiesel, P., et al., *Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice*. Hypertension, 1997. **29**(4): p. 1025-30.
512. Guyton, A.C., *Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids*. Science, 1991. **252**(5014): p. 1813-6.
513. McCubbin, J.W., et al., *Arterial hypertension elicited by subpressor amounts of angiotensin*. Science, 1965. **149**(3690): p. 1394-5.
514. Lerman, L.O., et al., *Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension*. Hypertension, 2001. **37**(2 Pt 2): p. 541-6.
515. Christensen, K.L., *Reducing pulse pressure in hypertension may normalize small artery structure*. Hypertension, 1991. **18**(6): p. 722-7.
516. Mulvany, M.J., O.K. Hansen, and C. Aalkjaer, *Direct evidence that the greater contractility of resistance vessels in spontaneously hypertensive rats is associated with a narrowed lumen, a thickened media, and an increased number of smooth muscle cell layers*. Circ Res, 1978. **43**(6): p. 854-64.
517. Li, J.S., et al., *Effect of endothelin antagonism on blood pressure and vascular structure in renovascular hypertensive rats*. Am J Physiol, 1996. **271**(1 Pt 2): p. H88-93.
518. Boegehold, M.A., *Microvascular changes associated with high salt intake and hypertension in Dahl rats*. Int J Microcirc Clin Exp, 1993. **12**(2): p. 143-56.
519. Ono, Z., R.L. Prewitt, and D.L. Stacy, *Arteriolar changes in developing and chronic stages of two-kidney, one clip hypertension*. Hypertension, 1989. **14**(1): p. 36-43.
520. Hashimoto, H., R.L. Prewitt, and C.W. Efav, *Alterations in the microvasculature of one-kidney, one-clip hypertensive rats*. Am J Physiol, 1987. **253**(4 Pt 2): p. H933-40.
521. Larouche, I. and E.L. Schiffrin, *Cardiac microvasculature in DOCA-salt hypertensive rats : effect of endothelin ET(A) receptor antagonism*. Hypertension, 1999. **34**(4 Pt 2): p. 795-801.
522. Owens, G.K. and S.M. Schwartz, *Alterations in vascular smooth muscle mass in the spontaneously hypertensive rat. Role of cellular hypertrophy, hyperploidy, and hyperplasia*. Circ Res, 1982. **51**(3): p. 280-9.

523. Folkow, B., *Physiological aspects of primary hypertension*. *Physiol Rev*, 1982. **62**(2): p. 347-504.
524. Thybo, N.K., et al., *Some pharmacological and elastic characteristics of isolated subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension*. *J Hypertens*, 1996. **14**(8): p. 993-8.
525. Ponticos, M. and B.D. Smith, *Extracellular matrix synthesis in vascular disease: hypertension, and atherosclerosis*. *J Biomed Res*, 2014. **28**(1): p. 25-39.
526. Raines, E.W., H. Koyama, and N.O. Carragher, *The extracellular matrix dynamically regulates smooth muscle cell responsiveness to PDGF*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **902**: p. 39-51; discussion 51-2.
527. O'Callaghan, C.J. and B. Williams, *Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta(1)*. *Hypertension*, 2000. **36**(3): p. 319-24.
528. Ooshima, A., et al., *Increased collagen synthesis in blood vessels of hypertensive rats and its reversal by antihypertensive agents*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974. **71**(8): p. 3019-23.
529. Intengan, H.D. and E.L. Schiffrin, *Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis*. *Hypertension*, 2001. **38**(3 Pt 2): p. 581-7.
530. Kato, H., et al., *Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells*. *J Hypertens*, 1991. **9**(1): p. 17-22.
531. Itoh, H., et al., *Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(5): p. 2268-74.
532. Otsuka, S., et al., *Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats*. *Hypertension*, 1998. **32**(3): p. 467-72.
533. Levy, B.I., et al., *Chronic blockade of AT2-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(2): p. 418-25.
534. Sharifi, A.M. and E.L. Schiffrin, *Apoptosis in vasculature of spontaneously hypertensive rats: effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor and a calcium channel antagonist*. *Am J Hypertens*, 1998. **11**(9): p. 1108-16.
535. Benetos, A., P. Lacolley, and M.E. Safar, *Prevention of aortic fibrosis by spironolactone in spontaneously hypertensive rats*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(6): p. 1152-6.
536. Iwai, N., et al., *Induction of renin in medial smooth muscle cells by balloon injury*. *Hypertension*, 1997. **29**(4): p. 1044-50.
537. Swales, J.D. and A.M. Heagerty, *Vascular renin-angiotensin system: the unanswered questions*. *J Hypertens Suppl*, 1987. **5**(2): p. S1-5.
538. Mizuno, K., et al., *Effect of delapril on the vascular angiotensin II release in isolated hind legs of the spontaneously hypertensive rat: evidence for potential relevance of vascular angiotensin II to the maintenance of hypertension*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1991. **18**(9): p. 619-25.
539. Muller, D.N. and F.C. Luft, *The renin-angiotensin system in the vessel wall*. *Basic Res Cardiol*, 1998. **93 Suppl 2**: p. 7-14.
540. Paiardi, S., et al., *Immunohistochemical evaluation of microvascular rarefaction in hypertensive humans and in spontaneously hypertensive rats*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2009. **42**(4): p. 259-68.

541. Owens, G., *Influence of blood pressure on development of aortic medial smooth muscle hypertrophy in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 1979. **9**: p. 178-187.
542. Heylen, E., et al., *Nitric oxide-mediated dilation of arterioles to intraluminal administration of aldosterone*. J Cardiovasc Pharmacol, 2009. **54**(6): p. 535-42.
543. Oberleithner, H., *Aldosterone makes human endothelium stiff and vulnerable*. Kidney Int, 2005. **67**(5): p. 1680-2.
544. Chien, S., S. Li, and Y.J. Shyy, *Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells*. Hypertension, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 162-9.
545. Pries, A.R., B. Reglin, and T.W. Secomb, *Remodeling of blood vessels: responses of diameter and wall thickness to hemodynamic and metabolic stimuli*. Hypertension, 2005. **46**(4): p. 725-31.
546. Feihl, F., et al., *Hypertension and microvascular remodelling*. Cardiovasc Res, 2008. **78**(2): p. 274-85.
547. Stegemann, J.P., H. Hong, and R.M. Nerem, *Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype*. J Appl Physiol (1985), 2005. **98**(6): p. 2321-7.
548. Cappadona, C., et al., *Phenotype dictates the growth response of vascular smooth muscle cells to pulse pressure in vitro*. Exp Cell Res, 1999. **250**(1): p. 174-86.
549. Seliktar, D., R.M. Nerem, and Z.S. Galis, *The role of matrix metalloproteinase-2 in the remodeling of cell-seeded vascular constructs subjected to cyclic strain*. Ann Biomed Eng, 2001. **29**(11): p. 923-34.
550. Solan, A., et al., *Effect of pulse rate on collagen deposition in the tissue-engineered blood vessel*. Tissue Eng, 2003. **9**(4): p. 579-86.
551. Isenberg, B.C. and R.T. Tranquillo, *Long-term cyclic distention enhances the mechanical properties of collagen-based media-equivalents*. Ann Biomed Eng, 2003. **31**(8): p. 937-49.
552. Bascands, J.L., et al., *Angiotensin II induces phenotype-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells*. Hypertension, 2001. **38**(6): p. 1294-9.
553. Braun-Dullaeus, R.C., et al., *A novel role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell hypertrophy*. J Clin Invest, 1999. **104**(6): p. 815-23.
554. Turla, M.B., et al., *Mechanisms of angiotensin II- and arginine vasopressin-induced increases in protein synthesis and content in cultured rat aortic smooth muscle cells. Evidence for selective increases in smooth muscle isoactin expression*. Circ Res, 1991. **68**(1): p. 288-99.
555. Ruiz-Ortega, M., et al., *Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field*. Hypertension, 2001. **38**(6): p. 1382-7.
556. Schiffrin, E.L., *Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment*. Am J Hypertens, 2004. **17**(12 Pt 1): p. 1192-200.
557. Chen, S. and R.J. Lechleider, *Transforming growth factor-beta-induced differentiation of smooth muscle from a neural crest stem cell line*. Circ Res, 2004. **94**(9): p. 1195-202.
558. Reddy, K.B. and P.H. Howe, *Transforming growth factor beta 1-mediated inhibition of smooth muscle cell proliferation is associated with a late G1 cell cycle arrest*. J Cell Physiol, 1993. **156**(1): p. 48-55.

559. Stouffer, G.A. and G.K. Owens, *TGF-beta promotes proliferation of cultured SMC via both PDGF-AA-dependent and PDGF-AA-independent mechanisms*. J Clin Invest, 1994. **93**(5): p. 2048-55.
560. Suwanabol, P.A., et al., *Transforming growth factor-beta increases vascular smooth muscle cell proliferation through the Smad3 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinases pathways*. J Vasc Surg, 2012. **56**(2): p. 446-54.
561. Hayashi, K., et al., *Differentiated phenotype of smooth muscle cells depends on signaling pathways through insulin-like growth factors and phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**(44): p. 28860-7.
562. Bader, M. and D. Ganten, *Update on tissue renin-angiotensin systems*. J Mol Med (Berl), 2008. **86**(6): p. 615-21.
563. Geisterfer, A.A., M.J. Peach, and G.K. Owens, *Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells*. Circ Res, 1988. **62**(4): p. 749-56.
564. Xi, X.P., et al., *Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(1): p. 73-82.
565. Capasso, J.M., et al., *Left ventricular failure induced by long-term hypertension in rats*. Circ Res, 1990. **66**(5): p. 1400-12.
566. Vanhoutte, P.M., *Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture*. Hypertension, 1989. **13**(6 Pt 2): p. 658-67.
567. Owens, G.K. and M.A. Reidy, *Hyperplastic growth response of vascular smooth muscle cells following induction of acute hypertension in rats by aortic coarctation*. Circ Res, 1985. **57**(5): p. 695-705.
568. Eghbali, M., et al., *Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization*. J Mol Cell Cardiol, 1989. **21**(1): p. 103-13.
569. Eghbali, M., et al., *Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats*. J Mol Cell Cardiol, 1988. **20**(3): p. 267-76.
570. Medugorac, I. and R. Jacob, *Characterisation of left ventricular collagen in the rat*. Cardiovasc Res, 1983. **17**(1): p. 15-21.
571. Weber, K.T., et al., *Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium*. Circ Res, 1988. **62**(4): p. 757-65.
572. Pinto, Y.M., M. Paul, and D. Ganten, *Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering*. Cardiovasc Res, 1998. **39**(1): p. 77-88.
573. Berk, B.C., K. Fujiwara, and S. Lehoux, *ECM remodeling in hypertensive heart disease*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 568-75.
574. Baicu, C.F., et al., *Changes in extracellular collagen matrix alter myocardial systolic performance*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(1): p. H122-32.
575. Wang, J., et al., *Cardiomyopathy associated with microcirculation dysfunction in laminin alpha4 chain-deficient mice*. J Biol Chem, 2006. **281**(1): p. 213-20.
576. Beltrami, C.A., et al., *The cellular basis of dilated cardiomyopathy in humans*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(1): p. 291-305.
577. Lombardi, R., et al., *Myocardial collagen turnover in hypertrophic cardiomyopathy*. Circulation, 2003. **108**(12): p. 1455-60.
578. Brilla, C.G., et al., *Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension*. Circ Res, 1990. **67**(6): p. 1355-64.

579. Doering, C.W., et al., *Collagen network remodelling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy*. Cardiovasc Res, 1988. **22**(10): p. 686-95.
580. Aceto, J.F. and K.M. Baker, *[Sar1]angiotensin II receptor-mediated stimulation of protein synthesis in chick heart cells*. Am J Physiol, 1990. **258**(3 Pt 2): p. H806-13.
581. Sechi, L.A., et al., *Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart*. Circ Res, 1992. **71**(6): p. 1482-9.
582. Dostal, D.E. and K.M. Baker, *Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart. Mediation by the AT1 receptor*. Am J Hypertens, 1992. **5**(5 Pt 1): p. 276-80.
583. Regan, C.P., et al., *Pressure-independent effects of AT1-receptor antagonism on cardiovascular remodeling in aortic-banded rats*. Am J Physiol, 1997. **272**(5 Pt 2): p. H2131-8.
584. Edgley, A., M. Kett, and W. Anderson, *'Slow pressor' hypertension from low-dose chronic angiotensin II infusion*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2001. **28**(12): p. 1035-9.
585. Khairallah, P., Robertson, AL., and Davila éd, *Effects of angiotensin II on DNA, RNA and protein synthesis*, ed. K.E.e. In Genest J, Hypertension. 1972: Springer-Verlag, Berlin.
586. Linz, W., B.A. Scholkens, and D. Ganten, *Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats*. Clin Exp Hypertens A, 1989. **11**(7): p. 1325-50.
587. Zierhut, W., H.G. Zimmer, and A.M. Gerdes, *Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on pressure-induced left ventricular hypertrophy in rats*. Circ Res, 1991. **69**(3): p. 609-17.
588. Dzau, V.J., *Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology*. Am J Cardiol, 1987. **59**(2): p. 59A-65A.
589. Jalil, J.E., et al., *Coronary vascular remodeling and myocardial fibrosis in the rat with renovascular hypertension. Response to captopril*. Am J Hypertens, 1991. **4**(1 Pt 1): p. 51-5.
590. Beguin, P.C., et al., *The phenotype and potential origin of nestin+ cardiac myocyte-like cells following infarction*. J Appl Physiol (1985), 2009. **107**(4): p. 1241-8.
591. Wong, A., E. Ghassemi, and C.E. Yellowley, *Nestin expression in mesenchymal stromal cells: regulation by hypoxia and osteogenesis*. BMC Vet Res, 2014. **10**(1): p. 173.
592. Forsythe, J.A., et al., *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(9): p. 4604-13.
593. Bujak, M. and N.G. Frangogiannis, *The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(2): p. 184-95.
594. Ozono, R., et al., *Expression and localization of angiotensin subtype receptor proteins in the hypertensive rat heart*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **278**(3): p. R781-9.
595. Cizkova, D., T. Soukup, and J. Mokry, *Nestin expression reflects formation, revascularization and reinnervation of new myofibers in regenerating rat hind limb skeletal muscles*. Cells Tissues Organs, 2009. **189**(5): p. 338-47.
596. Wang, X., et al., *The role of the sca-1+/CD31- cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling*. Stem Cells, 2006. **24**(7): p. 1779-88.

597. McQualter, J.L., et al., *Endogenous fibroblastic progenitor cells in the adult mouse lung are highly enriched in the sca-1 positive cell fraction*. *Stem Cells*, 2009. **27**(3): p. 623-33.
598. Zhou, H., et al., *Stem cell antigen 1 protects against cardiac hypertrophy and fibrosis after pressure overload*. *Hypertension*, 2012. **60**(3): p. 802-9.
599. Akbarzadeh, A., et al., *Induction of diabetes by Streptozotocin in rats*. *Indian J Clin Biochem*, 2007. **22**(2): p. 60-4.
600. Corner., B. *Rat - Circulatory System*. [cited 2013 15 Décembre]; Available from: http://www.biologycorner.com/worksheets/rat_circulatory.html.

Annexe 1 : Modèles Animaux

Induction du diabète par injection de streptozotocin chez le rat

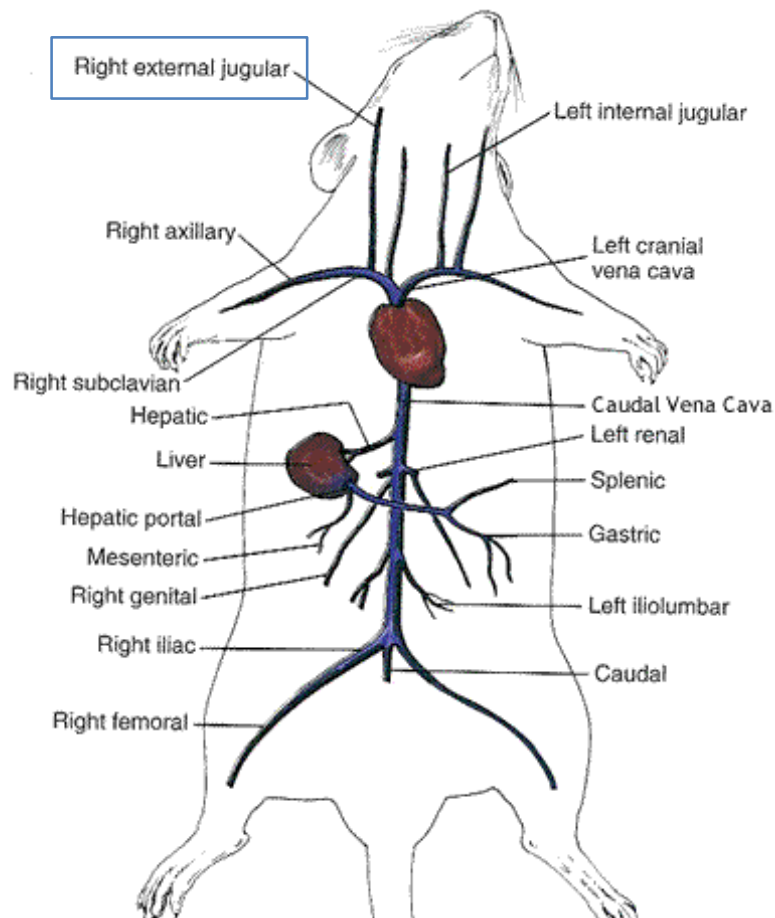


Figure 1. Modèle de diabète induit par injection de streptozotocin. Le diabète est induit par une injection unique de streptozotocin à 60mg/kg dans la veine jugulaire. (Carré bleu) Cela initie une réaction auto-immunitaire qui résulte en la destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans dans le pancréas. [438] Cela entraîne rapidement le développement d'un état hyperglycémique puis diabétique, et ce, en 2 à 4 jours. [439, 599] (Image modifiée de [600])

1.2 Constriction aortique abdominale surrénale chez le rat

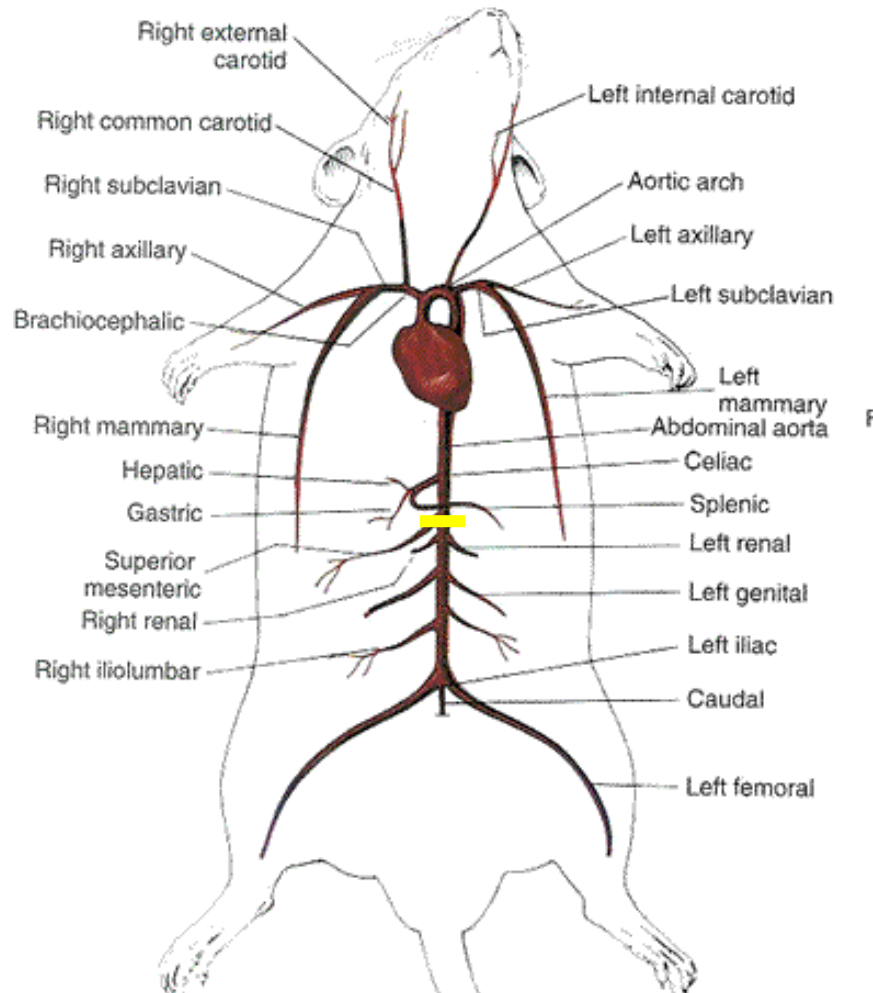


Figure 2. Modèle d'hypertension induite par une constriction aortique abdominale surrénale chez le rat. L'abdomen du rat est ouvert et l'aorte abdominale au niveau des artères surrénales est dégagée. (Ligne jaune) Une aiguille 21G est posée sur l'aorte et un fil de soie (suture) est attaché autour du vaisseau et de l'aiguille. Une fois le nœud en place l'aiguille est enlevée et la lumière de l'aorte est réduite au diamètre de l'aiguille. La réduction de la lumière de l'aorte entraîne une diminution de l'apport sanguin aux reins et augmente la post-charge imposée au cœur. Des changements hémodynamiques et morphologiques sont induits rapidement par cette chirurgie. (Image modifiée de [600])

**Annexe 2 : Résultats complémentaires inclus dans la
section 3 Discussion**

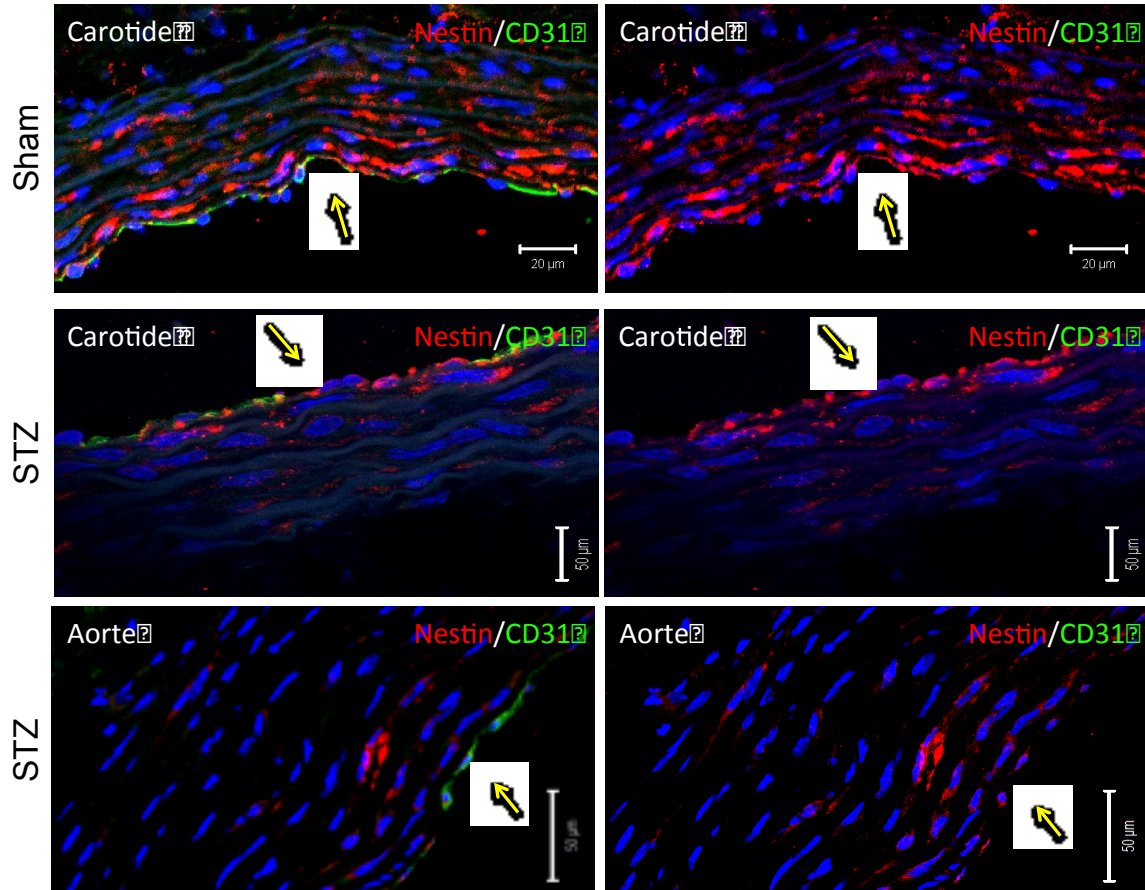


Figure 1. Diminution de l'expression des cellules Nestin⁺ *in vivo*. Évaluation en immunofluorescence de l'expression de Nestin (rouge) et de CD31 (vert) dans les carotides et les arches aortiques des rats Sham et STZ (rats DT1; ayant reçu une injection de streptozotocin). Les noyaux en bleu (DAPI)

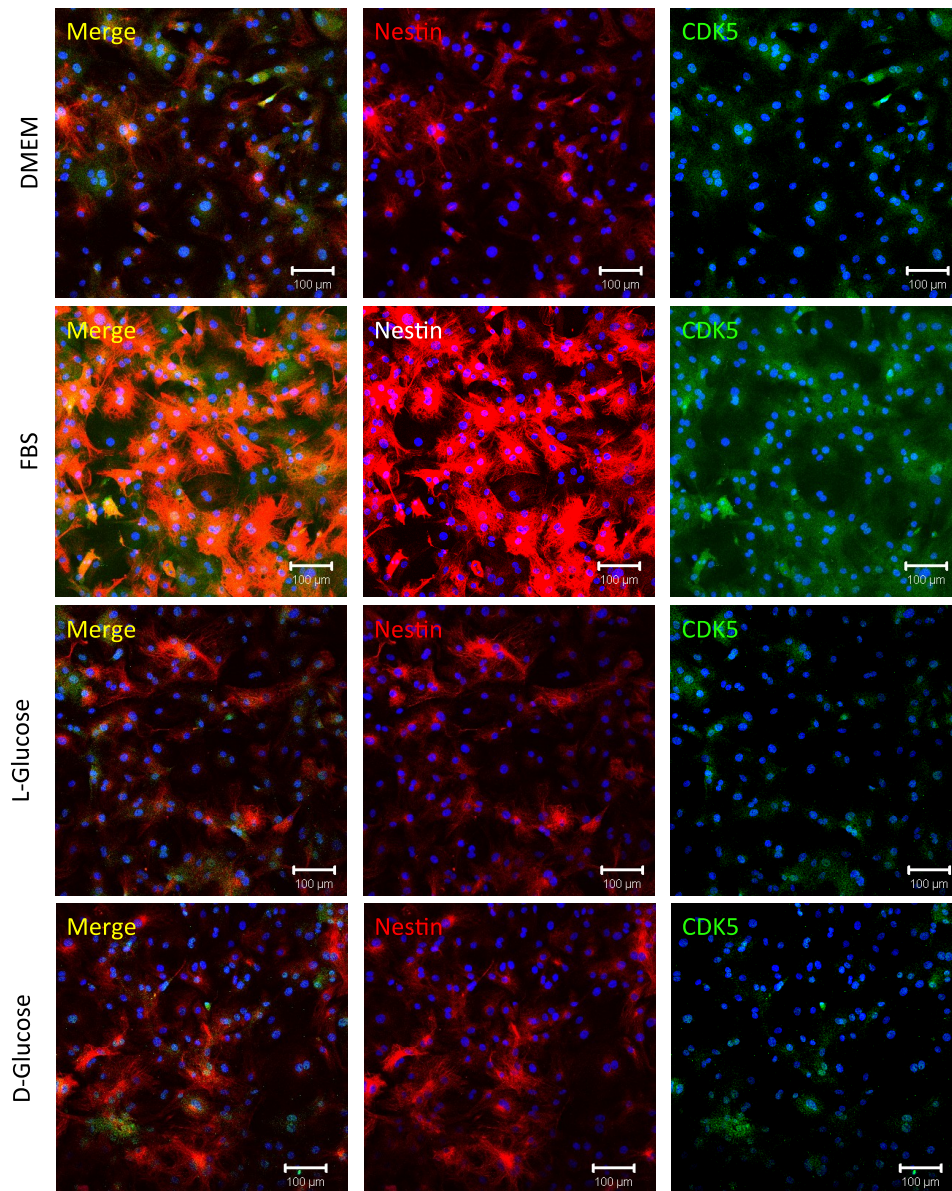


Figure 2. Expression de CDK5 dans les cellules du muscle lisse vasculaires. Évaluation en immunofluorescence de l'expression de CDK5 dans les cellules musculaires lisses *in vitro* des carotides, basal DMEM, induction de la prolifération FBS (10%), contrôle L-glucose (30mM) et D-glucose (30 mM). Nestin en rouge, CDK5 vert et les noyaux en bleu (DAPI)

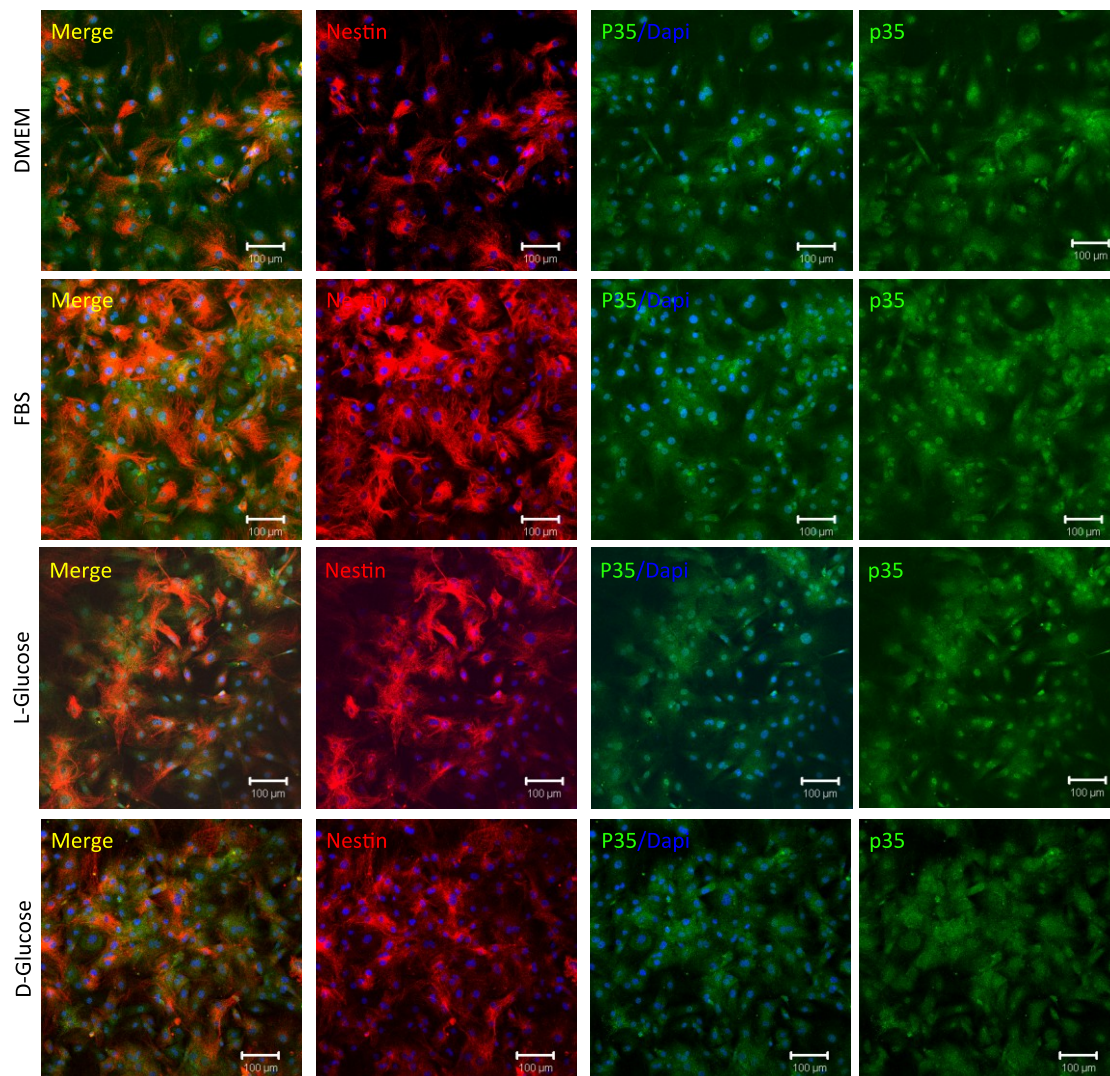


Figure 3 L'hyperglycémie inhibe la translocation de p35 dans les cellules du muscle lisse vasculaires. Évaluation en immunofluorescence de l'expression de p35 dans les cellules musculaires lisses *in vitro* des carotides, condition basale DMEM, induction de la prolifération FBS (10%), contrôle L-glucose (30mM) et D-glucose (30 mM). Nestin en rouge, p35 vert et les noyaux en bleu (DAPI)

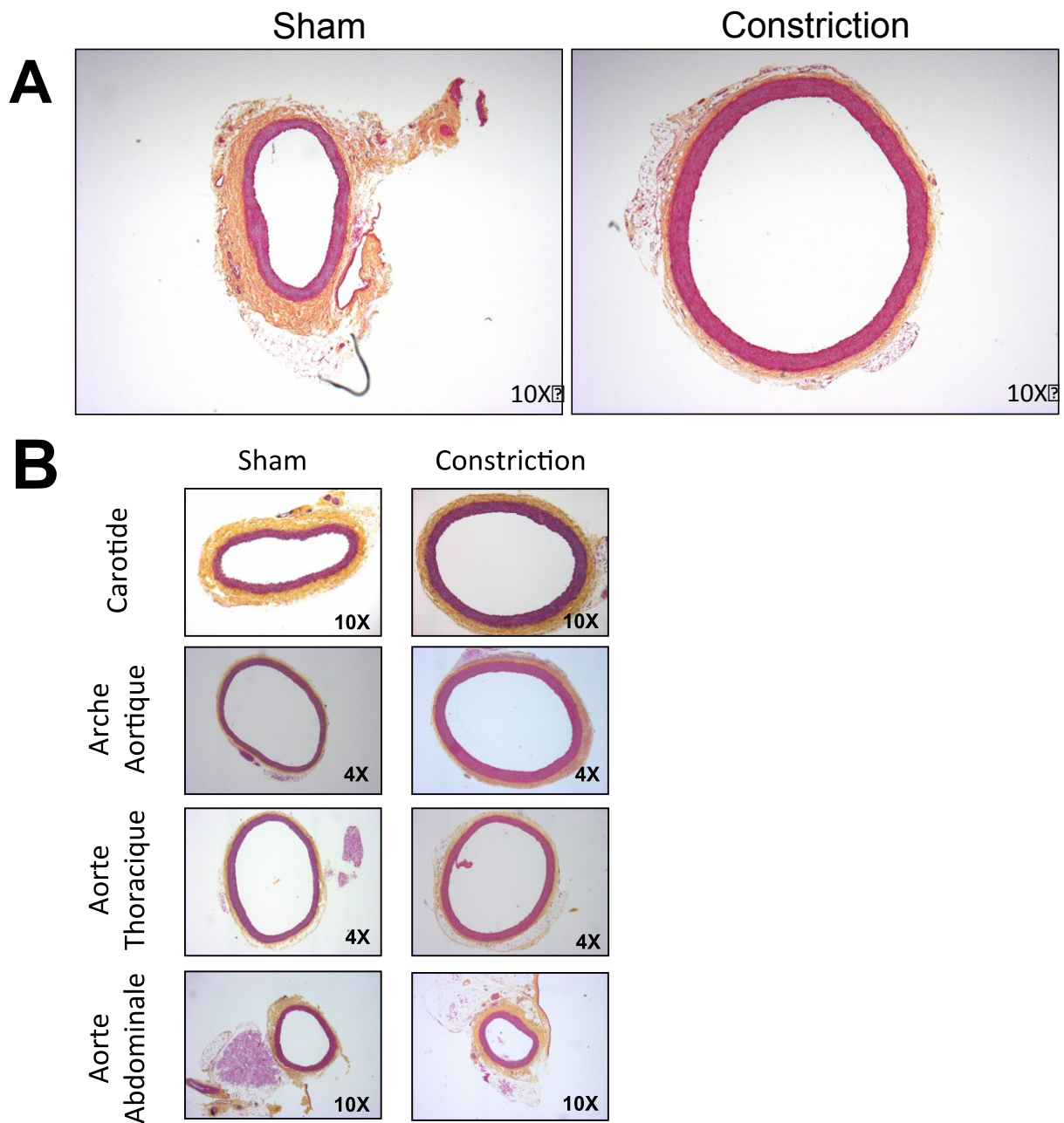
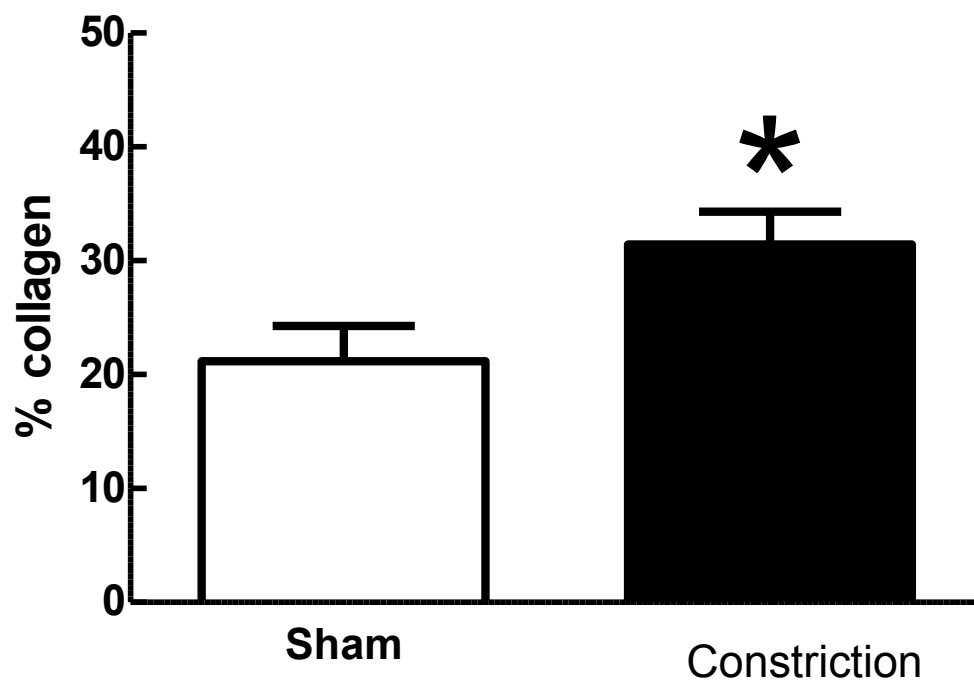
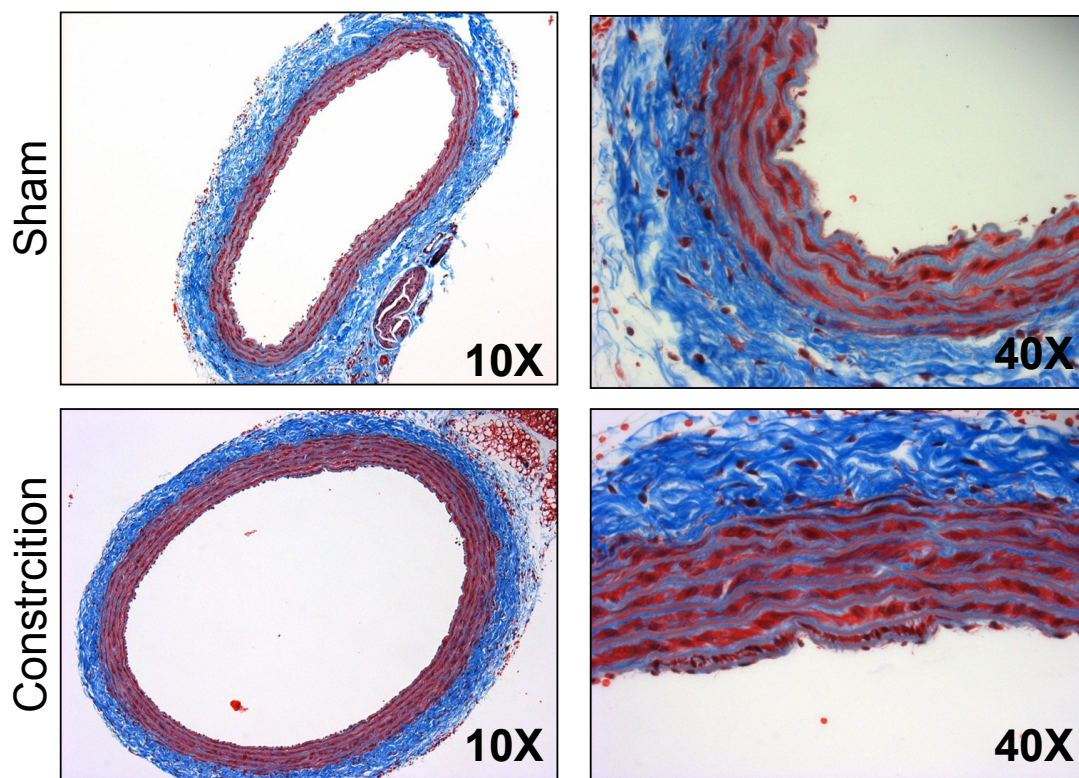


Figure 4. Changements morphologiques des artères carotidiennes et aortiques suite à une constriction aortique abdominale surrénale. (A) Image représentative de l'aorte abdominale dans la portion surrénale. (B) La constriction de l'aorte abdominale entraîne une augmentation de la post-charge et un remodelage de la paroi de la carotide et de l'aorte. Les vaisseaux ont été colorés au HPS (hématoxyline, phloxine et safran) Grossissement 4X et 10X.

A



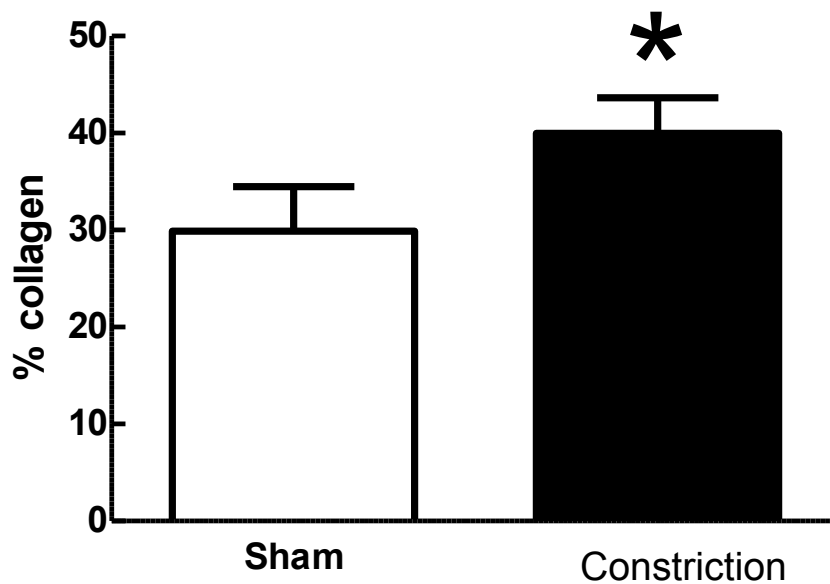
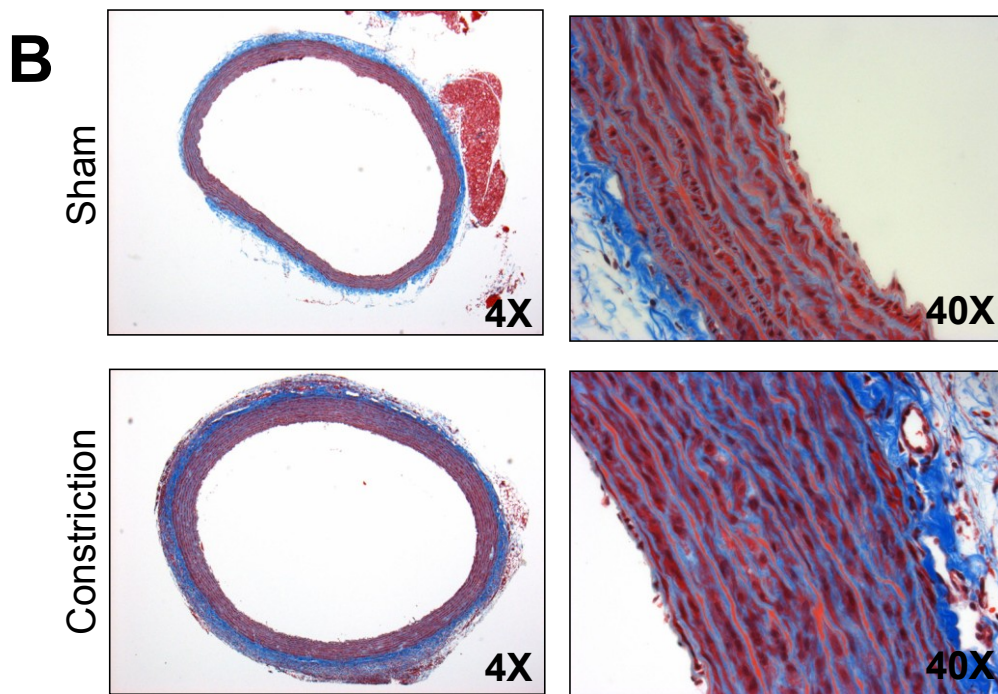


Figure 5. Analyse de la fibrose vasculaire. L'augmentation du contenu en collagène (en bleu) composant la fibrose vasculaire est visible par une coloration au trichrome de Masson dans la (A) carotide et (B) l'aorte. La quantification de la fibrose (% de collagène) révèle une grande augmentation de la fibrose suite à la constriction aortique abdominale surrénale. Grossissement 4X et 40X. * $p < 0,05$ en comparaison avec les rats Sham

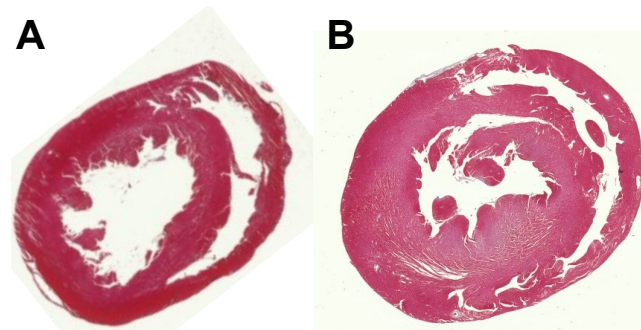


Figure 6. Hypertrophie du cœur. Coupe des cœurs de rats (A) Sham et (B) ayant subi une constriction aortique abdominale surrénale. La paroi du ventricule gauche a subi un remodelage concentrique important en réponse à une augmentation de la post-charge. Coloration au trichrome de Masson. Grossissement 4X.

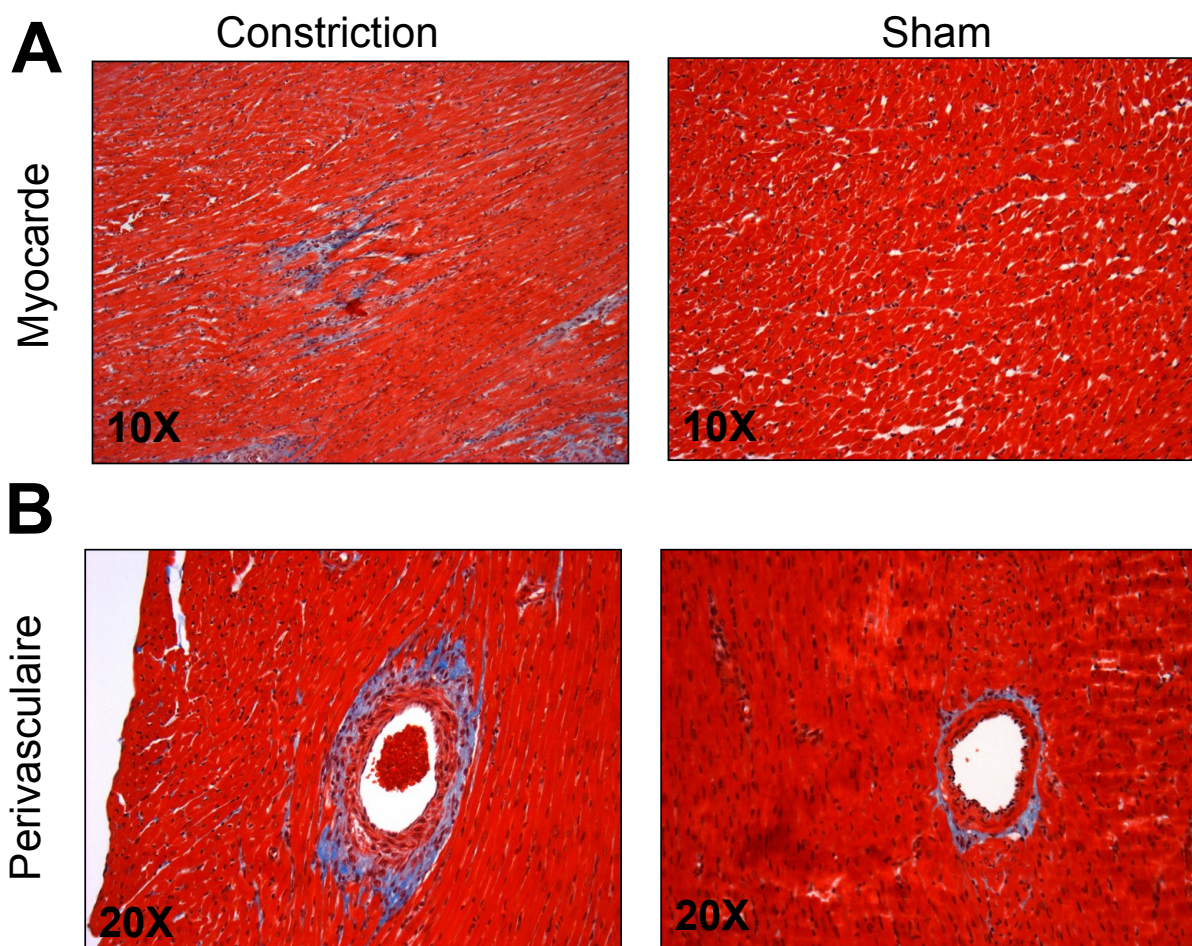


Figure 7. Formation de la fibrose dans les cœurs des rats ayant subi une constriction aortique abdominale surrénale. L'analyse du collagène (bleu) est réalisée dans (A) le myocarde et (B) dans les zones périvasculaires. Une augmentation du contenu en collagène est observée dans le myocarde et dans les zones périvasculaires. Le collagène est visible par une coloration au trichrome de Masson. Grossissement 10X et 20X.

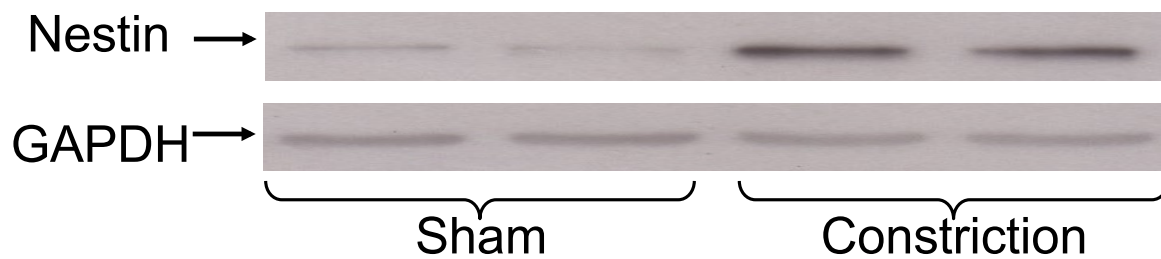


Figure 8 Expression de la protéine Nestin dans les cœurs. La constriction aortique abdominale surrénale entraîne une augmentation de l'expression de la protéine Nestin dans le ventricule gauche des cœurs des rats hypertendus en comparaison avec les rats Sham.

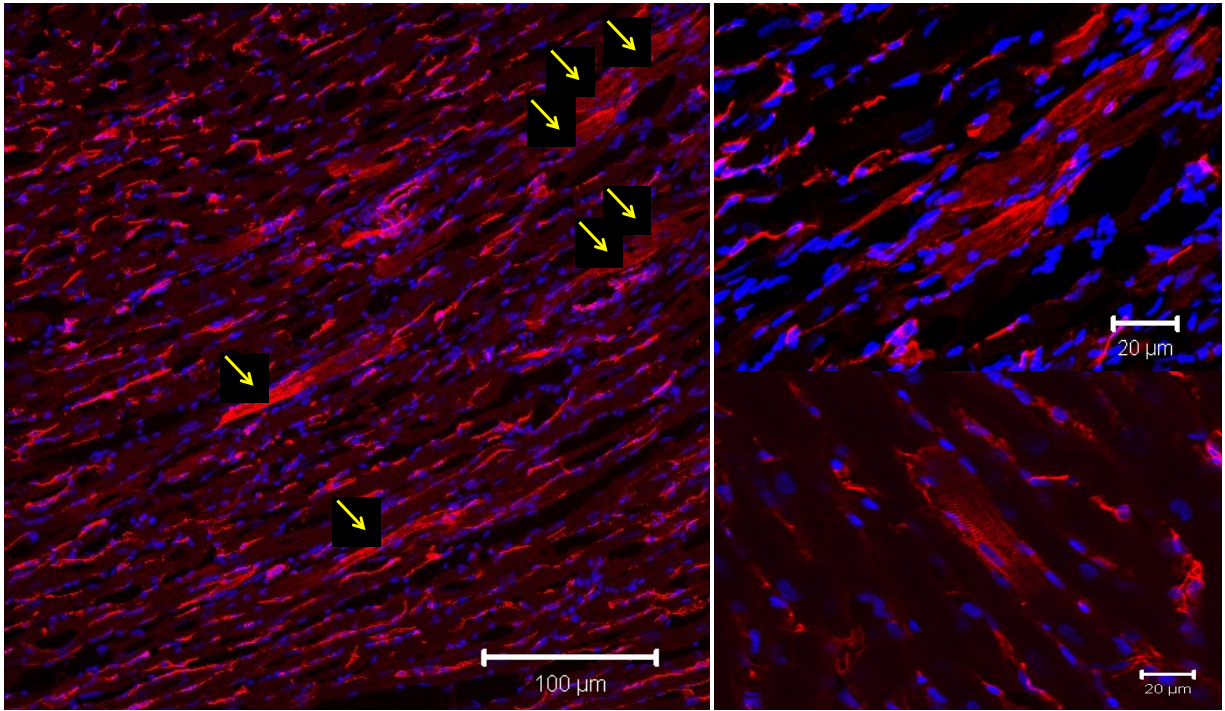


Figure 9 Expression de la protéine Nestin dans les cardiomyocytes et fibroblastes du myocarde. Dans les rats ayant subi une constriction aortique abdominale surrénale, une augmentation de l'expression de la protéine Nestin est observée. Les analyses en microscopie confocale ont permis de déterminer que les cellules exprimant Nestin (rouge) sont les myofibroblastes intercalés entre les cardiomyocytes. Une portion des cardiomyocyte exprime également Nestin (flèches jaunes). En plus fort grossissement dans la portion droite de l'image, les cardiomyocytes présente une apparence striée caractéristique. Nestin en rouge et les noyaux en bleu (DAPI)

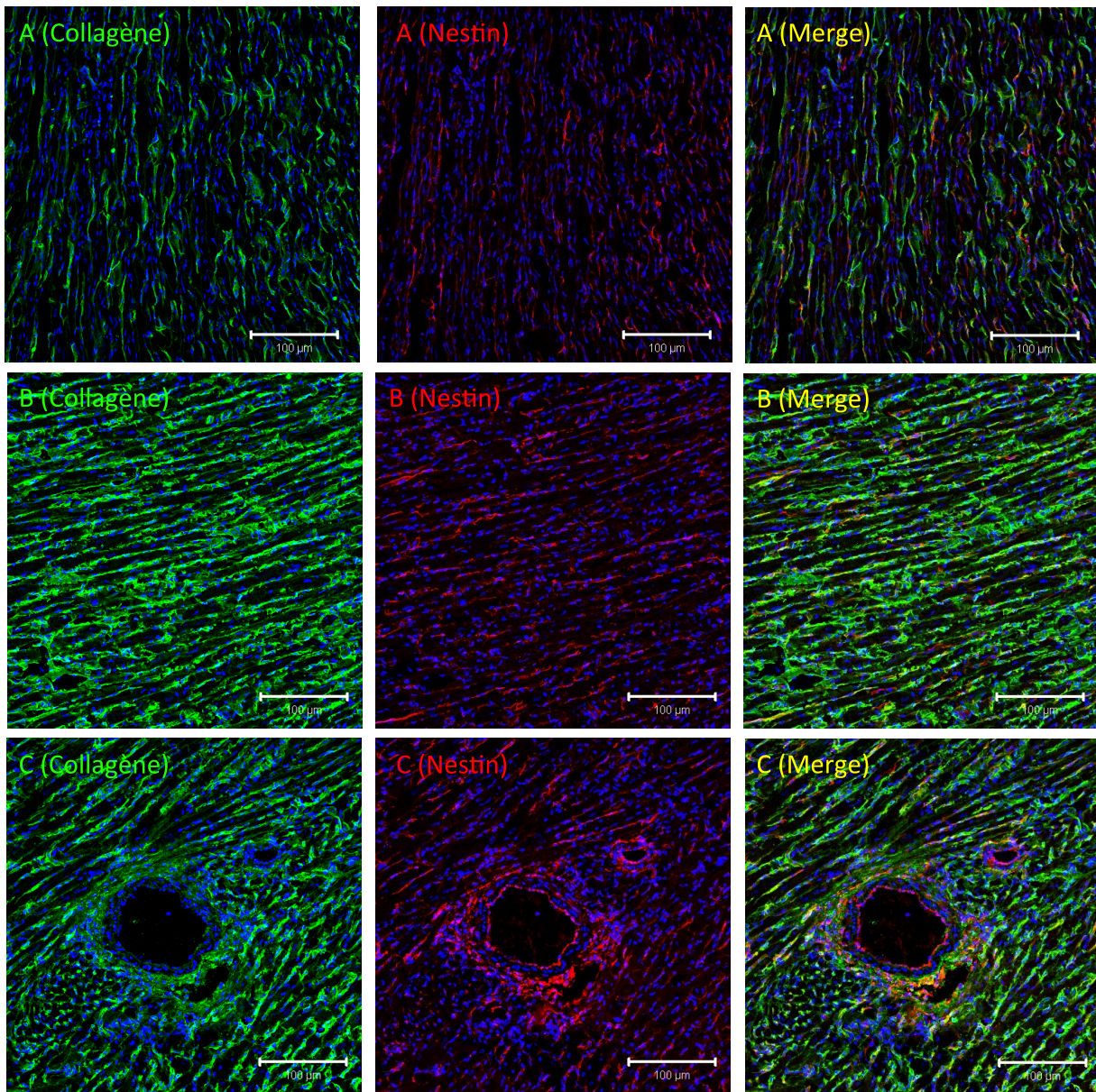


Figure 10. Analyse de la fibrose dans le myocarde. Les analyses en microscopie confocale démontrent que le collagène (vert) dans le myocarde des rats (A) Sham et (B) des rats ayant subi une constriction aortique abdominale surrénale est grandement augmenté tout comme la protéine Nestin (rouge). (C) Dans la zone périvasculaire des artères coronaires du cœur, une zone où la fibrose est bien installée, une augmentation de l'expression de Nestin est observée. Ces cellules co-localisent en partie avec les cellules exprimant le collagène, les fibroblastes. Nestin en rouge, collagène en vert et les noyaux en bleu (DAPI)

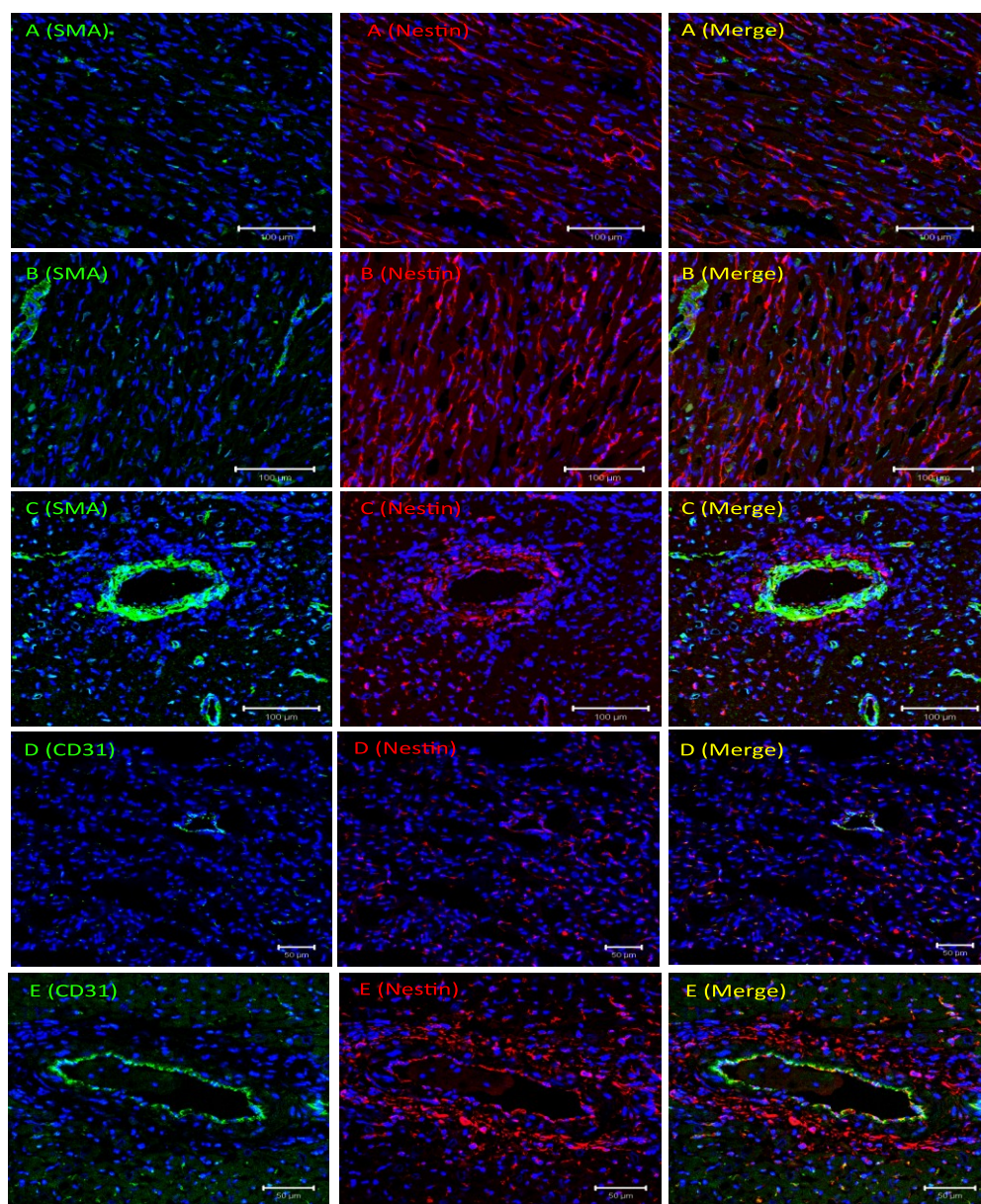


Figure 11. Analyse des zones périvasculaires. Les analyses en microscopie confocale démontrent que la protéine α -SMA (vert) est retrouvée en très faible proportion dans le myocarde (A) des rats Sham et (B) des rats ayant subi une constriction aortique abdominale surrénale. (C) Toutefois, la protéine α -SMA (vert) est retrouvée dans la média des artères coronaire des cœurs de rats ayant subi une constriction aortique abdominale surrénale. Les cellules endothéliales des vaisseaux dans le cœur co-expriment Nestin (rouge) et CD31 (vert) autant dans (D) les rats Sham que (E) dans les rats ayant subi une constriction aortique abdominale surrénale. Dans la zone périvasculaire des artères coronaires du cœur, une zone où la fibrose est bien installée, une augmentation de l'expression de Nestin est également observée. Nestin en rouge, α -SMA et CD31 en vert et les noyaux en bleu (DAPI)