

**INTERACTIONS CELLULE-MATRICE ASSOCIÉES  
AU REMODELAGE ET AU VIEILLISSEMENT  
VASCULAIRES**

par

Céline Bouvet

Thèse de doctorat effectuée en cotutelle

à la Faculté de Pharmacie

Université de Montréal

et

à la Faculté de Médecine

Université d'Angers

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal

en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)

en sciences pharmaceutiques

option pharmacologie

et à

l'école doctorale de l'Université d'Angers

en vue de l'obtention du grade de Docteur en physiologie et pathologie humaines (direction  
scientifique : Biologie, Médecine, Santé)

juin 2007

© Céline Bouvet, 2007



QV

705

U58

2008

v.001



## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures  
et  
Université d'Angers  
École doctorale

Cette thèse intitulée :

Interactions cellule-matrice associées au remodelage et au vieillissement vasculaires

présentée par :  
Céline Bouvet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Albert Adam, président-rapporteur et représentant de la FES  
Pierre Moreau, directeur de recherche (Université de Montréal)  
Daniel Henrion, directeur de recherche (Université d'Angers)  
Éric Thorin, membre du jury  
Philippe Pibarot, examinateur externe

## Résumé

Les vaisseaux sanguins sont composés de cellules enchâssées dans la matrice extracellulaire (MEC). Certaines interactions entre les cellules et les composés de la MEC sont impliquées dans plusieurs changements pathologiques et physiologiques au niveau de la paroi artérielle.

L'hypertension systolo-diastolique provoque deux formes de remodelage vasculaire : hypertrophique dans les artères de conductance et eutrophique dans les artères de résistance. Les mécanismes régissant le remodelage eutrophique ne sont pas encore bien éclaircis. Afin de les étudier, nous avons utilisé un modèle d'hypertension systolo-diastolique induite par l'inhibition de la synthèse de monoxyde d'azote. Nous avons démontré que la contribution des protéines de désadhésion semblait différer d'un type de remodelage à l'autre et que les métalloprotéinases matricielles (MMPs) ne jouaient pas un rôle crucial dans le développement du remodelage eutrophique, contrairement au remodelage hypertrophique.

Au cours du vieillissement, on observe des modifications de la paroi vasculaire des artères de conductance, augmentant leur rigidité : une fragmentation des fibres élastiques, leur calcification (élastocalcinose), une augmentation des liens covalents entre les protéines de la MEC et une fibrose. Cette rigidité conduit au développement de l'hypertension systolique isolée. Afin d'évaluer l'implication des MMPs dans la fragmentation de l'élastine et leur rôle dans le développement de l'élastocalcinose, nous avons utilisé un modèle animal d'élastocalcinose basé sur l'inhibition de la maturation de la *matrix Gla protein* (MGP), une protéine anti-calcifiante, par la warfarine. Nous avons observé une augmentation rapide et transitoire de l'activité de la MMP-9, suivie de l'activation du *transforming growth factor-β* (TGF-β). L'inhibition de l'activité des métalloprotéinases et de TGF-β a permis de prévenir l'élastocalcinose.

Par ailleurs, l'élastocalcinose est accélérée par le diabète. Cette accélération est reliée à la durée et à la sévérité du diabète. Or, ce dernier est associé à une augmentation de la synthèse des produits avancés de glycation (AGEs) pouvant former des liens covalents

entre les protéines de la MEC. Ne disposant pas de modèle animal pour étudier l'implication des AGEs dans l'élastocalcinose associée au diabète, nous en avons créé un. Dans ce modèle, le diabète est induit par une diète riche en lipides et une injection de streptozotocine (30 mg/kg/jr). L'élastocalcinose est provoquée par l'inhibition de la maturation de la MGP. Nous avons observé une accélération de l'élastocalcinose, liée à la durée du diabète, et une accumulation de AGEs dans la paroi des artères fémorales. L'utilisation de pyridoxamine, un inhibiteur de la formation des AGEs, et de l'ALT711, un briseur des liaisons covalentes formées par les AGEs, a permis de prévenir et de limiter, respectivement, la calcification dans ce modèle. En outre, nous avons montré que la stimulation du récepteur des AGEs (RAGE), pouvait être impliquée dans l'élastocalcinose et élucidé certains éléments de signalisation dans ce processus.

Ces travaux ont fait émerger le rôle des MMPs, de TGF- $\beta$  et des produits avancés de glycation dans le remodelage hypertrophique et l'élastocalcinose associée ou non au diabète. Ceux-ci sont reliés à l'apparition de l'hypertension systolo-diastolique et systolique isolée, respectivement. L'inhibition de ces acteurs pourrait constituer de nouvelles thérapies anti-hypertensives.

**Mots-clés** : remodelage hypertrophique, remodelage eutrophique, MMPs, matrice extracellulaire, elastocalcinose, TGF- $\beta$ , diabète, produits avancés de glycation, RAGE.

## Abstract

The vascular wall is constituted of cells inserted in the extracellular matrix. Interactions between cells and extracellular matrix components are implicated in pathological and physiological changes of the vascular wall.

Systolo-diastolic hypertension can produce two types of vascular remodeling : hypertrophic in large arteries and eutrophic in resistance arteries. Mechanisms directing the eutrophic remodeling are still unclear. In order to clarify them, we used an animal model of systolo-diastolic hypertension induced by the inhibition of nitric oxide. We demonstrated that the contribution of proteins of de-adhesion was different from one to another type of remodeling. Moreover, matrix metalloproteinases (MMPs) did not play a crucial role in the development of eutrophic remodeling, unlike in hypertrophic remodeling.

During aging, vascular wall of large arteries is modified, inducing arterial stiffness. These modifications include fragmentation of elastic fibers, elastocalcinosis, increased cross-links in the extracellular matrix and fibrosis. This stiffness promotes the development of isolated systolic hypertension. In order to study the implication of MMPs in the fragmentation of elastic fibers and elastocalcinosis, we used an animal model of elastocalcinosis induced by the inhibition of matrix Gla protein's maturation with warfarin. We observed a fast and transient augmentation of MMP-9 activity followed by the activation of TGF- $\beta$  during elastocalcinosis development. Inhibition of metalloproteinase and TGF- $\beta$  activities prevented elastocalcinosis.

Elastocalcinosis is accelerated by diabetes, and linked to its duration and severity. Diabetes is associated with increase of advanced glycation endproducts (AGEs) synthesis that can create cross-links. Because we had no animal model to study the involvement of AGEs in elastocalcinosis associated with diabetes, we created one. In this model, diabetes was induced by a high fat diet and a single injection of streptozotocin (30 mg/kg/d). Elastocalcinosis was provoked with warfarin. We observed an acceleration of elastocalcinosis, associated with the duration of diabetes, and an accumulation of AGEs in

the vascular wall of femoral arteries. Pyridoxamine, an inhibitor of AGEs, and ALT711, a breaker of cross-links formed by AGEs, prevented and limited elastocalcinosis, respectively. Moreover, we demonstrated that AGEs receptor (RAGE) stimulation was involved in elastocalcinosis and provided results regarding the signaling pathways for this response.

The work presented in this thesis, highlights the roles of MMPs, TGF- $\beta$  and AGEs in hypertrophic remodeling and elastocalcinosis with or without diabetes. These modification of the vascular wall are linked with to different form of hypertension. Inhibition of these newly identified players could become novel therapeutic avenues to treat and limit the consequences of hypertension.

**Keywords** : hypertrophic remodeling, eutrophic remodeling, MMPs, elastocalcinosis, TGF- $\beta$ , diabetes, AGEs, RAGE.

## Table des matières

1. Introduction.....	2
1.1. Paroi vasculaire.....	2
1.1.1. Composition.....	2
1.1.2. Organisation et Rôles .....	41
1.2. Remodelage vasculaire dans l'hypertension essentielle .....	46
1.2.1. Types d'hypertension artérielle.....	46
1.2.2. Types de remodelage.....	47
1.2.3. Traitements .....	55
1.2.4. Modèles animaux d'hypertension systolo-diastolique .....	56
1.3. Vieillesse vasculaire.....	57
1.3.1. Changements de la matrice extracellulaire.....	58
1.3.2. Changements cellulaires .....	63
1.3.3. Hypertension systolique isolée .....	66
1.3.4. Modèles animaux .....	74
1.4. Diabète et vieillissement vasculaire.....	80
1.4.1. Pourquoi le diabète favorise-t-il la rigidité vasculaire ?.....	81
1.4.2. Traitements .....	90
1.4.3. Modèles animaux .....	91
1.5. Objectifs .....	94
1.6. Méthodes .....	95
1.6.1. Évaluation de la structure des artères.....	95
1.6.2. Évaluation de la composition des artères .....	96
1.6.3. Évaluer l'activité des métalloprotéinases .....	98
1.6.4. Modèle de calcification artérielle médiale sur culture d'artères.....	99
2. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition.....	101
2.1. Résumé .....	102
2.2. Abstract .....	104

2.3. Introduction .....	105
2.4. Methods .....	106
2.4.1. Treatments .....	106
2.4.2. Vascular structure and mechanical properties .....	107
2.4.3. MMP-2 activity .....	107
2.4.4. Western blots .....	108
2.4.5. Statistical analysis .....	108
2.5. Results .....	108
2.6. Discussion.....	110
2.7. Acknowledgements.....	113
2.8. References .....	115
2.9. Figure legends.....	120
2.10. Tables .....	121
2.11. Figures.....	124
3. Sequential activation of MMP-9 and TGF- $\beta$ in arterial elastocalcinosis.....	127
3.1. Résumé .....	128
3.2. Abstract .....	130
3.3. Introduction .....	131
3.4. Methods .....	132
3.4.1. In vivo experiments.....	132
3.4.2. Ex vivo experiments.....	135
3.4.3. Drugs and statistical analysis.....	136
3.5. Results .....	136
3.5.1. In vivo experiments.....	136
3.5.2. Ex vivo model of elastocalcinosis.....	137
3.5.3. Elastases in elastocalcinosis .....	137
3.5.4. TGF- $\beta$ signaling .....	138
3.6. Discussion.....	139
3.6.1. Acknowledgement.....	142

3.7. References .....	143
3.8. Figures legend.....	148
3.9. Table.....	150
3.10. Figures.....	151
4. A new rat model of diabetic macrovascular complication.....	155
4.1. Résumé .....	156
4.2. Abstract .....	158
4.3. Introduction .....	159
4.4. Methods .....	160
4.4.1. Treatments .....	160
4.4.2. Hemodynamic parameters .....	161
4.4.3. Metabolic parameters .....	161
4.4.4. Vascular composition .....	162
4.4.5. Drugs and statistical analysis.....	163
4.5. Results .....	163
4.6. Discussion.....	164
4.6.1. Vascular calcification and hemodynamic parameters.....	166
4.6.2. Expression of osteogenic proteins, TGF- $\beta$ and TNF- $\alpha$ .....	167
4.7. Acknowledgments.....	169
4.8. References .....	170
4.9. Figure legends.....	175
4.10. Table.....	176
4.11. Figures.....	177
5. Crucial involvement of advanced glycation end-products in experimental diabetes-associated arterial elastocalcinosis. ....	182
5.1. Résumé .....	183
5.2. Abstract .....	185
5.3. Introduction .....	186
5.4. Methods.....	187

5.4.1. In vivo experiments.....	187
5.4.2. Ex vivo experiments.....	190
5.4.3. Drugs and statistical analysis.....	191
5.5. Results.....	191
5.5.1. In vivo experiments.....	191
5.5.2. Ex vivo experiments.....	192
5.6. Discussion.....	193
5.7. Acknowledgements.....	196
5.8. References.....	197
5.9. Figure legends.....	202
5.10. Table.....	203
5.11. Figures.....	204
6. Discussion et perspectives.....	207

## Liste des tableaux

Tableau 1. Effets physiologiques de l'endothéline sur les cellules de la paroi vasculaire .....	4
Tableau 2. Molécules associées aux fibres élastiques .....	16
Tableau 3. Intégrines exprimées dans la paroi vasculaire. ....	26
Tableau 4. Protéines de la MEC dont la maturation est assurée par BMP-1/TLD métalloprotéinases. ....	34
Tableau 5. Métalloprotéinases matricielles : principaux substrats et activateurs. ....	37
Tableau 6. Efficacité élastolytique de différentes protéases. ....	40
Tableau 7. Taille et composition des différents vaisseaux sanguins. ....	43
Tableau 8. Paramètres permettant d'évaluer la rigidité artérielle. ....	73
Tableau 9. Avantages et inconvénients de différents modèles animaux de calcification artérielle médiale et de vieillissement vasculaire. ....	79
Tableau 10. Lignées génétiques de souris et de rats développant un diabète. ....	93

## Liste des figures

Figure 1. Voies de signalisation impliquées dans la diminution du $\text{Ca}^{2+}$ intracellulaire.....	6
Figure 2. Assemblage de la triple hélice de collagène. ....	9
Figure 3. Structure de la fibrille de collagène au niveau vasculaire.....	10
Figure 4. Association tétramérique de collagènes de type IV. ....	11
Figure 5. Assemblage du collagène de type VI.....	12
Figure 6. Réseau hexagonal de collagène de type VIII. ....	13
Figure 7. Composés de la membrane basale et interactions supposées.....	15
Figure 8. Fibrillogénèse des fibres élastiques. ....	17
Figure 9. Le groupement lysyl-tyrosyl-quinone de la lysyl-oxydase.....	22
Figure 10. Réaction d'oxydation par la lysyl-oxydase. ....	22
Figure 11. Formation de la liaison covalente $\text{N}\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysine}$ par la transglutaminase. .....	24
Figure 12. Schéma d'une intégrine.....	25
Figure 13. Séquence catalytique des metzincines. ....	32
Figure 14. Schéma de l'activation de la plasmine et son effet sur certaines ProMMPs.....	39
Figure 15. Paroi vasculaire type.....	41
Figure 16. Remodelages vasculaires associés à l'hypertension essentielle. ....	49
Figure 17. Effets du vieillissement sur la structure de la paroi vasculaire. ....	63
Figure 18. Réflexion de l'onde de pouls, impact sur la pression artérielle mesurée.....	68
Figure 19. Distribution de la pression artérielle en fonction de l'âge. ....	69
Figure 20. Conséquences de l'augmentation de la rigidité aortique. ....	70
Figure 21. Schéma représentant l'effet de la warfarine sur la maturation de la MGP. ....	77
Figure 22. Voies chimiques et métaboliques activées lors de l'hyperglycémie. ....	82
Figure 23. Réaction de Maillard ou la formation des AGEs.....	85
Figure 24. Synthèse schématique des résultats présentés dans la thèse. ....	210
Figure 25. Schéma du développement de remodelages vasculaires avec accumulation de matrice extracellulaire.....	211

## Abréviations

AcétylCoA acétylcoenzyme A  
ADAMs a disintegrin and metalloprotease  
ADAMTS ADAM with thrombospondin domain  
ADN acide desoxyribonucléique  
ADP adénosine diphosphate  
AGE advanced glycation endproduct  
AMPc adénosine monophosphate cyclique  
ARA antagoniste des récepteurs de l'angiotensine  
AT1 récepteur à l'angiotensine  
ATP adénosine triphosphate  
BGP bone Gla protein  
BMP-1 bone morphogenic protein-1  
BSP bone sialoprotein  
CA compliance artérielle  
CAS compliance artérielle systémique  
CE cellule endothéliale  
CIP-17  
CMLV cellule musculaire lisse vasculaire  
CMP-sialic acid acide syalique cytidine monophosphate  
CoA coenzyme A  
DA distensibilité artérielle  
DAG diacyl glycérol  
DDR discoïdin domain receptor  
DHAP dihydroxyacétonephosphate  
E module élastique  
EBP elastin binding protein  
EDHF endothelium-derived hyperpolarizing factor  
EGF epidermal growth factor  
ELR elastin laminin receptor  
EMILIN elastin microfibril interface located protein  
ERK extracellular-signal-regulated protein kinase  
ET endothéline  
ETA ou B récepteur à l'endothéline  
FACITs fibril-associated collagens with interrupted triple helices  
FAK focal adhesion kinase  
GAc Glucosamine-6P-N-acétyltransférase  
GAPDH glycéraldéhyde-3P déshydrogénase  
GFA glucosamine-fructose-6P-aminotransférase

GMPc guanosine monophosphate cyclique  
GSH glutathion réduit  
GSSH glutathion oxydé  
GTP guanosine triphosphate  
HSP20 heat-shock protein 20  
HSP47 heat-shock protein 47  
IECA inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine  
IGF insulin growth factor  
IGFBP IGF binding protein  
IP3 inositol triphosphate  
KK K. Kondo (créateur du modèle)  
L-NAME N $\omega$ -nitro-L-arginine méthylester hydrochloride  
LOX lysyl oxydase  
LOXL lysyl oxidase like  
LTBP latent TGF- $\beta$  binding protein  
MAGP microfibril-associated glycoprotein  
MAPK mitogen-activated protein kinase  
MEC matrice extracellulaire  
MGP matrix Gla protein  
MLCK myosin light chain kinase  
MLCP myosin light chain phosphatase  
MMPs matrix metalloproteinases  
MT-MMPs membranar-type MMPs  
NAD(P)H nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite  
NAD<sup>+</sup> nicotinamide adénine dinucléotide oxydée  
NADH nicotinamide adénine dinucléotide réduite  
NADP nicotinamide adénine dinucléotidephosphate oxydée  
NO oxyde nitrique  
NOD non-obese diabetic  
OLETF Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty  
OPN osteopontine  
PAcGM P-acétylglucosamine mutase  
PAD pression artérielle diastolique  
PAI plasminogen activator inhibitor  
PAPP-A pregnancy associated plasma protein-A  
PAS pression artérielle systolique  
PDGF platelet-derived growth factor  
PGI2 prostacycline  
PKA protéine kinase A  
PKC proteine kinase C

PKG protéine kinase G  
PTB phosphotyrosine binding  
RAGE récepteur des AGEs  
SH2 Src-homology-2  
SHEP systolic hypertension in the elderly program  
SLRPs small leucine rich-proteoglycans  
SPARC secreted protein acidic and rich in cystein  
sRAGE récepteur des AGEs soluble  
STZ streptozotocine  
SUVIMAX supplémentation en vitamines et minéraux antioxydants  
(étude)  
SYST-EUR systolic hypertenion in Europe trial  
TG transglutaminase  
TGF- $\beta$  transforming growth factor beta  
TIMPs tissue inhibitors of metalloproteinases  
TLD tolloïd  
tPA tissular type plasminogen activator  
UDP-AcGM uridine diP-N-acétylglucosamine pryophosphorylase  
UDP-GlaNAc uridine diphosphate N-acétylgalactosamine  
UDP-GlcNAc uridine diphosphate N-acétylglucosamine  
uPA urokinase type plasminogen activator  
uPAR uPA receptor  
VOP vitesse de l'onde de pouls  
VS volume d'éjection systolique  
ZDF Zucker diabetic fat

*À mes grands-parents qui ont toujours été  
enthousiastes devant tout ce que  
j'entreprenais mais, qui ne sont  
malheureusement plus là pour voir cet  
accomplissement*

*À mes parents et mon frère qui m'ont  
beaucoup soutenue, malgré la peine que leur  
a causé mon départ pour mes études  
graduées*

## Remerciements

Une thèse est un travail long et pénible qui ne s'accomplit pas seule. Je souhaite donc remercier mon directeur de recherche Pierre Moreau qui a fait de moi ce que je suis en tant que scientifique et chercheuse, en me conseillant, me guidant et me transmettant ses connaissances. Je veux aussi remercier Louis Ida Grondin, notre technicienne infatigable, sans qui ce travail aurait pris beaucoup plus de temps. Je remercie également mon co-directeur Denis deBlois qui m'a donné un autre regard sur mon travail et qui a toujours été enthousiaste devant mes résultats. Dans la série des co-directeurs, Daniel Henrion fut la bouée de sauvetage de ma co-tutelle et je l'en remercie ainsi que tous les étudiants, stagiaires post-doctoraux et chercheur de son laboratoire. Je n'oublierai jamais l'aide qu'ils m'ont apportée et l'amitié qui s'est développée entre nous. En parlant d'amitié, je dois remercier les étudiants et stagiaires du laboratoire de Pierre Moreau : Huy Hao Dao, Pierre Beaucage, Daphné Girardot, Bénédicte Desmeillers, Rachida Essalihi, Liz-Ann Gilbert, Wouter Peters, Simon Moreau et Joannie Blanchette qui ont fait de ces six années une période pétillante, drôle et chaleureuse. Merci également aux Dr Servant (Montréal) et Atkinson (Nancy) pour leur expertise et leur aide. Enfin, merci aux étudiants de la faculté qui m'ont aidée ou qui m'ont permis de passer de bons moments en leur compagnie.



# 1. Introduction

## 1.1. Paroi vasculaire

Les vaisseaux sanguins acheminent les nutriments comme l'oxygène à tous les tissus de l'organisme et les métabolites toxiques hors de ces tissus vers le foie. Puis, ils permettent l'élimination des déchets via le rein. Ces vaisseaux sanguins ne sont pas des tubulures inertes servant uniquement de conduits au sang. Il s'agit de structures complexes, hiérarchisées tout au long de l'arbre vasculaire et composées de cellules et de macromolécules de nature protéique et glucidique : la matrice extracellulaire. Les cellules sont intégrées dans la matrice extracellulaire et les interactions cellule-matrice sont très étroites. Les cellules synthétisent les composés de la matrice extracellulaire et en retour la matrice détermine le phénotype des cellules.

### 1.1.1. Composition

#### a. Cellules

Les cellules « normales » de la paroi vasculaire sont les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires et les fibroblastes. Elles présentent des phénotypes différents pour répondre à des rôles différents. D'autres cellules comme des cellules inflammatoires peuvent s'infiltrer dans la paroi vasculaire mais elles ne feront pas l'objet des paragraphes suivants.

#### *i Cellules endothéliales<sup>1</sup>*

Les cellules endothéliales (CE) sont des cellules polygonales aplaties qui couvrent la totalité du système circulatoire. Elles forment une monocouche semi-perméable délimitant la lumière du vaisseau : l'endothélium. Elles sont recouvertes de glycocalyx. Le glycocalyx est une couche de biopolymères chargés négativement (le hyaluronane, l'héparan sulfate protéoglycane) qui limite le passage des grosses molécules dont les lipoprotéines, les protéines plasmatiques. Mais, il existe des espaces intercellulaires (15 à

20 nm) permettant le passage de l'eau et des petites molécules hydrosolubles comme le glucose ou les acides aminés. Dans ces espaces, on trouve un complexe protéique relié aux filaments d'actine et de myosine du cytosquelette et assurant la jonction entre les CEs. L'endothélium artériel comporte aussi des jonctions communicantes (*gap junction*) qui rendent possible la transmission de signaux vasomoteurs d'une cellule à l'autre grâce à des ions, de petits messagers ou des potentiels membranaires. Enfin, les CEs sont attachées à la membrane basale par des intégrines. Ces intégrines sont liées au niveau cytoplasmique au cytosquelette par un complexe vinculine-taline-actine. Ces zones de contact permettent à la CE de résister aux forces de cisaillement produites par le flux sanguin. Donc l'endothélium présente plusieurs fonctions :

- régir les échanges sang-tissu
- participer à la défense contre les pathogènes
- initier l'angiogénèse
- sécréter des substances impliquées dans l'hémostase (le facteur de von Willebrand, le monoxyde d'azote NO et la prostacycline PGI<sub>2</sub>)
- sécréter des substances vasoactives (NO, PGI<sub>2</sub> et l'endothéline).

Le NO est produit grâce à la NO synthase endothéliale (eNOS). L'activité de cette enzyme est stimulée par des agonistes ou par les forces de cisaillement. Elle génère le NO à partir de la L-arginine. Cette réaction dépend de plusieurs co-facteurs dont la tétrahydrobioptérine et est hautement régulée par la calmoduline. Le NO est une substance vasodilatatrice et anti-aggrégante plaquettaire, tout comme PGI<sub>2</sub>. Cette dernière est le produit de l'action de la prostacycline synthase sur le prostaglandine H<sub>2</sub>, lui-même le résultat de l'action d'une cyclo-oxygénase et d'une peroxydase sur l'acide arachidonique. Les CEs sécrètent aussi, à partir de l'acide arachidonique, un vasoconstricteur, le thromboxane A<sub>2</sub>. L'endothélium peut aussi induire une vasodilatation grâce à l'endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). Comme son nom l'indique, EDHF produit une hyperpolarisation au niveau de la cellule musculaire lisse vasculaire ce qui empêche l'entrée du calcium dans la cellule et donc bloque la contraction. La nature de l'EDHF reste controversée. Enfin, les CEs synthétisent un autre vasoconstricteur : l'endothéline. En fait, il existe trois isoformes de l'endothéline (ET) : ET-1, ET-2 et ET-3. L'endothéline est synthétisée par les CEs sous forme de préproendothéline. La dégradation

de ce peptide par la furine produit la big-endothéline qui est finalement convertie, de façon enzymatique, en endothéline active. Une fois libérée par l'endothélium, l'endothéline produit ses effets grâce à des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> présents sur tous les types cellulaires de la paroi vasculaire.

Tableau 1. Effets physiologiques de l'endothéline sur les cellules de la paroi vasculaire

Cellule endothéliale	Cellule musculaire lisse vasculaire	Fibroblaste
ET <sub>B</sub> :	ET <sub>A</sub> et ET <sub>B</sub> :	ET <sub>A</sub> et ET <sub>B</sub> :
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Production de NO et de PGI<sub>2</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasoconstriction</li> <li>• Prolifération</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prolifération</li> <li>• Synthèse de la matrice extracellulaire</li> </ul>

ii *Cellules musculaires lisses*<sup>1,2</sup>

Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) sont des cellules fusiformes avec des extrémités pointues. Contrairement aux cellules du muscle squelettique, elles sont mononuclées. Dans la paroi vasculaire, elles sont organisées en feuillets superposés et parallèles. Elles sont liées à la MEC grâce à différents récepteurs, les plus nombreux étant les intégrines. Les CMLV contiennent des filaments d'actine et de myosine organisés en pseudo-sarcomère. En fait, l'organisation est moins structurée que dans les sarcomères du myocyte cardiaque. Les filaments de myosine s'intercalent entre les filaments d'actine. Mais, les CMLVs ne possèdent pas de ligne Z. On observe, par contre, des sites d'adhésion focale dans le cytoplasme et des jonctions d'adhérence, du côté cytosolique de la membrane plasmique, où les filaments d'actine viennent s'enchasser. On trouve aussi des filaments intermédiaires (desmine et vimentine) qui relient les parties denses pour que la cellule se contracte uniformément.

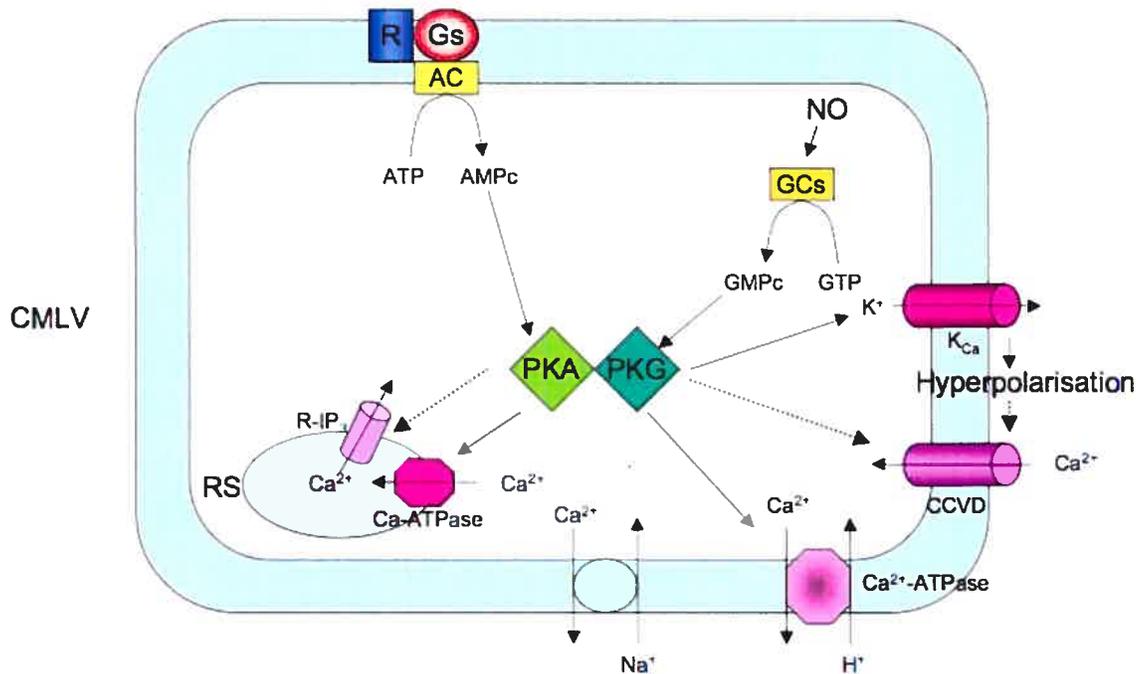
Pour que les CMLVs se contractent, il faut une augmentation de la concentration intracellulaire en ion calcique Ca<sup>2+</sup>. Il existe deux sources de Ca<sup>2+</sup> : le milieu extracellulaire et le réticulum sarcoplasmique. L'augmentation de Ca<sup>2+</sup> peut être due à une modification du

potentiel de membrane qui induit l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants et ainsi l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire dans la CMLV. Elle peut aussi être le résultat de la liaison d'un ligand à son récepteur. La membrane plasmique des CMLVs comprend différents récepteurs pour des substances vasoconstrictrices comme la noradrénaline ( $\alpha$ -adrénergiques), l'angiotensine II ( $\text{AT}_1$ ), l'endothéline ( $\text{ET}_A$  et  $\text{ET}_B$ ). La hausse de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est due surtout à l'activation la phospholipase C qui génère de l'inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) et du diacyl glycérol (DAG). On observe alors un relargage du calcium par le réticulum sarcoplasmique via les récepteurs canaux sensibles à l' $\text{IP}_3$ . Par ailleurs, la hausse du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et du diacylglycérol permet d'activer des protéines kinases C (PKC) impliquées dans la contraction via les canaux calciques voltage dépendants et via une sensibilisation de l'appareil contractile. Cette sensibilisation ferait intervenir la phosphorylation de *protein kinase C-potentiated inhibitor protein of 17 kDa* (CPI-17)<sup>3,4</sup> et la phosphorylation de la MLCP par Rho kinase ce qui inhiberait l'activité de la MLCP<sup>5,6</sup>. Cette sensibilisation permet une contraction de la CMLV à des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire inférieures. Suite à l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracytosolique, un complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline, qui active la *myosine light chain kinase* (MLCK), se forme. La contraction se produit grâce à la phosphorylation des chaînes légères de la myosine par la MLCK. Cette phosphorylation permet ensuite à la myosine ATPase de fonctionner. La myosine se déplace le long du filament d'actine et forme des ponts. Ceci permet le raccourcissement du pseudo-sarcomère et produit une contraction. La phosphorylation est contrée par la *myosine light chain phosphatase* (MLCP). En déphosphorylant les chaînes légères de myosine, elle inhibe la contraction. La MLCP est très active dans les CMLVs. Dès que l'activité de la MLCK diminue suite à une diminution de le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, la MLCP prend le dessus et produit une relaxation. Pour diminuer le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, plusieurs mécanismes peuvent être mis en œuvre :

- empêcher son entrée par une hyperpolarisation qui bloque les canaux calciques voltage dépendants ou par une inhibition des récepteurs canaux sensibles à l' $\text{IP}_3$ .
- l'expulser hors de la cellule, en activant la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ou l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
- le recapter, en activant la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase au niveau du réticulum sarcoplasmique.

Plusieurs voies de signalisation induisent une relaxation des CMLVs. Le schéma suivant les répertorie.

Figure 1. Voies de signalisation impliquées dans la diminution du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire.



CMLV : cellule musculaire lisse vasculaire, RS : réticulum sarcoplasmique, R : récepteur, G : protéine G, AC : adénylate cyclase, ATP : adénosine triphosphate, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, GCs : guanylate cyclase soluble, GTP : guanosine triphosphate, GMPc : guanosine monophosphate cyclique, PKA : protéine kinase A, PKG : protéine kinase G,  $\text{K}_{\text{Ca}}$  : canaux potassiques calcium dépendants, CCVD : canaux calciques voltage dépendants, R-IP<sub>3</sub> : récepteurs canaux sensibles à l'IP<sub>3</sub>, .

En plus de diminuer le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, l'activation de la PKG provoque une désensibilisation de l'appareil contractile de la CMLV. Cette désensibilisation fait intervenir la phosphorylation de la Rho kinase<sup>7</sup> et de la *heat-shock protein 20* (HSP20)<sup>8,9</sup>.

Les CMLV ne sont pas que les cellules du tonus vasculaire. Comme la paroi vasculaire est soumise à beaucoup d'étirement, elles sécrètent des composés de la matrice extra-cellulaire qui contribuent à l'élasticité du vaisseau. Elles sécrètent également des facteurs de croissance et des enzymes protéolytiques favorisant les remodelages vasculaires.

### iii *Fibroblastes*

Les fibroblastes sont des cellules allongées avec de nombreux prolongements. Ils sont responsables du dépôt, du maintien, de la dégradation et du réarrangement de la MEC dans la paroi vasculaire. Ils synthétisent des macromolécules protéiques et des glycoprotéines de la MEC. Ils peuvent aussi sécréter des facteurs de croissance qui stimulent la prolifération cellulaire ou la synthèse de macromolécules par les CMLVs et des enzymes dégradant les composés de la MEC. Le phénotype des fibroblastes est modulable en fonction de leur degré d'activation. Ainsi, on trouve des fibrocytes, des fibroblastes, des proto-myofibroblastes et des myofibroblastes. Les fibrocytes sont des fibroblastes dont l'activité synthétique est diminuée. Un fibrocyte peut devenir un fibroblaste s'il est stimulé. Les proto-myofibroblastes et les myofibroblastes sont des fibroblastes qui expriment des fibres d' $\alpha$ -actine, de la fibronectine ED-A et des sites d'adhésion focale. Ces cellules produisent une tension mécanique. En fait, il s'agit de fibroblastes différenciés sous l'action d'une tension mécanique et du *transforming growth factor-beta* (TGF- $\beta$ ). On les retrouve dans les tissus en cours de cicatrisation<sup>10</sup>.

### b. **Matrice extracellulaire**

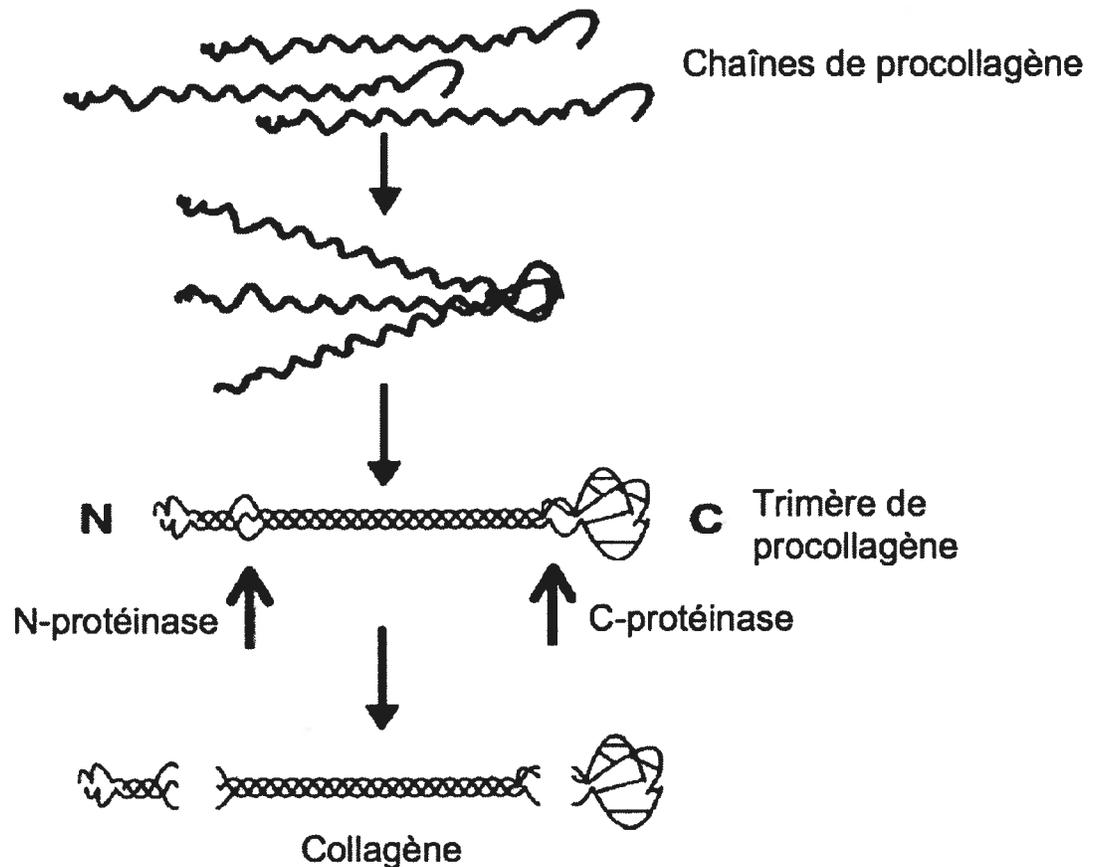
La matrice extracellulaire (MEC) offre aux cellules de la paroi vasculaire un ancrage. Elle les protège et elle participe à leurs modifications comme les changements phénotypiques. C'est un assemblage de macromolécules regroupées en quatre catégories : les collagènes, les fibres élastiques, les protéoglycans et les glycoprotéines de structure. En fait, les protéoglycans et les glycoprotéines de structure participent à la formation des fibres de collagènes et des fibres élastiques.

Les fibres de collagène sont les principales fibres impliquées dans la résistance à l'étirement. Elles sont constituées en majeure partie de collagène. Il existe 27 différents types de collagènes qui sont classés en deux groupes : les collagènes fibrillaires et les collagènes non-fibrillaires. Une molécule de collagène est une protéine structurale qui contient un ou plusieurs domaines présentant la conformation en triple hélice typique des collagènes fibrillaires. Une unité de collagène est composée de trois chaînes polypeptidiques appelées chaînes  $\alpha$ . La structure ainsi formée peut-être homo ou hétérotrimérique (un ou plusieurs gènes). La maturation des chaînes  $\alpha$  pour former les fibrilles nécessite un ensemble complexe de modifications post-traductionnelles. Les enzymes et chaperons nécessaires à ces modifications ne sont bien déterminées que pour les collagènes de type I, II et III.

◆ Collagènes fibrillaires

Les collagènes fibrillaires sont les collagènes de type I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII. Les collagènes V, XI, XXIV et XXVII sont considérés comme des collagènes mineurs car ils sont moins abondants que les trois autres types. L'association en triple hélice des chaînes  $\alpha$  de collagène se déroule dans le réticulum endoplasmique. L'hydroxylation de résidus proline (prolyl-4-hydroxylase) et lysine et la glycosylation de résidus hydroxyproline permettent la formation de l'hélice. Cette association commence après le propeptide C et s'arrête avant le propeptide N (Figure 2).

Figure 2. Assemblage de la triple hélice de collagène.

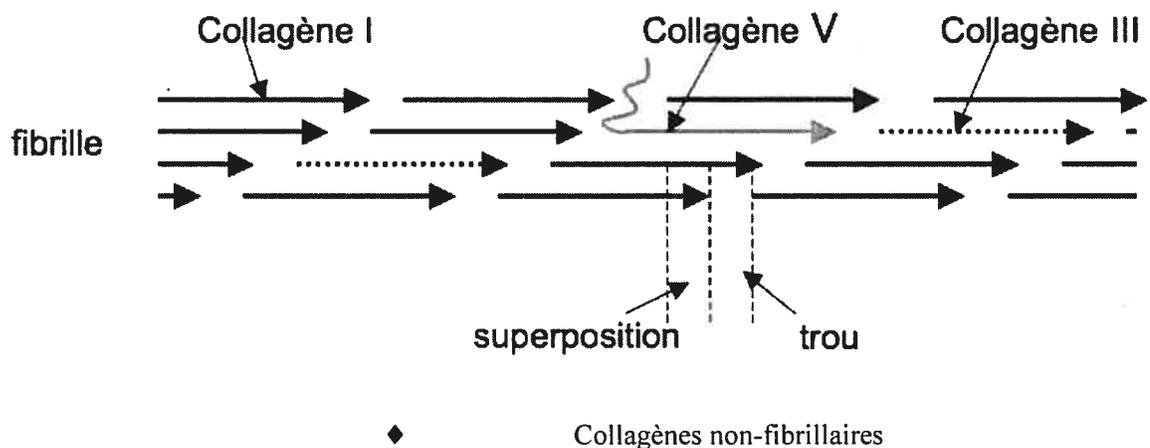


Adapté de <sup>12</sup>.

Ceci se déroule aussi en présence de chaperons dont la *heat-shock protein 47* (HSP47) <sup>14</sup> et probablement l'ostéonectine ou SPARC (*secreted protein, acidic and rich in cystein*) <sup>13</sup>. Contrairement à l'HSP47, SPARC serait transporté du réticulum sarcoplasmique dans l'appareil de Golgi et ensuite sécrété avec les fibrilles de collagène. Des liens disulfures sont formés entre les propeptides C de chaque chaîne  $\alpha$  afin de stabiliser la structure. La triple hélice flanquée de ses extrémités globulaires amino- et carboxy-terminales est sécrétée dans l'espace extra-cellulaire. Une fois débarassées de leurs extrémités par des

métalloprotéinases (adamalysines et astacines), les triples hélices s'agencent de façon parallèle et décalée, avec des zones de superposition et des trous. Elles s'associent pour former des fibrilles hétérotypiques (composées de plusieurs types de collagène). Au niveau vasculaire, on retrouve les collagènes de types I, III et V associés dans la même fibrille. Les hélices des différents collagènes sont liées les unes aux autres grâce à des liaisons covalentes catalysées en partie par la lysyl-oxydase <sup>12</sup>. Par ailleurs, la partie N-terminale du collagène V persistante est projetée à travers les trous et se retrouve à la surface de la fibrilles <sup>11</sup>. Elle est responsable de la majeure partie de l'activité régulatoire du collagène type V sur le diamètre de la fibrille <sup>15</sup> (Figure 3).

Figure 3. Structure de la fibrille de collagène au niveau vasculaire.



Les collagènes non-fibrillaires sont appelés ainsi car les triples hélices ne s'associent pas de façon parallèle et décalée, comme les collagènes vus dans le paragraphe précédent. Ils sont au nombre de 22, mais nous n'aborderons que les collagènes non-fibrillaires présents dans la paroi vasculaire.

Les collagènes de type XII et XIV font partie des collagènes associés aux fibrilles avec des triples hélices interrompues ou FACITs (*fibril-associated collagens with interrupted triple helices*). Ces collagènes sont constitués de trois régions :

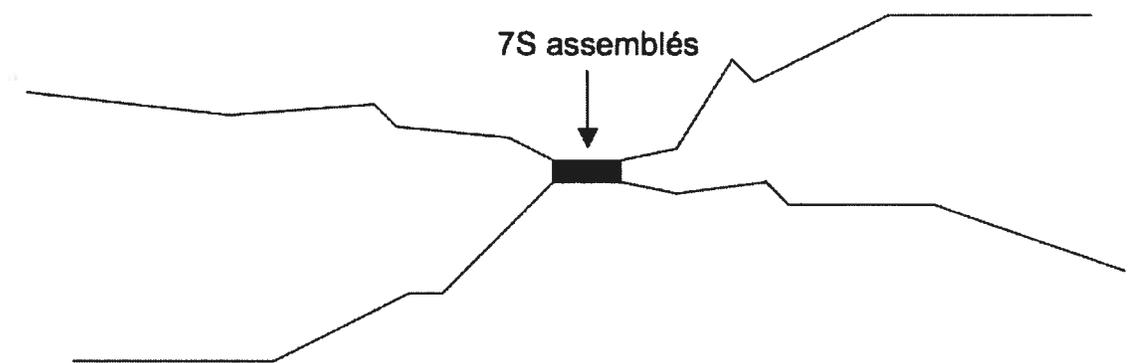
- une région comprenant une ou deux triples hélices qui permet l'interaction et l'adhésion avec les fibrilles

- une seconde région avec une triple hélice séparée de la première par un domaine différent d'une triple hélice qui sert de bras rigide
- une région sans triple hélice qui forme une protubérance hors de la fibrille grâce à la région précédent et interagit avec d'autres éléments de la matrice ou des récepteurs membranaires.

D'après les structures observées dans le cartilage, les collagènes XII et XIV pourraient se loger dans les trous des fibrilles grâce à la première région et permettraient grâce à la troisième région une stabilisation des fibrilles et/ou une modulation par les cellules environnantes <sup>16</sup>.

Les collagènes de type IV, VI et VIII se trouvent dans la membrane basale synthétisée par les cellules endothéliales. Ces collagènes ne forment pas de fibrilles mais des feuillettes ou des réseaux. Le collagène de type IV contient plusieurs domaines de triples hélices interrompus. Ces molécules s'aggrègent en feuillettes grâce à l'interaction de leur région N-terminale, le domaine 7S. Ce domaine présente une structure de triple hélice. Les chaînes  $\alpha$  s'assemblent en tétramère par leur 7S ce qui donne une structure d'araignée (Figure 4).

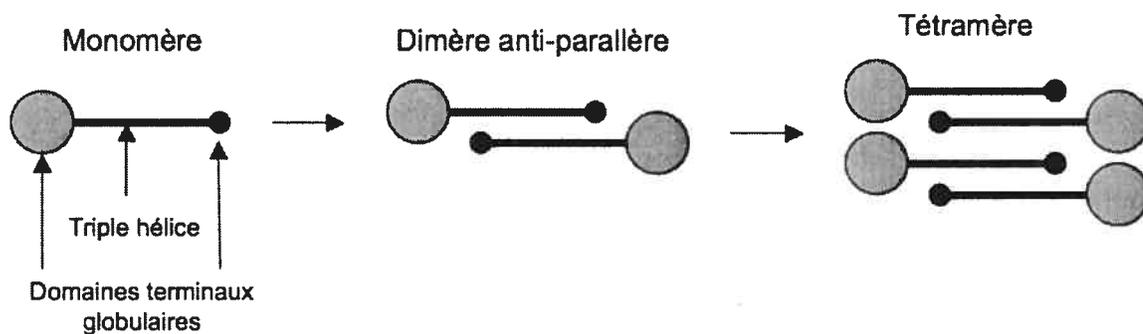
Figure 4. Association tétramérique de collagènes de type IV.



En raison des nombreuses interruptions dans la structure en hélice, le tétramère est flexible. Par ailleurs, les régions C-terminales du tétramère peuvent interagir avec d'autres tétramères pour créer un réseau où s'associent la laminine et le perlécane. C'est la structure de base de la membrane basale du vaisseau sanguin.

Le collagène VI est un composé ubiquitaire de la matrice extracellulaire. Il interagit avec de nombreuses molécules de la MEC incluant les collagènes I, IV, des protéoglycanes, des glycoprotéines de structure et des intégrines. Le collagène VI est un hétérotrimère. Cette molécule de base comprend une triple hélice avec des domaines terminaux globulaires. Dans un premier temps, deux molécules de base vont s'assembler de façon anti-parallèle pour former un dimère. Les interactions sont stabilisées par des liens disulfures. Puis, deux dimères forment un tétramère (Figure 5). C'est à partir de ces tétramères et grâce à des interactions N-terminal/N-terminal entre les tétramères que se forment les réseaux de collagène VI. On observe trois structures possibles : des microfibrilles à boules, des fibrilles larges et des hexagones.

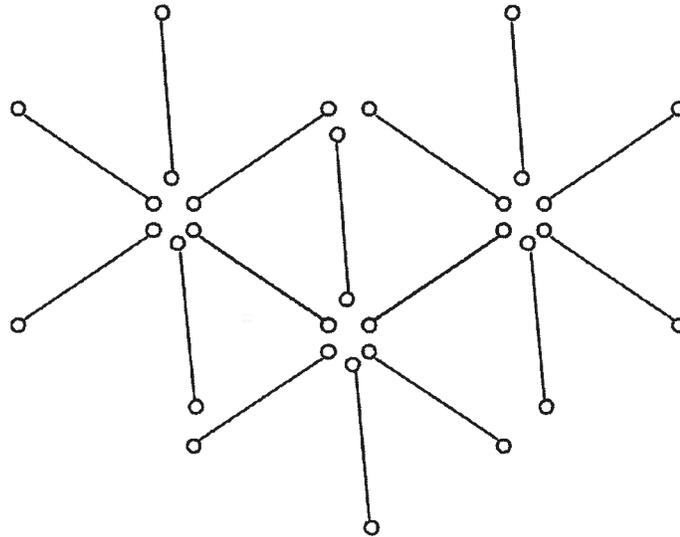
Figure 5. Assemblage du collagène de type VI.



Les protéoglycanes associés au collagène VI déterminent la structure de la supramolécule. La fonction du collagène VI n'est pas encore clairement établie. Notons que le monomère de collagène VI présente 11 séquences Arg-Glyc-Asp ce qui expliquerait ses interactions avec les intégrines. Il pourrait donc jouer un rôle d'interface entre les fibrilles de collagènes I, III, V et les cellules <sup>11, 13</sup>.

Le collagène de type VIII s'assemble en tétraèdres puis forme un réseau hexagonal (Figure 6). On le retrouve dans les vaisseaux sanguins au niveau subendothélial.

Figure 6. Réseau hexagonal de collagène de type VIII.



Les collagènes de type XV et XVIII, appelés multiplexines, sont des homotrimères. Ils contiennent plusieurs domaines de triple hélice, un domaine N-terminal similaire à un domaine de la thrombospondine 1, des chaînes de glycosaminoglycanes, une chaîne chondroïtine sulfate pour le collagène XV et un héparan sulfate pour le collagène XVIII. Donc, ils sont à la fois considérés comme des collagènes et des protéoglycanes. Ils sont exprimés au niveau de la membrane basale endothéliale. Le collagène XV serait nécessaire à la stabilisation de la structure du vaisseau tandis que le collagène XVIII serait impliqué dans l'assemblage de la membrane basale. Ce rôle est supporté par la liaison de l'endostatine (fragment du domaine C-terminal du collagène XVIII) à différents composés de la membrane basale : laminine, fibuline, nidogen <sup>17</sup>.

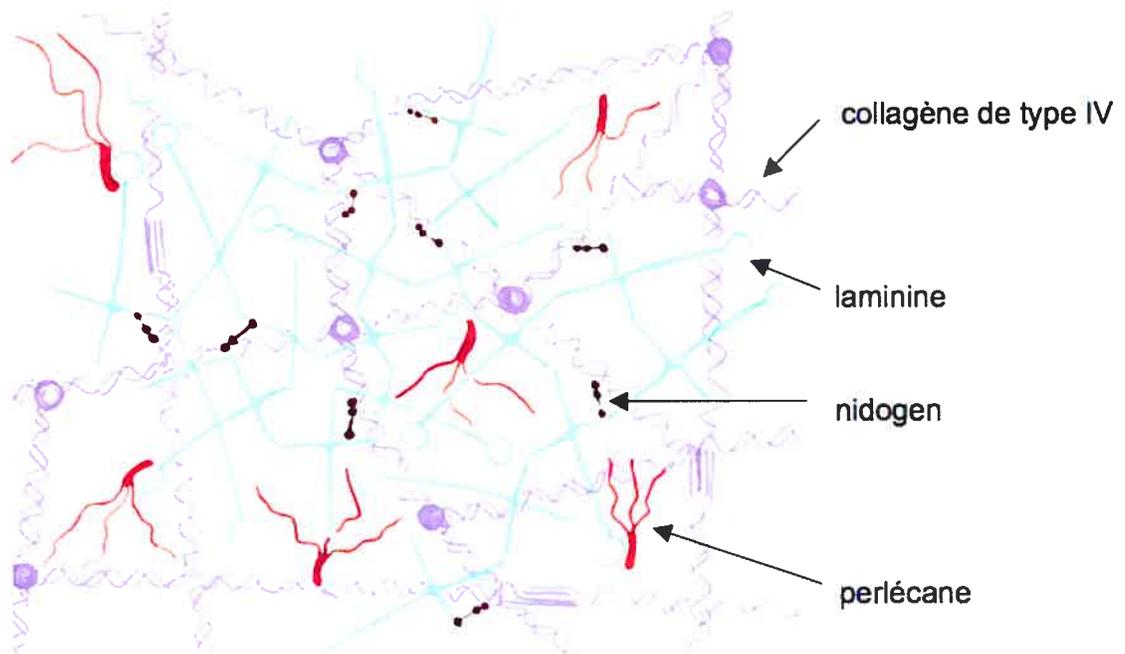
◆ Fibrillogénèse et organisation des fibres de collagène

La fibrillogénèse et le rôle des différentes molécules associées aux fibres de collagène sont source de nombreuses d'incertitudes. La plupart des connaissances sur la fibrillogénèse provient d'expériences in vitro. Ces expériences ont montré que la formation des fibres de collagène dépend de l'assemblage de la fibronectine en fibrilles. La

fibronectine est une protéine extracellulaire qui interagit avec de nombreuses molécules de la MEC et avec la surface des cellules<sup>18</sup>. L'assemblage du collagène se déroule à la surface des cellules et fait intervenir les intégrines  $\alpha_2\beta_1$  et  $\alpha_5\beta_1$ . Cette dernière intervient également dans l'assemblage de la fibronectine. Cependant, le rôle de la fibronectine dans la fibrillogénèse du collagène n'est pas encore démontré in vivo<sup>12</sup>. Par ailleurs, des protéoglycanes sont impliqués dans l'assemblage des fibres de collagène. Plusieurs membres de la famille des *small leucine-rich proteoglycans* (SLRPs) comme la décorine<sup>19</sup>, le biglycane, la fibromoduline et le lumican affectent la fibrillogénèse in vitro et interagissent avec plusieurs types de collagène in vivo<sup>20</sup>. Notons que la liaison des protéoglycanes aux fibrilles (collagène et élastine) permet de limiter les mouvements aléatoires des fibrilles sous l'effet des forces d'étirement. Le hyaluronan et les autres glycosaminoglycanes de la MEC participent aussi au maintien de la structure du vaisseau<sup>21</sup>.

La composition de la membrane basale est différente du reste de la MEC. En fait, la plupart de ces composés ne se retrouve pas ailleurs dans la MEC. Comme nous l'avons vu précédemment, la membrane basale ne présente pas de réseau collagène de type I mais de collagène de type IV associé à un réseau de laminines. Il est associé aux collagènes de type VIII, XV et XVIII qui participent à l'assemblage et au maintien de la structure de la matrice. Ils seraient secondés dans ces rôles par des protéoglycanes comme le perlécane, par les nidogens/entactins (Figure 7). Cette section de la MEC présente donc une structure moins dense. En fait, la membrane basale fournit un support structural aux cellules endothéliales. Elle n'est pas la zone d'étirement et de contraction du vaisseau.

Figure 7. Composés de la membrane basale et interactions supposées.



Adapté de <sup>22</sup>.

## ii Les fibres élastiques

Les fibres élastiques représentent 2 à 4 % du poids de tissu sec des artérioles et jusqu'à 50% de l'aorte. Elles forment des lamelles concentriques séparées par des couches de CMLVs. Les fibres élastiques sont composées d'un noyau amorphe constitué exclusivement d'élastine, représentant 90 % de la fibre élastique mature, et d'un ensemble de microfibrilles entourant ce premier composé. Ces fibrilles contiennent la lysyl oxydase, des glycoprotéines de structure et des protéoglycans. Le tableau suivant présente les protéines, glycoprotéines et protéoglycans présent au niveau des fibres élastiques et leur localisation.

Tableau 2. Molécules associées aux fibres élastiques

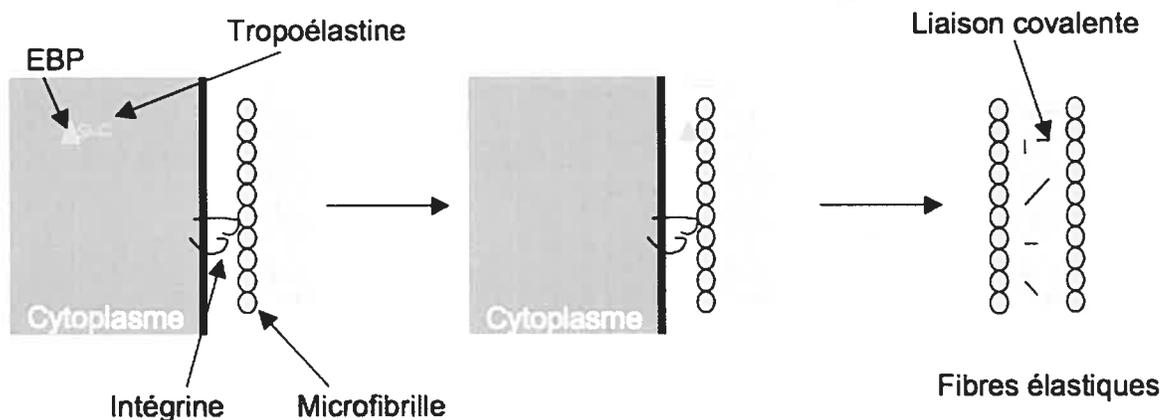
Molécule	Localisation		
	Noyau	Microfibrilles	Interface
Tropoélastine	+		
Lysyloxydase	+	+	
Glycoprotéines			
• Fibrillines		+	
• MAGPs		+	
• Fibuline-1	+		
• Fibuline-2			élastine/microfibrille
• Fibuline-5			fibre élastique/cellule
• EMILINs			élastine/microfibrille
Protéoglycanes			
• Décorine		+	
• Biglycane	+		
• Versicane		+	

MAGPs : *microfibril-associated glycoproteins*, EMILINs : *elastin microfibril interface located proteins*. D'après <sup>23</sup>

◆ Fibrillogénèse

La fibrillogénèse des fibres élastiques commence à la fin du premier trimestre du développement et continue durant la croissance de l'individu. Elle débute par la synthèse de microfibrilles à proximité des cellules. Cette étape est probablement modulée par les intégrines et certains protéoglycans. On observe ensuite la synthèse de la tropoélastine. La tropoélastine est le précurseur soluble de l'élastine. Il s'agit d'une protéine non-glycosylée qui requiert un chaperon, l'*elastin binding protein* (EBP), pour sa migration intracellulaire. L'EBP la protège d'une aggrégation prématurée et d'une dégradation par les sérine-protéases. Une fois à la surface de la cellule, l'EBP interagit avec des  $\beta$ -galactosides présents dans les microfibrilles et libère la tropoélastine<sup>24</sup>. Les microfibrilles synthétisées auparavant forment la charpente sur laquelle se déposent les molécules de tropoélastine. Les tropoélastines s'aggrègent ensemble de façon ordonnée, c'est la coascervation. Les résidus lysine des tropoélastine se trouvent à proximité les uns des autres. Ils subissent alors une désamination oxydative catalysée par la lysyl oxydase ce qui permet la formation de liaisons covalentes. Ceci rend l'élastine insoluble (Figure 8)<sup>25</sup>.

Figure 8. Fibrillogénèse des fibres élastiques.



Le rôle biologique de la plupart des molécules associées aux fibres élastiques (voir tableau) est incertain. Dans les prochains paragraphes, nous détaillerons les rôles connus et supposés de ces différents composés.

◆ Glycoprotéines de structure

Les fibrillines sont des glycoprotéines de structure. Fibrilline-1 et -2 sont les principaux composants structuraux des microfibrilles des fibres élastiques. Les deux fibrillines ne sont pas exprimées de la même façon. La fibrilline-2 apparaît plus tôt dans le développement que la fibrilline-1<sup>23</sup>. En raison de nombreux domaines calcium-binding-epidermal-growth-factor-like (cbEGF) et en présence de calcium, la protéine adopte une structure en bâtonnet. L'assemblage des molécules de fibrillines en microfibrilles se déroule à proximité de la cellule. D'ailleurs, les fibrillines comportent des séquences Arg-Glyc-Asp qui pourraient interagir avec des intégrines. La maturation des fibrilles nécessite la formation de liaisons covalentes grâce aux transglutaminases. De plus, certains protéoglycanes semblent intervenir dans la formation de la structure en chapelet des microfibrilles. Au niveau de la formation de la fibre élastique, les fibrillines régulent l'organisation du dépôt de la tropoélastine<sup>26</sup>.

Les glycoprotéines associées aux microfibrilles (MAGP) sont de petites protéines microfibrillaires. Au niveau de la MEC, on trouve MAGP-1 et MAGP-2. MAGP-1 est localisée sur les microfibrilles. En outre, elle forme des complexes avec des protéoglycanes comme le décorine ou le biglycane et avec la fibrilline-1 ou la tropoélastine. Il semble donc que MAGP-1 intervienne dans l'assemblage de la microfibrille (complexe décorine-fibrilline-MAGP-1) et durant la formation du noyau d'élastine de la fibre élastique (complexe biglycane-tropoélastine-MAGP-1)<sup>23</sup>. MAGP-1 participe à toutes les étapes de la formation de la fibre élastique. La MAGP-2 s'associe aussi avec la fibrilline-1 et stimule l'assemblage de la fibre élastique. Cependant, en raison de sa localisation et de son expression réduites dans le temps, elle ne jouerait pas le même rôle que MAGP-1. Son rôle serait plus transitoire et pourrait être associé à une signalisation cellulaire. Lemaire et al.

ont suggéré que MAGP-2 interviendrait en ciblant la libération de la tropoélastine par la cellule <sup>27</sup>.

Les emilins (elastin microfibril interface located protein) sont des glycoprotéines distribuées à l'interface entre l'élastine amorphe et les microfibrilles <sup>28</sup>. Elles ont été détectées au niveau des fibrilles durant des stades précoces du développement de l'aorte <sup>29</sup>. En outre, EMILIN-1 se dépose en même temps que la fibrilline-1 et la présence d'anticorps anti-EMILIN-1 perturbe le dépôt de la tropoélastine <sup>28</sup>. Donc, EMILIN-1 est associée à la fibrillogénèse des microfibrilles et facilite la coconservation de la tropoélastine.

La famille des fibulines compte 5 membres. Seules trois fibulines sont associées à la biologie des fibres élastiques : fibuline-1, -2 et -5 <sup>23</sup>. Les fibulines possèdent un domaine EGF-like (*epidermal growth factor*) qui permettrait une liaison calcium-dépendante avec l'élastine. Les fibulines possèdent aussi des motifs Arg-Gly-Asp interagissant avec les intégrines. Ce sont des molécules de liaison entre les fibres élastiques et les cellules. La fibuline-5, par exemple, interagit uniquement avec l'élastine au sein des fibres élastiques et avec les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$  au niveau des cellules. L'étude des souris déficientes en fibuline-5 a permis de montrer son implication dans l'organisation tri-dimensionnelle des cellules dans la MEC. En effet, en l'absence de fibuline-5, les CMLVs prolifèrent de façon incontrôlée dans les artères jusqu'à une complète obstruction <sup>30</sup>. Les souris déficientes pour les autres fibulines démontrent des troubles dans l'élastogénèse et la formation des vaisseaux sanguins <sup>31</sup>.



#### Protéoglycanes

Plusieurs protéoglycanes interagissent avec les microfibrilles et les fibres élastiques. Parmi les SLRPs, la décorine et le biglycane sont associés aux microfibrilles et au noyau amorphe d'élastine, respectivement. Ils participent à la fibrillogénèse avec MAGP-1. Par ailleurs, d'autres protéoglycans comme le versican semble influencer l'intégration de la microfibrille dans la MEC.

iii *SPARC, ténascine et thrombospondine.*

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la MEC sert d'ancrage aux cellules de la paroi vasculaire. Les macromolécules adhésives les plus importantes comprennent la fibronectine, la laminine, les collagènes fibrillaires, le collagène de type IV. Elles interagissent avec les cellules grâce à des récepteurs tels que les intégrines. Cependant, les cellules doivent se détacher afin de migrer ou de se diviser. Pour cela il faut diminuer l'adhésivité entre les macromolécules et les cellules. À cette fin, il existe des glycoprotéines appelées protéines anti-adhésives. On compte parmi ces protéines : l'ostéonectine ou SPARC (*secreted protein acidic rich in cystein*), les ténascines et les thrombospondines. Leur mécanisme d'action n'est pas encore bien connu. Toutefois, ces protéines semblent altérer la polymérisation de l'actine (cytosquelette) et provoquer la dissociation des complexes d'adhésion focale. De plus, ces glycoprotéines modifient la signalisation des intégrines et affectent certaines kinases telles que la *focal adhesion kinase* (FAK) et la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)<sup>32,33</sup>.

iv *Forme latente de TGF- $\beta$*

Il existe trois isoformes du *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) chez les mammifères, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3. TGF- $\beta$ 1 est exprimé par les CEs, les CMLVs et les fibroblastes dans la paroi vasculaire<sup>34</sup>. Il est synthétisé, comme les autres TGF- $\beta$ , sous forme de pré-pro-TGF- $\beta$ 1 et est hydrolysé au niveau de l'appareil de Golgi pour former un petit complexe de latence contenant TGF- $\beta$ 1 associé de façon non-covalente avec deux peptides de latence LAP (latency-associated peptide). Suite à la liaison covalente d'une autre protéine de latence, le *latent TGF- $\beta$  binding protein* (LTBP), ce complexe est sécrété et il s'associe à des composés de la MEC. Il s'agit d'une forme de stockage qui ne peut se lier aux récepteurs de TGF- $\beta$ . L'activation finale de TGF- $\beta$ 1 nécessite la dégradation du complexe. Cette procédure implique une protéolyse de la LTBP par des sérine protéases ou des métalloprotéinases. S'en suit des changements conformationnels qui peuvent être induits grâce à certaines intégrines ( $\alpha_v\beta_6$  ou  $\alpha_v\beta_8$ )<sup>35</sup>. La liaison de TGF- $\beta$  à son récepteur

TβRII induit le recrutement de TβRI. Ce complexe de deux récepteurs couplés à une sérine/thréonine kinase génère un signal intracellulaire par une phosphorylation en cascade de protéines de la famille des Smads. Les Smads, sous forme de complexe, interagissent avec des facteurs de transcription afin d'influencer des gènes cibles. Au niveau vasculaire, TGF-β1 est impliqué dans la régulation de la synthèse de la MEC. Il induit une augmentation de la synthèse de composés de la MEC comme le collagène de type I et la fibronectine et diminue leur dégradation en augmentant l'expression d'inhibiteurs des protéases comme les *plasminogen activator inhibitors* (PAIs) et les *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs)<sup>36</sup>.

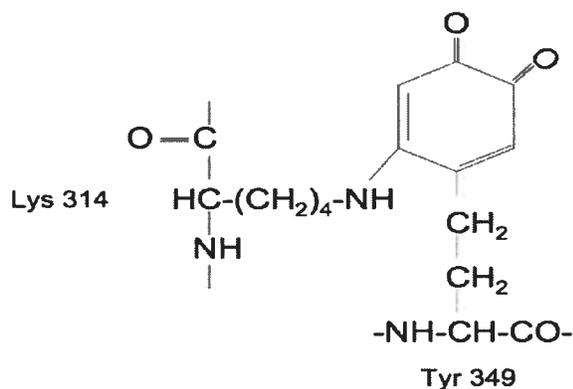
### c. Formation des liaisons covalentes de la matrice extracellulaire

La formation des liaisons covalentes transversales ou pontages entre des protéines permet de stabiliser ces dernières. Le pontage des triples hélices de collagène ou des molécules de tropoélastine rend les fibrilles et microfibrilles insolubles et résistantes.

#### i Lysyl oxydase

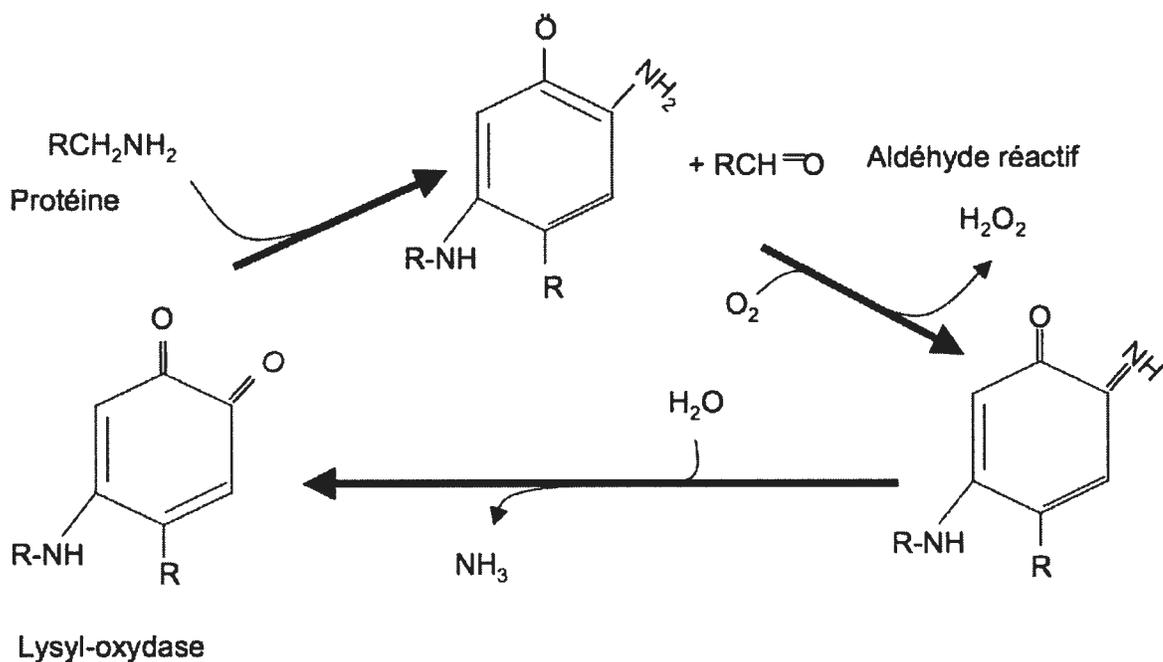
La lysyl oxydase (LOX) est une amine oxydase exprimée et sécrétée par les cellules fibrogéniques comme les CMLVs ou les fibroblastes. Elle est synthétisée sous forme de préproenzyme et libérée dans la MEC sous forme de proenzyme. Son activation requiert une protéolyse par une métalloprotéinase : la *bone morphogenic protein-1* (BMP-1). En outre, son activité dépend de la présence d'un atome de cuivre à son site actif et d'un groupement lysyl-tyrosyl-quinone. Ce groupement est le résultat d'un pontage intramoléculaire entre la lysine 314 et la tyrosine 349 (Figure 9).

Figure 9. Le groupement lysyl-tyrosyl-quinone de la lysyl-oxydase.



Comme son nom l'indique, la LOX catalyse l'oxydation de résidus lysine. Dans un premier temps, il se produit, au niveau de la lysyl-tyrosyl-quinone, une oxydation du groupement amine de l'acide aminé en un aldéhyde réactif. Dans un second temps, l'enzyme réduite est oxydée afin de régénérer la forme active de la LOX <sup>37,38</sup> (Figure 10).

Figure 10. Réaction d'oxydation par la lysyl-oxydase.



L'aldéhyde réactif peut ensuite condenser spontanément avec une autre aldéhyde ou une amine d'une autre protéine. Cette réaction forme un pontage.

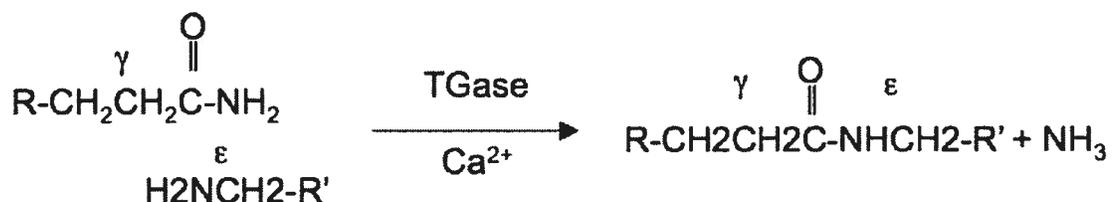
Les substrats les plus connus de la LOX sont le collagène et l'élastine. Toutefois, les séquences entourant les lysines oxydables grâce à la LOX sont très différentes. Il semble que la LOX ne reconnaisse pas une séquence spécifique mais un environnement favorable. En effet, la LOX est sensible à la longueur du peptide, à la présence d'acides aminés dicarboxyliques (acides aspartique et glutamique), à la présence d'un grand nombre de résidus glycine et à la charge ionique du substrat <sup>38</sup>. La LOX initie la formation de liaisons covalentes ou pontage au niveau du collagène et de l'élastine, en oxydant les résidus lysine et hydroxylysine en aldéhydes. Ces derniers réagissent avec les aldéhydes formés ou les groupements amines des lysines et hydroxylysines avoisinants ce qui produit des pontages inter- et intra-peptidiques. Les acides aminés de pontage desmosine et isodesmosine sont spécifiques de l'élastine. Kagan et al a aussi démontré que l'activité de la LOX n'était pas limitée à l'élastine et au collagène <sup>39</sup>.

Notons qu'il existe quatre protéines de structure similaire à celle de la LOX, les *lysyl oxidase-like* ou LOXL (LOXL, LOXL2, LOXL3, LOXL4). Toutefois, leur activation, leur localisation et leur intérêt sont peu connus <sup>40</sup>.

## ii *Transglutaminases*

Les transglutaminases sont au nombre de neuf dans le génome humain. Elles présentent toutes une triade catalytique Cys-His-Asp/Asn et catalysent la formation de pontages entre les protéines. La liaison d'ions calcium est essentielle à leur activité. Le pont inter-peptide est une Nε(γ-glutamyl)lysine entre le résidu lysine (donneur) d'une protéine et le résidu glutamine (accepteur) d'une autre protéine <sup>41</sup>.

Figure 11. Formation de la liaison covalente  $N\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysine}$  par la transglutaminase.



Malgré une faible spécificité pour la protéine porteuse du résidu lysine, les transglutaminases n'ont pas beaucoup de substrats répertoriés. En fait, la limite semble se situer au niveau de la protéine acceptrice. En effet, il existe relativement peu de protéines contenant des résidus glutamine qui peuvent former un intermédiaire avec une transglutaminase. La séquence d'acides aminés voisine de la glutamine, la charge et la structure secondaire semble influencer la réaction. Toutefois, ces critères sont encore assez mal définis <sup>42</sup>.

Seules deux des huit transglutaminases humaines sont sécrétées : le facteur XIII, et la transglutaminase 2 (TG2). Donc, seules ces deux enzymes pourraient intervenir dans la formation des pontages entre les protéines de la MEC. Le facteur XIII est surtout impliqué dans la coagulation et la croissance osseuse. Toutefois, la présence du facteur XIII a été mise en évidence dans la paroi vasculaire au cours du remodelage flux-dépendant <sup>43</sup>. TG2, aussi appelée transglutaminase tissulaire ou endothéliale, est ubiquitaire. Elle est exprimée entre autres au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses d'artères et de veines <sup>44</sup>. Plusieurs protéines de la MEC comme la fibronectine, le collagène, peuvent servir de substrats à la formation de liaisons covalentes transversales catalysées par TG2. En outre, TG2 semble favoriser le stockage de TGF- $\beta$  sous sa forme latente dans la MEC, grâce à la formation de pontages entre cette dernière, les microfibrilles et les fibrilles. Par ailleurs, indépendamment de la formation des ponts inter-peptides, TG2 peut intervenir dans les interactions cellule-matrice. Par exemple, TG2 lie la fibronectine et forme un complexe avec le collagène et des intégrines. Ceci permet une communication entre le cytosquelette et les fibrilles de collagène <sup>41</sup>.

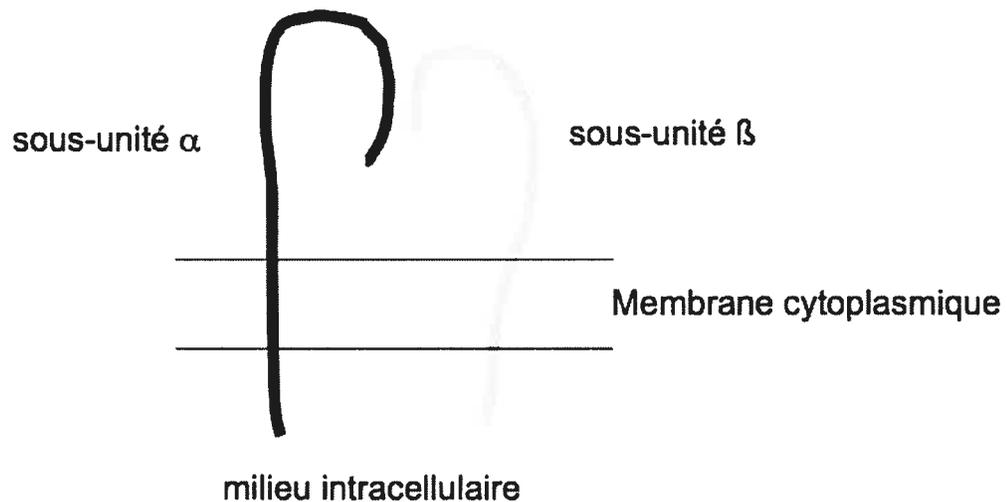
Notons que les transglutaminases peuvent intervenir dans des pontages non-covalents. Dans ce cas, elles contribuent à la stabilisation de liaisons non-covalentes déjà formées en ajoutant quelques ponts  $N\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysine}$  au niveau d'une chaîne latérale. Cette soudure ponctuelle est réalisée par le facteur XIII sur la fibrine par exemple <sup>41</sup>.

**d. Les récepteurs membranaires des composés de la matrice extracellulaire**

*i Intégrines*

Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques composés d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$  liées de façon non-covalente. Les domaines extracellulaires sont les portions N-terminales des deux sous-unités (Figure 12).

Figure 12. Schéma d'une intégrine.



Il existe 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  qui forment 24 récepteurs différents. Sur ces 24 intégrines connues, on ne rapporte des implications dans la biologie vasculaire que pour 16 d'entre elles (voir tableau).

Tableau 3. Intégrines exprimées dans la paroi vasculaire.

Intégrines	Exprimée par		Récepteur du		
	CE	CMLV	collagène	laminine	Motif RGD
$\alpha_1\beta_1$	+	+	+		
$\alpha_2\beta_1$	+	+	+	+	
$\alpha_3\beta_1$	+	+		+	
$\alpha_4\beta_1$		+			+
$\alpha_5\beta_1$	+	+			+
$\alpha_6\beta_1$	+	+		+	
$\alpha_7\beta_1$		+		+	
$\alpha_8\beta_1$		+			+
$\alpha_9\beta_1$		+			
$\alpha_v\beta_1$		+			+
$\alpha_v\beta_3$	+	+			+
$\alpha_v\beta_5$	+	+			+
$\alpha_6\beta_4$	+	+		+	

D'après <sup>45, 46</sup>.

Le domaine extracellulaire des intégrines forme une tête globulaire qui lie des séquences spécifiques d'acides aminés du ligand de façon cation-dépendente <sup>47</sup>. On dénombre plusieurs sites de liaison au niveau des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Ils permettent aussi bien une adhésion et une communication cellule-cellule que cellule-MEC. La séquence Arginine-Glycine-Aspartate (RGD) est le site d'attachement d'un grand nombre de protéines de la MEC. Environ un tiers des intégrines exprimées dans la paroi vasculaire reconnaît cette séquence comme site de liaison. Cette séquence a été découverte sur la fibronectine <sup>48</sup>. La fibronectine n'est pas le seul composé de la MEC présentant une séquence RGD comme site d'adhésion. Cette séquence se retrouve au niveau de la vitronectine, la thrombospondine, la laminine, la tenascine, l'entactine, la forme latente de TGF- $\beta$  et, sous certaines conditions, du collagène <sup>49</sup>. Cependant, ce ne sont pas toutes les protéines comprenant la séquence RGD qui peuvent être liées à une intégrine. La séquence RGD doit être présente à la surface de la protéine et sous une certaine conformation. Par ailleurs, il existe d'autres séquences d'acides aminés propices à l'adhésion des protéines à une intégrine. Les travaux de Underwood et al ont montré que les séquences Tyr-Gly-Tyr-Tyr-Gly-Asp-Ala-Leu-Arg et Phe-Tyr-Phe-Asp-Leu-Arg étaient impliquées dans la liaison de la laminine 1 et du collagène de type IV à l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  <sup>50</sup>. L'intégrine  $\alpha_1\beta_1$  reconnaît une séquence contenant une arginine et un aspartate sur le collagène type I différente de la séquence RGD <sup>51</sup>. Notons que l'aspartate semble important dans la séquence de liaison du ligand à l'intégrine. En effet, cet acide aminé pourrait améliorer la liaison du cation divalent au site de liaison ligand-intégrine <sup>49</sup>.

Les parties C-terminales des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  constituent la portion intracellulaire des intégrines et elles ne possèdent aucune activité tyrosine kinase intrinsèque. Cependant, les intégrines sont associées à de nombreuses protéines intracellulaires dont des kinases, comme la FAK, et des protéines du cytosquelette comme l' $\alpha$ -actine <sup>52</sup>. La liaison d'un ligand extra-cellulaire modifie les interactions entre les deux sous-unités et provoque une agglutination de l'intégrine. Ces changements induisent des signaux intracellulaires. Les intégrines ne transmettent pas que des signaux de l'intérieur vers l'extérieur. Des

modifications intracellulaires rejaillissent aussi sur la MEC ou sur d'autres cellules via les intégrines. Les intégrines sont donc impliquées dans de nombreux processus. L'étude de souris déficientes ou de souris chimérique a permis de montrer leur rôle essentiel dans la vasculogénèse et l'angiogénèse, dans la cicatrisation vasculaire, la migration, la survie cellulaires. La sous-unité  $\beta_1$  est même indispensable à la survie de l'embryon <sup>53</sup>.

## ii Récepteur de l'élastine et de la laminine

Les interactions cellule-matrice sont possibles grâce à la liaison des composés de la MEC et de leur produits de dégradations sur plusieurs récepteurs. Les mieux étudiés et les plus nombreux sont les intégrines. Cependant, l'élastine et la laminine, qui se lient aux intégrines grâce à des motifs différents du motif RGD <sup>54 55</sup>, peuvent aussi adhérer aux cellules grâce à un autre récepteur transmembranaire, l'*elastin-laminin receptor* (ELR). Ce récepteur a été identifié entre autres sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes <sup>56</sup>. ELR est composé de trois sous-unités de poids moléculaires différents 67, 61 et 55 kDa. La plus grosse protéine transmembranaire de ce complexe (67 kDa) a été identifiée comme l'*elastin-binding protein* (EBP). Comme nous l'avons vu précédemment, EBP est impliqué dans le transport intracellulaire de la tropoélastine jusqu'à la surface cellulaire. Une fois cette tâche accomplie, une partie des EBP n'est pas recyclée par la cellule via une endocytose, mais reste au niveau de la membrane plasmique. EBP forme alors un complexe avec deux protéines transmembranaires citées précédemment, pour former l'ELR. En plus de lier l'élastine, la tropoélastine, les peptides dérivés de l'élastine et la laminine, ELR est capable de lier des  $\beta$ -galactosides comme le lactose. Cette liaison a lieu au niveau d'un site de liaison différent de celui de l'élastine <sup>57</sup>. Elle réduit l'affinité de l'ELR pour l'élastine. De nombreuses activités biologiques peuvent passer par ELR comme l'adhésion des cellules aux fibres élastiques, la synthèse et la libération d'élastases, la modulation des flux d'ions, la vasorelaxation des CMLVs par le NO, la migration cellulaire, l'apoptose <sup>58</sup>. Elles sont le résultat de l'activation de différentes voies de signalisation. L'activation de protéines G, de tyrosine kinases comme FAK et des MAPK a déjà été mise en évidence <sup>59</sup>.

### iii Récepteurs à domaine discoïdine

Les récepteurs à domaine discoïdine ou DDR (pour *discoïdin-domain receptor*) sont des récepteurs à activité tyrosine-kinase. On trouve deux membres de cette famille chez l'homme : DDR1 et DDR2. Ces deux récepteurs sont exprimés par les cellules musculaires lisses<sup>60,61</sup>. Plusieurs types de collagènes agissent comme ligand sur les DDRs. Cependant, le site exact de liaison du collagène sur le DDR n'est pas connu. DDR1 est activé par tous les types de collagènes testés jusqu'à présent dont les collagènes type I à VI et le collagène type VIII, tandis que DDR2 n'est activé que par les collagènes fibrillaires et particulièrement par les collagènes type I et III<sup>62</sup>. La configuration en triple hélice du collagène est indispensable à l'activation des DDRs mais sa glycosylation n'est importante que pour la stimulation de DDR2<sup>62</sup>. DDR1 ne semble pas impliqué dans la liaison d'autres composés de la MEC comme la fibronectine ou la vitronectine<sup>63</sup>. La liaison du collagène sur un DDR produit la phosphorylation de résidus tyrosine. Ce processus est très lent. L'activité tyrosine kinase maximale est généralement atteinte en quelques minutes mais elle survient après plusieurs heures pour DDR1<sup>62</sup>. On dénombre 15 résidus tyrosine susceptibles d'être phosphorylés dans la région cytosolique de DDR1 contre 13 pour DDR2. Leur phosphorylation permettrait la liaison de différents molécules présentant des domaines *Src-homology-2* (SH2) et *phosphotyrosine binding* (PTB). Les souris déficientes en DDR1 et DDR2 et la culture cellulaire ont permis d'appréhender l'implication des DDRs au niveau de la cicatrisation vasculaire. Les DDRs jouent un rôle dans l'accumulation du collagène tout en activant certaines métalloprotéinases matricielles<sup>63</sup>. Ils participent aussi à la prolifération et à la migration des CMLVs et de fibroblastes<sup>63,64</sup>. On peut donc extrapoler un rôle des DDRs dans la formation et l'organisation des fibres de collagène dans la MEC par la régulation de la synthèse du collagène et des enzymes responsables de sa dégradation.

#### e. La protéolyse de la matrice extracellulaire

La MEC n'est pas statique ; elle subit une constante dégradation par des protéases. La protéolyse des composants de la MEC présente plusieurs fonctions : l'assemblage de la

MEC et son remodelage structurel. Ce sont des fonctions clés dans la formation, la croissance et la cicatrisation de la MEC. Elles sont également impliquées dans des processus pathologiques comme la croissance tumorale, l'arthrite ou l'hypertension artérielle.

Les protéases sont des enzymes capables de catalyser l'hydrolyse les chaînes peptidiques. Elles sont classées en deux catégories : les exopeptidases et les endopeptidases. Les exopeptidases dégradent les sections terminales de la protéine, libérant ainsi quelques acides aminés, tandis que les endopeptidases s'attaquent à des régions internes de la protéine. Les endopeptidases sont les principales enzymes dégradant les protéines de la MEC. Elles sont classées en fonction de leur mécanisme de dégradation et de leur site d'activité. La dégradation de la liaison covalente entre les acides aminés est due à une réaction acide-base hydrolytique. Les endopeptidases présentent différentes stratégies pour générer un nucléophile nécessaire à la dégradation et pour rapprocher le nucléophile de la cible. On dénombre quatre familles d'endopeptidases <sup>65,66</sup>:

- Les aspartate-endopeptidases
- Les métalloprotéinases
- Les sérine-protéases
- Les cystéine-protéases.

Nous ne nous intéresserons, dans les paragraphes suivants, qu'aux métallo-, sérine- et cystéine-protéinases. En effet, seules ces endopeptidases peuvent agir de façon extracellulaire et donc dégrader la MEC.

#### *i Métallo-protéinases*

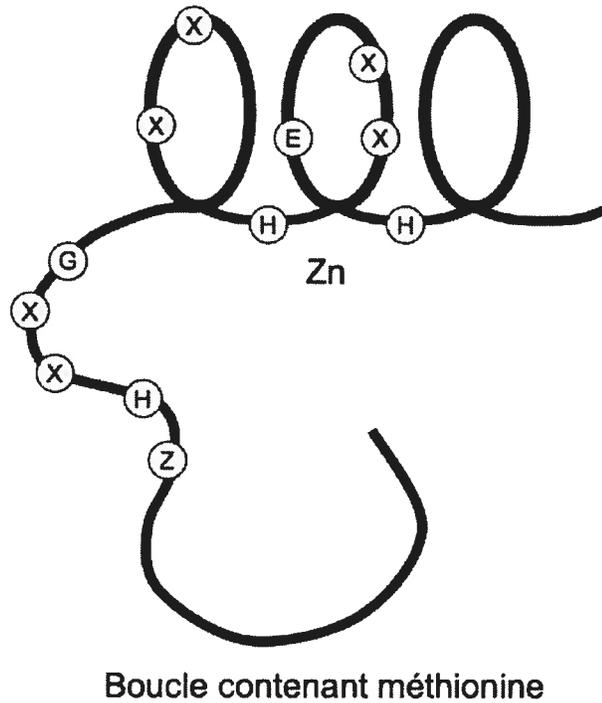
Les métalloprotéinases utilisent un ion métallique à fin d'immobiliser et de polariser une molécule d'eau. Le nucléophile nécessaire à la protéolyse est l'atome d'oxygène de la molécule d'eau. Les métalloprotéinases sont séparées en cinq familles, selon les séquences d'acides aminés qui composent le site catalytique <sup>67</sup>. La fonction catalytique de la plupart des métalloprotéinases dépend d'un ion zinc au niveau de leur site actif. Cet ion est

fréquemment associé à une séquence d'acides aminés conservée (4 familles sur 5) : Histidine-Glutamate-X-X-Histidine (HEXXH). Les deux histidines sont impliquées dans la liaison du zinc tandis que le glutamate permet la polarisation d'une molécule d'eau par le zinc <sup>68</sup>. Parmi les 5 familles de métalloprotéinases, on compte les metzincines. Ces enzymes contiennent une séquence d'acides aminés plus importante : HEXXHXXGXXHZ (G étant la glycine). Les metzincines sont subdivisées en cinq familles :

- Les serralysines
- Les pappalysines
- Les astacines
- Les adamalysines
- Les métalloprotéinases matricielles.

Cette division a été établie suivant la nature de l'acide aminé Z. Il s'agit d'une proline pour les serralysines, d'une valine pour les pappalysines, d'un glutamate pour les astacines, d'un aspartate pour les adamalysines et d'une sérine ou d'une thréonine pour les métalloprotéinases matricielles <sup>68 69</sup>. En plus de partager une séquence catalytique similaire, les metzincines présentent un résidu méthionine, partie intégrante d'une boucle située sous le domaine catalytique. Cette méthionine semble essentielle à la structure du site de liaison du zinc <sup>68</sup>.

Figure 13. Séquence catalytique des metzincines.



Les serralysines sont des enzymes bactériennes qui jouent un rôle dans la virulence et la pathogénicité de la bactérie d'origine.

La famille des pappalysines comporte, jusqu'à présent, deux membres : pappalysine-1 et -2 aussi appelées PAPP-A et PAPP-A2 pour *pregnancy-associated plasma protein-A* et A2. Ces enzymes ont été répertoriées comme metzincines en 2001 grâce aux travaux de Boldt et al <sup>69</sup>. Elles sont impliquées dans la cicatrisation, le développement folliculaire et l'implantation de l'embryon. Par ailleurs, elles sont fortement exprimées au niveau des plaques athéromateuses dans l'insuffisance coronarienne aigüe <sup>70</sup>. Leurs substrats connus sont des *insulin-like growth factor binding proteins* (IGFBPs) <sup>71</sup>. Les IGFBPs antagonisent la liaison des *insulin-like growth factors* (IGFs), des facteurs de croissance, à leur récepteur en raison de leur affinité plus importante. En outre, ces protéines sont des transporteurs et des réservoirs à IGFs. Les IGFs sont libérés suite à la dégradation des IGFBPs par des protéases parmi lesquelles on trouve des sérine-, des cystéine- et des métallo-protéinases. Ils sont impliqués dans la prolifération des cellules

endothéliales, musculaires lisses vasculaires et des fibroblastes. En outre, IGF-I contrôle l'expression de l'élastine au niveau transcriptionnel <sup>72</sup>.

Les astacines regroupent de nombreuses enzymes. Toutefois, seules cinq sont exprimées chez l'homme : la meprine A et les *bone morphogenic protein-1* (BMP-1)/Tolloïd (TLD)-like métalloprotéinases. La meprine A est exprimée par les cellules épithéliales rénales et intestinales. On la retrouve également dans les macrophages et les cellules cancéreuses sous certaines conditions <sup>73</sup>. Toutefois, aucune preuve ne montre son expression par les cellules de la paroi vasculaire ou son implication dans le remodelage vasculaire. BMP-1/TLD métalloprotéinases regroupent quatre métalloprotéinases chez les mammifères soit BMP-1, mammalian Tolloïd (mTLD) et mammalian Tolloïd-like 1 et 2 (mTLL1 et mTLL2) <sup>74</sup>. Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreuses protéines de la MEC sont synthétisées sous forme de précurseurs. Une protéolyse est nécessaire pour que les protéines deviennent matures. BMP-1 et les TLD métalloprotéinases sont responsables de la maturation de nombreuses protéines extracellulaires impliquées dans la formation de la MEC <sup>74,75</sup>. Ces protéines sont détaillées dans le tableau suivant :

Tableau 4. Protéines de la MEC dont la maturation est assurée par BMP-1/TLD métalloprotéinases.

<p><b>Collagènes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Collagènes fibrillaires (types I-III, V et IX)</li> <li>• Collagènes non-fibrillaires (type VII)</li> </ul>
<p><b>Protéoglycanes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Perlecan</li> <li>• Certaines <i>small leucine-rich proteoglycans</i> (SLRPs)</li> </ul>
<p><b>Glycoprotéines de structure</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Laminine 5</li> <li>• Protéines de la matrice extracellulaire de la dentine</li> </ul>
<p><b>Lysyl oxidases</b></p>
<p><b>Facteurs de croissance</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Tissue growth factor-beta</i> (TGF-<math>\beta</math>) latent et membres de la superfamille de TGF-<math>\beta</math></li> </ul>

La protéolyse de ces éléments de la MEC est indispensable à la formation d'une matrice cohérente et, pour certaines protéines, à la viabilité de l'organisme.

Les adamalysines comprennent les ADAMs pour *a disintegrin and metalloprotease*. Actuellement, 23 ADAMs ont été identifiées chez l'homme <sup>76</sup>. Ces enzymes particulières combinent les caractéristiques des molécules d'adhésion cellulaire avec un domaine désintégrine et des protéases avec un domaine métalloprotéinase. Ceci leur permettrait d'être, à la fois, impliquées dans les changements d'adhésion cellulaire et dans le

remodelage de la MEC. En effet, les ADAMs interagissent avec de nombreuses intégrines ce qui module (inhibe ou supporte) la fonction de l'intégrine. Ainsi, l'adhésion cellulaire est modifiée. En outre, les ADAMs, grâce au domaine métalloprotéinase, peuvent libérer le domaine extracellulaire de certaines protéines transmembranaires. Il s'agit d'une activité physiologique, mais elle serait impliquée dans certaines pathologies. Enfin, les ADAMs dégradent des protéines de la MEC : le collagène type IV, le nidogen, la fibronectine, la laminine <sup>46, 68</sup>. Dans la famille des adamalysines, on trouve aussi les ADAMTS (*ADAM with thrombospondin domain*). Ces enzymes interviennent dans la dégradation de certains protéoglycanes comme la fibronectine, la décorine <sup>77</sup> et dans la maturation des collagènes types I-III <sup>74</sup>.

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) représentent un groupe majeur d'enzymes qui influencent la composition de la MEC. Il s'agit d'une famille homogène d'enzymes qui présentent un pro-peptide et un domaine catalytique. Cependant, on observe des variations dans la structure du pro-peptide et du domaine catalytique. Les variations au niveau du domaine catalytique favorisent une meilleure interaction ou liaison avec un substrat particulier comme pour les gélatinases A et B (MMP-2 et -9) qui possèdent un domaine de liaison pour la gélatine. De plus, certaines MMPs possèdent une sous-unité régulatrice, le domaine hémopexine auquel peut s'ajouter un domaine transmembranaire. Dans ce cas, on parle de MT-MMPs pour membrane-type matrix metalloproteinases. Ces MMPs sont localisées à la surface de la cellule. L'expression des MMPs est régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Mais, une fois que la protéine est synthétisée, son activité aussi est contrôlée. Premièrement, tout comme la majorité des metzincines, les MMPs sont synthétisées et sécrétées sous forme de pro-MMPs. Leur activation est ainsi contrôlée. Ceci fait intervenir d'autres protéases parmi lesquelles des sérine-protéases (voir le paragraphe suivant) et même des MMPs (voir tableau). Deuxièmement, il existe des régulateurs endogènes de l'activité des MMPs, les inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs) et les inhibiteurs des métalloprotéinases comme les  $\alpha$ 2-macroglobulines. On dénombre quatre TIMPs (de -1 à -4). Toutes les formes actives de MMPs sont inhibées par des TIMPs. Ces derniers forment des complexes en interagissant

au niveau du site catalytique et de la région C-terminale de l'enzyme. Les  $\alpha$ 2-macroglobulines, quant à elles, n'inhibent pas directement l'activité catalytique des MMPs. En fait, elles piègent les MMPs ce qui les isole de leurs substrats<sup>78 79 80</sup>. Les substrats des MMPs sont très nombreux. Le tableau suivant présente les principaux substrats de la MEC dégradés par les familles de MMPs.

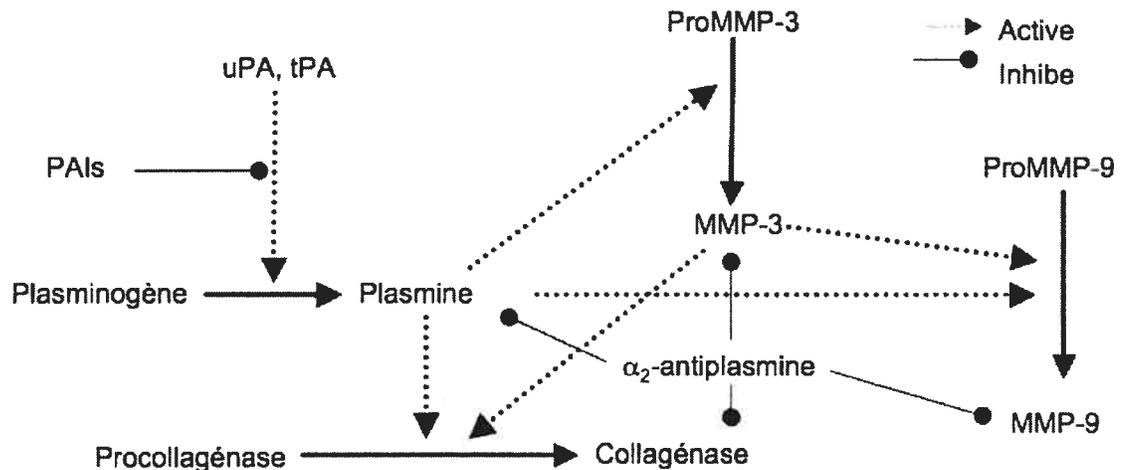
Tableau 5. Métalloprotéinases matricielles : principaux substrats et activateurs.

MMP	Nom commun	Substrats	Activés par
MMP-1, -8, -13, -18	Collagenases	Collagènes fibrillaires surtout, ténascine-C, SPARC, protéoglycanes	MMP-3 MMP-10 plasmine
MMP-2, -9	Gélatinases	Collagènes I, IV, V, VII, X et XIV élastine, fibronectine, ténascine-C, SPARC, protéoglycanes	Nombreuses MMPs pour MMP-2 MMP-2, -3, -13, plasmine pour MMP-9
MMP-3, -10, -11	Stromelysines	Collagènes III, IV, V, fibronectine, laminine, élastine (MMP-10), ténascine-C, SPARC, protéoglycanes	Plasmine (MMP-3) Cathepsine G (MMP-10) Furine (MMP-11)
MMP-7, -26	Matrilysines	Collagènes I, V fibronectine, laminine, élastine (MMP-7), ténascine-C, intégrine (MMP-7), SPARC, protéoglycanes	MMP-3, -10, plasmine (MMP-7 seulement)
MMP-12	Métallo-élastase	Collagène IV, élastine, laminine, fibronectine, entactine	
MMP-19			
MMP-20	Enamélysine		
MMP-23			
MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25	MT-MMPs	Très variables d'une MT-MMP à l'autre	Plasmine, furine (MMP-14 seulement)

ii *Sérine-protéases*

L'activité protéolytique des sérine-protéases dépend d'une triade catalytique comprenant : un résidu sérine et plus particulièrement son groupement hydroxyle (nucléophile), une histidine (base) et un acide aspartique (électrophile) <sup>65 81</sup>. Les sérine-protéases représentent une famille diversifiée. En effet, on y dénombre aussi bien des enzymes digestives (comme la trypsine ou les élastases pancréatiques) que des facteurs de coagulations (comme la thrombine, la kallikréine). Cette famille compte aussi parmi ses membres la plasmine, impliquée dans la fibrinolyse. Cette sérine-protéase est sécrétée sous forme de plasminogène et est activée par d'autres sérine-protéases : les activateurs du plasminogène de type urokinase (uPA) et tissulaire (tPA). Le système comprend également des inhibiteurs qui interviennent au niveau des activateurs du plasminogène (inhibiteurs de l'activateur du plasminogène ou PAI) ou au niveau de la plasmine grâce à la  $\alpha_2$ -antiplasmine (Figure 14). Hormis la fibrinolyse, la plasmine est impliquée dans la dégradation de protéines de la MEC directement ou indirectement. *In vitro*, Bonnefoy et al. ont démontré que la plasmine permettait une dégradation péricellulaire de la fibronectine et de la thrombospondine <sup>82</sup> et de la forme latente de TGF- $\beta$ . Cette sérine-protéase peut aussi dégrader la laminine mais ne peut dégrader le collagène <sup>83</sup>. Indirectement, la plasmine peut dégrader le collagène et d'autres composants de la MEC, en activant certaines MMPs, sous forme de zymogènes (pro-MMPs). *In vitro*, la plasmine active directement les pro-MMP-1, -3, -9, -10 et -13. Elle participe également à l'activation de la pro-MMP-2 <sup>84</sup>. Cependant, *in vivo*, ces résultats ne sont pas tous reproduits. En effet, plusieurs expériences réalisées sur des souris présentant une déficience de u-PA, t-PA, PAI-1 ou du plasminogène démontrent que l'activation de la pro-MMP-2 est indépendante du plasminogène et que l'intervention de u-PA ou de t-PA revêt une importance physiologique minime. Toutefois, l'activation de la pro-MMP-9 se déroule via des mécanismes dépendant et indépendant de la plasmine (via d'autres MMPs) <sup>85</sup>. Donc, les éléments du système fibrinolytique jouent un rôle dans l'activation de certaines pro-MMPs. Toutefois, leur importance physiologique reste encore incertaine.

Figure 14. Schéma de l'activation de la plasmine et son effet sur certaines ProMMPs.



### iii Cystéine-protéases

Les cystéine-protéases utilisent la cystéine et plus particulièrement le groupement thiol pour générer le nucléophile actif. On note, tout comme pour les sérine-protéases, la présence d'une histine impliquée dans le site catalytique<sup>65 p461</sup>. Les cystéine-protéases sont divisées en deux superfamilles : les enzymes reliées à l'enzyme de conversion de l'interleukine β1 et la superfamille des papaïnes. Cette dernière regroupe les cathepsins B, H, L et S qui constituent les plus abondantes enzymes lysosomales. Ces enzymes fonctionnent de préférence à pH acide ce qui semble limiter leur activité aux vésicules intra-cellulaires ou à la région péri-cellulaire de cellules capables de créer physiologiquement un pH acide comme les ostéoclastes. L'importance des cathepsines dans le remodelage de la MEC a été mise en évidence par la découverte de mutations de la cathepsine K chez les individus atteints de pycnodysostose, une maladie caractérisée par une ostéosclérose, une taille réduite des membres et une déformation du crâne<sup>86</sup>. Toutefois, l'implication de cathepsines dans la dégradation de la MEC ne se limite pas à l'os. En effet,

même si les cathepsines sont instables à pH neutre, elles présentent un potentiel élevé de dégradation de la MEC. Même à pH 7,4, la cathepsine K est plus efficace que la MMP-9 pour dégrader l'élastine <sup>87</sup>.

Tableau 6. Efficacité élastolytique de différentes protéases.

Enzymes	Rang
Cathepsine K	
• pH 5,5	10
• pH 7,4	6
Cathepsine L	
• pH 5,5	5
Cathepsine S	
• pH 5,5	7
• pH 7,4	2,5
MMP-2	2,5
MMP-9	1

La valeur de 10 a été attribuée à la cathepsine K, l'élastase la plus efficace. Adapté de <sup>87</sup>

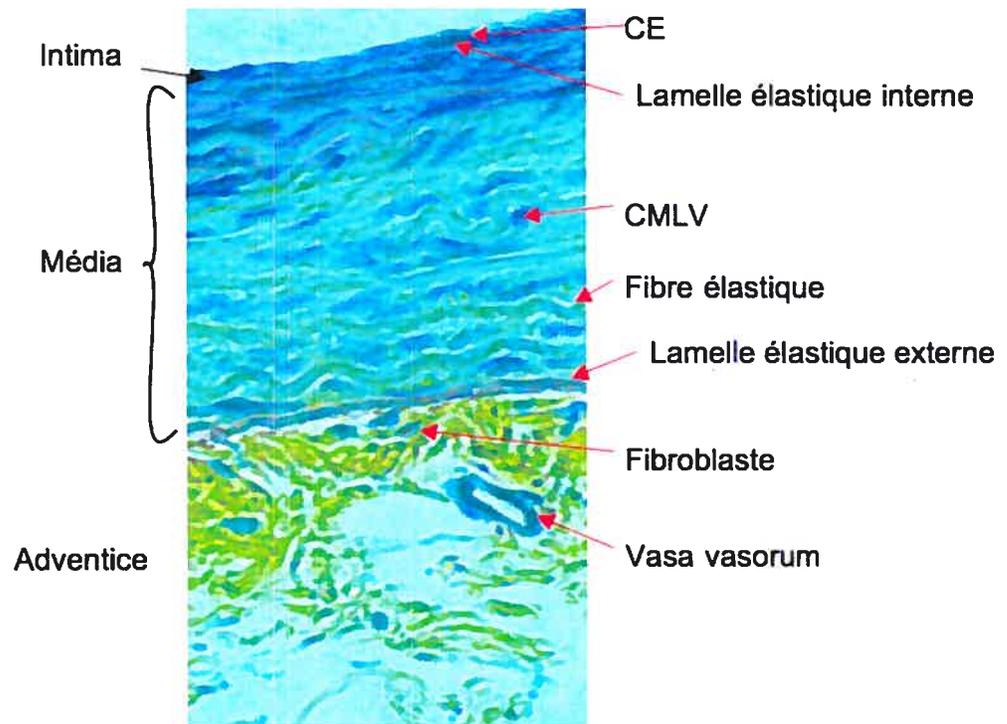
Les cathepsines S et L sont aussi des collagénases <sup>88</sup>. En outre, on observe chez l'homme une augmentation de l'expression et de la sécrétion de la cathepsine S dans des contextes de dégradation de la MEC, comme l'athérosclérose <sup>89</sup> ou l'insuffisance cardiaque <sup>90</sup>.

La dégradation des macromolécules comme l'élastine ou le collagène produit des peptides qui peuvent avoir des propriétés biologiques propres. Ce sont les matrikines. Elles modulent la prolifération et la migration cellulaires, la production de protéases. De plus, elles sont impliquées dans certaines pathologies <sup>91</sup>.

### 1.1.2. Organisation et Rôles

La paroi vasculaire est organisée en trois couches : l'intima, la média et l'adventice (Figure 15), à l'exception des capillaires qui présentent seulement la couche intimale. L'intima est une couche de cellules endothéliales en contact direct avec le flux sanguin ce qui permet d'initier la réponse du vaisseau aux variations de flux et de composition du sang. En outre, les cellules endothéliales laissent passer des nutriments. Elles sont posées sur une fine couche de MEC, la membrane basale. La membrane basale a une composition beaucoup plus simple que la MEC de la média. En résumé, on y retrouve du collagène de type IV qui crée une charpente où adhèrent la laminine et le perlécane (voir Figure 7).

Figure 15. Paroi vasculaire type.



Section transversale d'aorte de rat Wistar.

La média, quant à elle, est constituée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses entourées d'une MEC complexe. Cette MEC est composée de collagènes et

d'élastine, de protéoglycans et de glycoprotéines de structure. La média confère au vaisseau ses propriétés mécaniques d'étirement et de contraction. Elle est séparée de l'intima par la lamelle élastique interne et de l'adventice par la lamelle élastique externe.

Enfin, l'adventice est composée de fibroblastes enchassés dans une MEC. Cette couche est un réservoir de facteurs de régulation de la paroi vasculaire et synthétise, grâce aux fibroblastes, des composés de la MEC. Elle ne présente pas de limite externe comme la média. Par ailleurs, l'adventice des grosses artères contient de petits vaisseaux sanguins appelés vasa vasorum qui nourrissent la média. Malgré une structure similaire (à l'exception des capillaires), les vaisseaux sanguins changent tout au long de l'arbre vasculaire. En fait, on observe des modifications dans le diamètre et la composition des vaisseaux qui reflètent la fonction du vaisseau à un endroit particulier. Le tableau suivant présente le type et la composition des différents vaisseaux sanguins :

Tableau 7. Taille et composition des différents vaisseaux sanguins.

Type de vaisseau	Diamètre luminal	Composition	
		Cellules	Matrice extracellulaire
Artères élastiques	25 mm (aorte)	Cellules endothéliales 5% Cellules musculaires lisses 20% Fibroblastes	Fibres élastiques : 48% Fibres de collagène : 27% protéoglycanes
Artères musculaires	4 mm	Cellules endothéliales 5% Cellules musculaires lisses 40% Fibroblastes	Fibres élastiques : 35% Fibres de collagène : 20% protéoglycanes
Artères de résistance	100-300 $\mu$ m	Cellules endothéliales 5% Cellules musculaires lisses 45-50% Fibroblastes	Fibres élastiques : 25% Fibres de collagène : 20% protéoglycanes
Artérioles	20-30 $\mu$ m	Cellules endothéliales 10% Cellules musculaires lisses 60%	Fibres élastiques : 10% Fibres de collagène : 20% collagènes I et III seulement protéoglycanes
Capillaires	5 $\mu$ m	Cellules endothéliales 95%	Collagène type IV, laminine, fibronectine, HSPG 5%
Vénules	20-30 $\mu$ m	Cellules endothéliales 20% Cellules musculaires lisses 20%	Collagène type IV, laminine, fibronectine 60%
Veines	5 mm à 30 mm	Cellules endothéliales 5-10% Cellules musculaires lisses 40%	Fibres élastiques : 15% Fibres de collagène : 40-45% protéoglycanes

HSPG heparan sulfate proteoglycan <sup>1, 92, 93</sup>

Ces variations de composition correspondent à des rôles spécifiques des vaisseaux. Quels sont-ils ?

À la sortie du ventricule gauche, la pression sanguine et la vitesse du flux sanguin varient beaucoup au cours du cycle cardiaque. Au niveau des capillaires, la pression et le flux sanguins sont relativement stables et réduits. Ceci est rendu possible grâce aux variations de composition de tout le réseau artériel.

Dans les artères de gros calibre, aussi appelées artères élastiques, les fibres élastiques représentent 40% de la composition totale de la paroi vasculaire. En raison des propriétés extensibles conférées surtout par l'élastine, ces artères se distendent à chaque systole puis elles retournent lentement à leur diamètre d'origine pendant la diastole. Ceci permet de convertir un flux sanguin discontinu dans la partie proximale de l'aorte en flux continu au niveau des artérioles et des capillaires. En outre, la compliance (capacité d'un vaisseau à augmenter son volume par unité d'augmentation de pression artérielle) des artères élastiques prévient une chute trop importante de la pression et de débit sanguins, suite à la fermeture de la valve aortique. Notons que la présence du collagène (27% de la composition totale de la paroi vasculaire) permet de limiter la distensibilité du vaisseau.

Les artères musculaires de gros calibre permettent la distribution du sang vers les différents organes. Elles permettent d'augmenter ou de diminuer le flux sanguin au niveau d'un membre, d'une section du corps. Toutefois, ces variations ne sont pas dues à leur compliance. En effet, la quantité d'élastine dans ces artères est nettement diminuée par rapport aux artères élastiques (10 à 20% contre 40 %). En fait, une présence importante de CMLVs dans la paroi vasculaire (environ 60% de la composition totale) permet aux artères de se contracter et se dilater afin de s'adapter à différentes conditions.

Les artères de résistance sont des artères d'un diamètre  $< 300 \mu\text{m}$ . Elles regroupent donc des artères musculaires de petit calibre et les artérioles. Ces artères offrent une résistance à l'écoulement du sang, en raison de leur faible rayon. En effet, le débit obéit à la loi suivante :

$$Q = \Delta P / R$$

Q étant le débit volumique et  $\Delta P$  la différence de pression amont-aval dans le vaisseau.

Selon la loi de Poiseuille (écoulement laminaire),

$$R = 8\eta L / \pi r^4$$

r étant le rayon du vaisseau,  $\eta$  la viscosité du sang et L la longueur du vaisseau.

De plus, en faisant varier leur rayon (vasodilatation ou vasoconstriction), ces artères peuvent augmenter ou diminuer le flux sanguin pour accommoder une demande locale. Notons que les artérioles représentent le segment vasculaire où la chute de pression est la plus importante. Au niveau des capillaires, la pression est d'environ 20 mmHg alors qu'en amont des artérioles elle est de 80 mmHg. Cette faible pression permet de préserver les capillaires qui irrigent les tissus. Par ailleurs, au cours de son passage dans les artérioles, la pression sanguine perd sa pulsativité, réduisant ainsi les variations de débit. Plus on avance dans l'arbre vasculaire, plus il est ramifié, pour atteindre un maximum au niveau des capillaires. Mais à quoi sert cette ramification? En fait, elle permet d'irriguer plus de cellules et de ralentir un peu plus le flux sanguin. Ceci facilite les échanges de gaz et de métabolites au niveau des capillaires, entre le sang et le tissu, d'autant plus que les capillaires présentent une structure propice aux échanges. En effet, leur paroi est constituée d'une seule couche de cellules qui dans certains cas est fenestrée voire discontinue. La paroi des capillaires est donc très facile à traverser.

Passés les capillaires, les vaisseaux convergent en augmentant progressivement leur diamètre. Les veinules et les petites veines sont beaucoup plus nombreuses que les artères de même diamètre. Elles permettent le retour du sang de la périphérie vers le cœur. Les veines sont aussi appelées vaisseaux de capacitance. En effet, elles contiennent environ les 2/3 du sang circulant. Ceci est possible grâce à une fine paroi vasculaire (plus fine que celle des artères pour un même diamètre), facilement étirable. À faible pression, les veines sont plus compliantes que les artères. Or, les veines sont généralement soumises à des pressions de 5 à 20 mmHg. Mais les veines ne sont pas seulement des ballons extensibles, elles possèdent assez de cellules musculaires lisses pour présenter un tonus. Ceci permet aux veines de réguler le volume sanguin et la pré-charge <sup>94</sup>.

Les vaisseaux ne sont pas des structures fixes, elles peuvent se modifier sous l'influence de stimuli mécaniques, neuronaux ou humoraux, physiologiques ou pathologiques, phénomène généralement nommé remodelage.

## **1.2. Remodelage vasculaire dans l'hypertension essentielle**

Dans des conditions normales, les forces de cisaillement et la tension pariétale s'exerçant sur la paroi vasculaire restent à peu près constantes tout le long de l'arbre vasculaire<sup>95</sup>. Toutefois, lorsqu'une perturbation physiologique, telle que l'exercice physique qui provoque une augmentation du flux sanguin, ou pathologique, comme l'hypertension artérielle qui induit une augmentation de pression, apparaît, le vaisseau réagit. Tandis que le remodelage associé aux variations de flux a pour but de normaliser les forces de cisaillement s'exerçant sur la paroi vasculaire, le remodelage ou plutôt les remodelages associés à l'hypertension artérielle permettent de normaliser la tension pariétale. Ces deux modifications mécaniques ne se traduisent pas par le même changement architectural au niveau de la paroi vasculaire. La première provoque un accroissement du diamètre vasculaire tandis que la seconde induit une augmentation de l'épaisseur de la paroi vasculaire.

Quels sont les types de remodelage vasculaire associés à l'hypertension artérielle ? Avant de répondre à cette question, il faut définir les différents types d'hypertension artérielle. En effet, le remodelage vasculaire n'est pas le même dans tous les types d'hypertension.

### **1.2.1. Types d'hypertension artérielle**

L'hypertension peut être systolo-diastolique ou systolique isolée (associée au vieillissement). L'hypertension systolique isolée sera détaillée dans la partie suivante. L'hypertension systolo-diastolique se traduit par une augmentation des valeurs de pression

systolique et diastolique. Cette hypertension peut être secondaire, c'est-à-dire qu'elle apparaît suite à une autre pathologie ou à la grossesse. On compte parmi les causes de l'hypertension secondaire :

- l'hyperaldostéronisme qui provoque une rétention excessive d'eau et de sel
- la sténose de l'artère rénale induisant une augmentation de l'activité du système rénine-angiotensine
- le phaeochromocytome sécrétant des catécholamines qui activent les récepteurs adrénergiques
- la pré-éclampsie qui est la forme la plus courante d'hypertension secondaire. En raison d'une ischémie placentaire, on observe un relargage d'agents provoquant une dysfonction endothéliale et une vasoconstriction.

L'hypertension systolo-diastolique peut aussi être essentielle, c'est-à-dire qu'on ne connaît pas la cause de son apparition. Comme la pression artérielle moyenne (PAM) dépend du débit cardiaque et de la résistance périphérique totale, son augmentation est due à l'accroissement de l'un et/ou de l'autre. Dans la phase de développement de l'hypertension artérielle essentielle, le débit cardiaque est augmenté tandis que la résistance est légèrement sous la normale. À un stade plus avancé, le débit cardiaque est normal mais, la résistance est accrue. Ces variations provoquent des remodelages vasculaires différents dans les artères de résistance et les artères de conductance.

## 1.2.2. Types de remodelage

### a. Structure

#### *i Artères de résistance*

L'augmentation de pression intraluminale, au cours de l'hypertension essentielle, s'accompagne d'une diminution du diamètre des artères de résistance, d'un accroissement de l'épaisseur de la média sans changement de l'aire de section du vaisseau. On parle de remodelage eutrophique. La première observation de ce type de remodelage dans les artères mésentériques de patients hypertendus a été réalisée par Short en 1959 <sup>96</sup>. Ceci a été confirmé par la suite sur des artères sous-cutanées <sup>97</sup>. La modification de structure des

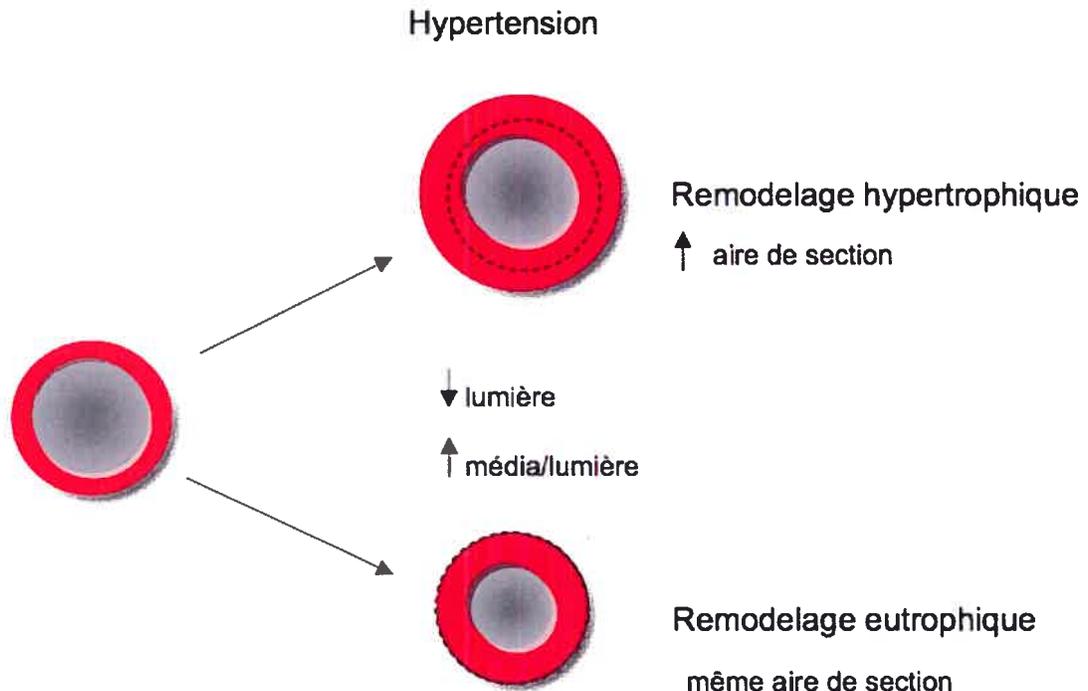
artères mésentériques permet de normaliser l'augmentation de tension pariétale provoquée par l'accroissement de pression interne s'exerçant sur la paroi vasculaire. En effet, la loi de Laplace montre que la tension pariétale (T) dépend de la pression transmurale ( $P_{trans}$ ) déterminée par la pression s'exerçant à l'intérieur du vaisseau et celle s'exerçant à l'extérieur, du rayon vasculaire (r) et de l'épaisseur de la paroi (e) :

$$T = (P_{trans} r) / e.$$

## ii *Artères de conductance*

Suite à une augmentation de pression intraluminale soutenue, la structure des artères de conductance changent leur structure pour une lumière diminuée et une média augmentée. On observe donc une augmentation du rapport média/lumière accompagnée cette fois d'un accroissement de l'aire de section de l'artère. L'épaississement de la média est dû à une augmentation du nombre ou de la taille des CMLVs et de la quantité de MEC. C'est un remodelage hypertrophique. Tout comme la diminution du rayon vasculaire, l'augmentation de l'épaisseur de la paroi permet de normaliser la tension pariétale <sup>98</sup>. Ces modifications des artères de gros calibre ont été rapportées chez les patients hypertendus <sup>99</sup>, <sup>100</sup> et dans des modèles animaux d'hypertension <sup>101-103</sup>. Notons qu'on peut retrouver ce type de remodelage au niveau des artères de résistance chez des patients présentant une hypertension réno-vasculaire <sup>104</sup>. On retrouve aussi ce remodelage dans des modèles animaux d'hypertension artérielle comme le rat hypertendu DOCA-sel <sup>105</sup> ou le modèle "one kidney one clip" Goldblatt <sup>106</sup>.

Figure 16. Remodelages vasculaires associés à l'hypertension essentielle.



La ligne pointillée représente l'aire de section du vaisseau d'origine.

### b. Mécanismes

Au niveau des artères de résistance, l'augmentation de pression sanguine produit un accroissement de la tension pariétale suite à l'étirement de la paroi vasculaire. Cet étirement entraîne une augmentation du tonus myogénique et donc une vasoconstriction. Ainsi, la tension pariétale est normalisée. Cette vasoconstriction semble évoluer vers un remodelage eutrophique<sup>107</sup>. Toutefois, les mécanismes exacts de cette évolution ne sont pas tous déterminés. Le remodelage des artères de gros calibre est mieux décrit. Au niveau de ces artères, l'augmentation de pression sanguine produit aussi un étirement de la paroi artérielle et une augmentation de la tension pariétale. Cependant, la réponse de l'artère est très

différente. Le tonus myogénique est pratiquement imperceptible au niveau des artères de conductance. Donc, ces artères ne peuvent normaliser la tension en se contractant. À la place, les CMLVs synthétisent des composés de la MEC et peuvent aussi se multiplier jusqu'à ce que la tension pariétale revienne à la normale, en raison de l'épaississement de la paroi artérielle. C'est le remodelage hypertrophique.

### *i Artères de résistance*

En 1902, W. Bayliss fut le premier à montrer, sur une artère de chien, qu'une augmentation de pression intravasculaire aiguë provoquait une vasoconstriction <sup>108</sup>. Cette réponse fut confirmée plusieurs années plus tard avec des expériences utilisant des artères de résistance isolées à partir de différents lits vasculaires <sup>109, 110</sup>. La réduction de diamètre s'accompagnait alors d'une dépolarisation et d'un potentiel d'action au niveau des CMLVs. C'est le tonus myogénique. Il s'agit d'une propriété intrinsèque du muscle lisse vasculaire qui se contracte suite à un étirement. Le tonus myogénique se produit suite à une augmentation de l'influx de calcium et une sensibilisation de l'appareil contractile au calcium <sup>111</sup>. Cette sensibilisation dépendrait de la RhoA/Rho kinase et de la protéine kinase C (PKC) <sup>112</sup>. De plus, la réponse myogénique ferait intervenir la protéine kinase régulatrice du signal extracellulaire (*extracellular-signal-regulated protein kinase*) ERK 1/2 et p38 <sup>113</sup>. Enfin, le tonus myogénique est potentialisé par les catécholamines, l'angiotensine II et l'endothéline. Notons que l'hypertension artérielle est associée à une augmentation du tonus myogénique en partie en raison d'une augmentation de la sensibilité au calcium de la phosphorylation de la myosine <sup>114</sup>. En outre, une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium est observée en présence d'hypertension <sup>104, 115</sup>. Ceci favoriserait la vasoconstriction en augmentant l'influence des substances vasoconstrictrices. En fait, en présence d'une augmentation de pression intraluminaire, l'inhibition transitoire du NO sur des artères saines provoque une vasoconstriction permettant une normalisation de la tension pariétale. Cette réponse fait intervenir ERK 1/2, tout comme la réponse myogénique <sup>116</sup>.

Suite au remodelage eutrophique, les CMLVs sont alignées de façon plus contigue et encerclent plus étroitement la lumière du vaisseau. Il y a donc une mobilisation des CMLVs, sous entendant des modifications des interactions cellule-matrice. Quel est le lien entre la modification de la pression, le tonus myogénique et le remodelage eutrophique ?

Le candidat le plus vraisemblable pour cette fonction est l'intégrine ou plutôt les intégrines. Les intégrines sont reconnues pour transmettre les signaux de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule et inversement. Plusieurs expériences montrent l'implication des intégrines dans la réponse (aigüe ou chronique) aux changements de flux sanguin (forces de cisaillement) <sup>117-119</sup>. Les intégrines peuvent aussi intervenir dans la réponse aux changements de pression. En effet, les canaux calciques de type-L qui permettent l'entrée de calcium dans la CMLV pour la contraction sont régulés par trois intégrines :  $\alpha_v\beta_3$  <sup>120</sup>(inhibitrice),  $\alpha_4\beta_1$  <sup>121</sup> et  $\alpha_5\beta_1$  <sup>120</sup>(activatrices). En fait,  $\alpha_5\beta_1$  est responsable de l'influx initial de calcium (canaux calciques de type-L) établissant le tonus vasculaire. Même si  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_5\beta_1$  ont des effets opposés sur les canaux calciques de type L, il semble que ces deux intégrines soient impliquées dans le tonus myogénique <sup>122</sup>. En outre, la stimulation des intégrines provoque l'activation de la voie des MAPkinases comprenant ERK 1/2 et p38. Ceci contribuerait, tout comme l'influx de calcium, au tonus myogénique. Par ailleurs, Heekens et al. ont montré une augmentation de la sous-unité  $\alpha_v$ , dimérisée avec les sous-unités  $\beta_3$  et  $\beta_1$ , dans la média des artères présentant un remodelage eutrophique suite à une augmentation de pression. Ils ont également observé un accroissement non-significatif de  $\alpha_5$ . Ces observations ont aussi été faites dans le modèle SHR où l'expression des intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_5\beta_1$  augmente avec l'âge et l'hypertension des rats <sup>123</sup>. De plus, dans l'étude de Heekens, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  était localisée au niveau des sites de contact durant la migration des cellules. Enfin, l'antagonisme de cette intégrine a permis l'inhibition du remodelage eutrophique <sup>124</sup>. Donc, les intégrines, ou au moins  $\alpha_v\beta_3$ , sont impliquées dans le remodelage eutrophique lié à l'hypertension artérielle. Comment les intégrines agissent sur le remodelage ? En fait, l'interaction ligand-intégrine provoque l'augmentation de

l'expression de la ténascine C <sup>125</sup>. Cette protéine est impliquée dans la désadhésion des cellules, la modification de leur cytosquelette et la synthèse de MMPs <sup>126</sup>. Il semble que l'étirement mécanique augmenterait l'expression de MMP-2 et MMP-9 dans les CMLVs et dans des artères ex vivo <sup>127, 128</sup>. Donc l'augmentation de ténascine C et des MMPs pourrait favoriser la migration des CMLVs à l'intérieur de la MEC, en diminuant leur adhésion aux macromolécules qui les entourent et en dégradant ces dernières. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la stimulation des intégrines active la voie MAPK. En plus de favoriser le tonus myogénique, cette activation pourrait jouer un rôle dans l'accumulation de composés de la MEC, comme le collagène, au niveau des artères de résistance des patients hypertendus <sup>129</sup>. Cette voie de signalisation peut aussi induire une prolifération cellulaire. Une question se pose alors, comment se fait-il qu'on observe un remodelage eutrophique et non hypertrophique dans les artères de résistance ?

La conservation de l'aire de section de l'artère pourrait s'expliquer par un équilibre entre une croissance et une apoptose des CMLVs. Tandis que l'apoptose surviendrait au niveau du diamètre externe du vaisseau, les CMLVs au niveau de la lumière se multiplieraient. Ceci provoquerait le maintien de l'aire de section tout en diminuant la lumière vasculaire. Toutefois, aucune preuve n'étaye cette hypothèse. En effet, des expériences chez des rats hypertendus montrent que l'apoptose est augmentée dans des artères de gros calibre <sup>130, 131</sup>. Les seules expériences s'attachant à l'étude des artères de résistance montrent l'augmentation d'une protéine diminuant l'apoptose <sup>132</sup> ou une diminution de l'apoptose <sup>133</sup>. Dans ce dernier cas, les artères étudiées ne présentaient pas encore de remodelage eutrophique en raison du jeune âge des rats.

Une autre hypothèse est également soulevée : la présence de tonus myogénique empêcherait le développement du remodelage hypertrophique. En effet, il semble que la présence de tonus myogénique inhiberait l'expression de gènes impliqués dans la synthèse protéique et la prolifération cellulaire <sup>134</sup>. Des travaux du laboratoire de Pierre Moreau montrent que la phosphorylation de ERK1/2, suite à l'inhibition du NO et à l'augmentation de la pression, produit une vasoconstriction dans les artères de résistance et une

hypertrophie dans les artères de conductance <sup>135</sup>. L'inhibition de ERK 1/2 bloque la vasoconstriction dans les artères de résistance et provoque une augmentation de la synthèse protéique <sup>116</sup>. Ceci confirmerait donc que le tonus myogénique préviendrait le remodelage hypertrophique. Notons aussi que l'inhibition de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  qui stimule ERK1/2 et participe au tonus myogénique empêche le remodelage eutrophique d'artères de résistance. L'inhibition de cette intégrine provoque l'apparition d'un remodelage hypertrophique <sup>124</sup>.

## ii Artères de conductance

Le remodelage hypertrophique, développé par les artères de conductance, associe une augmentation du nombre ou de la taille des CMLVs et de la MEC. Il semble que l'augmentation de pression stimule l'expression de certains gènes <sup>134</sup> et la synthèse protéique <sup>136</sup>. Par ailleurs, les intégrines pourraient jouer un rôle dans le remodelage hypertrophique en transmettant le stimulus mécanique vers l'intérieur de la cellule. Une fois stimulées, les intégrines activent des MAPkinases provoquant l'augmentation de facteurs de transcription (c-fos) et de l'expression de plusieurs protéines. Comme nous l'avons vu précédemment, l'hypertension artérielle est associée à une dysfonction endothéliale avec une déficience dans la libération du NO <sup>137, 138</sup>. Or, le NO joue un rôle majeur dans l'état de quiescence des CMLVs. Contrairement à ce dernier, l'endothéline et l'angiotensine, qui sont augmentées dans l'hypertension artérielle, agissent comme des promoteurs de la croissance cellulaire. Ceci contribuerait donc au remodelage hypertrophique. D'autres facteurs de croissance, comme le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF *platelet-derived growth factor*), peuvent être impliqués dans la réponse hypertrophique à l'augmentation de pression. En effet, l'expression de l'isoforme PDGF-A est accrue au niveau de l'aorte des rats SHR et dans les artères des rats hypertendus *one-kidney, one-clip* <sup>139, 140</sup>, artères présentant un remodelage hypertrophique. En outre, l'expression de PDGF-A est corrélée avec la pression artérielle moyenne et est diminuée par les traitements antihypertenseurs. On observe également une augmentation de l'expression de TGF- $\beta$ , un autre facteur de croissance, associée à l'hypertension artérielle <sup>141, 142</sup>.

À part la croissance cellulaire, on observe aussi une accumulation de MEC. Cette dernière n'est pas limitée au remodelage hypertrophique, on l'observe aussi dans le remodelage eutrophique<sup>129, 143</sup>. La synthèse de MEC pourrait être stimulée par l'augmentation de l'expression de TGF- $\beta$ . En outre, le passage d'un phénotype contractile à un phénotype synthétique des CMLVs observé dans l'hypertension<sup>144</sup> pourrait s'expliquer par une augmentation de c-fos, peut-être grâce aux intégrines. Ce facteur de transcription favorise le passage de la cellule en phase S<sup>142</sup>. Des études chez les rats hypertendus ont montré une augmentation de la fibronectine<sup>145</sup> et de la ténascine C<sup>146</sup>. Ces deux protéines pourraient faciliter la croissance des CMLVs<sup>147</sup>. Chez les patients atteints d'hypertension artérielle, une augmentation de la synthèse de collagène a été démontrée dans les artères de conductance<sup>148</sup>. L'accumulation du collagène serait favorisée par une diminution de l'activité des MMPs. En effet, chez les sujets hypertendus, la synthèse de collagène de type I n'est pas équilibrée par une augmentation de sa dégradation<sup>149</sup>. La concentration sérique de la MMP-1 est, d'ailleurs, diminuée chez ces patients<sup>150</sup>. Notons que toutes les macromolécules de la MEC ne s'accumulent pas. En effet, on n'observe pas d'augmentation du contenu en élastine de la paroi vasculaire, en présence de remodelage hypertrophique associé à l'hypertension artérielle<sup>151</sup>. Par contre, la structure de l'élastine semble altérée avec une diminution de la taille des fenestrations dans les fibres<sup>152</sup>.

### c. Conséquences du remodelage

À l'origine, le remodelage eutrophique est une adaptation de la paroi vasculaire aux changements de pression pour normaliser la tension pariétale mais, il devient source de problème. En effet, la diminution de la lumière des artères provoque une augmentation de la résistance périphérique. Selon la loi de Poiseuille, une réduction même minime du rayon d'une artère de résistance (la résistance dépend de  $1/\text{rayon}^4$ ) produit une augmentation notable de la résistance de l'artère. Ces résultats mathématiques ont été confirmés par des observations faites sur des artères de patients hypertendus montrant qu'une diminution de 7% du diamètre vasculaire correspondait à une augmentation de 30 à 35 % de la résistance<sup>153</sup>. Cette augmentation de résistance périphérique contribue à l'hypertension artérielle car,

la pression artérielle moyenne dépend du débit cardiaque et de la résistance périphérique. La résistance périphérique est aussi accrue à cause d'une diminution du nombre d'artéioles ou raréfaction ce qui contribue à la diminution de l'aire de section artériolaire totale. Cette raréfaction ajoutée à la diminution du diamètre des artères de résistance favorisent une diminution de l'irrigation des organes et provoquent des dommages, principalement lorsque les demandes augmentent. Donc le remodelage eutrophique contribue à l'établissement de l'hypertension artérielle et aux dommages sur les organes cibles. D'après le travail de Park et al, il semble que le remodelage des artères de résistance se produise bien avant la première manifestation de dommages aux organes cibles chez des patients atteints d'une hypertension moyenne <sup>154</sup>. Les artères de résistance semblent très sensibles aux changements de tension pariétale et leur remodelage semble apparaître rapidement. Ce pourrait donc être la première manifestation détectable de dommages causés par l'hypertension.

Par ailleurs, le remodelage hypertrophique, en raison de l'accumulation de collagène et de la détérioration de l'élastine, favorise l'augmentation de la rigidité vasculaire.

### 1.2.3. Traitements

Le traitement pharmacologique de l'hypertension systolo-diastolique vise évidemment à baisser les valeurs de pression. Il existe plusieurs classes pharmacologiques efficaces à cette fin et qui ont montré de bons résultats quant à la diminution de la morbidité et de la mortalité. Ces classes de médicaments sont :

- les diurétiques (hydrochlorothiazide, indapamide, chlorthalidone)
- les antagonistes des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques
- les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA)
- les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA)
- les bloqueurs des canaux calciques de type dihydropyridinique et de type non dihydropyridiniques.

Même si tous ces médicaments sont efficaces pour diminuer l'hypertension artérielle systolo-diastolique, ils ne le sont pas tous pour améliorer la structure artérielle. En fait, la

plupart provoque une vasodilatation qui permet une augmentation diminution du rapport média/lumière. Cependant, IECA<sup>155</sup> et ARA<sup>156</sup> semblent diminuer le remodelage chez les patients hypertendus ou dans les modèles animaux d'hypertension. Notons que l'efficacité des ARAs pour régresser le remodelage vasculaire dans l'hypertension artérielle est en cours d'évaluation dans l'étude VIOS<sup>157</sup>. De plus, ces traitements diminuent la dysfonction endothéliale.

#### **1.2.4. Modèles animaux d'hypertension systolo-diastolique**

Il existe de nombreux modèles d'hypertension artérielle mais peu présentent les remodelages eutrophique dans les artères de résistance et hypertrophique dans les grosses artères, observés chez l'homme. C'est le cas des rats SHR, des rats TGR(mRen2)27 et des rats traités avec des inhibiteurs de la voie du NO (analogues de la L-arginine) et des modèles d'hypertension induits par la ligature d'artères rénales (one-kidney, one-clip ou two-kidney, one-clip)<sup>158, 159</sup>. Toutefois, ces deux derniers modèles sont des modèles d'hypertension secondaire.

Le modèle SHR a été développé par Okakamoto et Aoki en 1963. Ces rats spontanément hypertendus développent leur hypertension au bout de 5 à 6 semaines de vie. La pression artérielle systolique atteint des valeurs de 180-200 mm Hg. En outre, ces rats développent un remodelage hypertrophique dans les artères de conductance et eutrophique dans les artères de résistance. Cependant, ce dernier évolue en remodelage hypertrophique avec l'augmentation de la pression artérielle. Par ailleurs, les rats SHR ne répondent pas à tous les antihypertenseurs. En effet, il semble que ni les antagonistes des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, ni les diurétiques ne puissent diminuer leur pression artérielle. Ceci démontre certaines limites à ce modèle<sup>160</sup>.

Le modèle TGR(mRen2)27 est un modèle de rat transgénique surexprimant le gène de la souris Ren2<sup>161</sup>. L'hypertension majeure provoquée par la surexpression de ce gène est en partie due à une augmentation de l'activité de la rénine, même si ses niveaux plasmatiques sont bas. Les niveaux de pression systolique peuvent atteindre 200 à 260

mmHg et 70 % des rats homozygotes meurent au bout de 5 mois. Le traitement de l'hypertension artérielle par les antagonistes des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et les bloqueurs des canaux calciques est inefficace chez les rats TGR(mRen2)<sup>27</sup> <sup>160</sup>.

L'inhibition chronique de la synthèse du NO par l'administration d'analogues de la L-arginine n'a été utilisée pour induire l'hypertension artérielle qu'au début des années 1990 soit quelques années après la découverte du NO. Ribeiro et al. ont été les premiers à montrer que l'inhibition chronique de la synthèse du NO chez un rat Wistar permettait de lui faire développer une hypertension soutenue après une journée de traitement <sup>162</sup>. De plus, l'hypertension artérielle induite par le N $\omega$ -nitro-L-arginine méthylester (L-NAME), un analogue de la L-arginine, produit un remodelage hypertrophique des artères de gros calibre <sup>101</sup> et eutrophique des artères de résistance <sup>163</sup>. L'hypertension induite par des analogues de la L-arginine peut être traitée par les cinq classes d'antihypertenseurs habituellement utilisées chez l'homme.

### 1.3. Vieillesse vasculaire

Au cours du vieillissement, les artères élastiques subissent différents changements. On observe une augmentation de la lumière artérielle, un épaississement de la paroi artérielle (surtout dû à l'épaississement de l'intima), une dysfonction endothéliale et une augmentation de la rigidité vasculaire. L'épaississement de l'intima est dû à la migration des CMLVs et à la synthèse de MEC par ces cellules. Celui de la média résulte de l'hypertrophie des CMLVs et de l'accumulation de collagènes et de fibronectine <sup>164</sup>. Par ailleurs, l'augmentation de la rigidité des vaisseaux avec l'âge touche surtout les artères de conductance, tandis qu'il y a peu de changements de rigidité dans les artères musculaires. Des études cliniques ont montré qu'il n'existait aucune relation entre la distensibilité de l'artère brachiale ou fémorale et l'âge, contrairement à l'aorte et à la carotide <sup>165, 166</sup>. Pourquoi les artères élastiques sont-elles plus susceptibles à l'augmentation de la rigidité vasculaire ? Peut-être justement parce qu'elles sont élastiques. En effet, beaucoup de changements dans la structure de ces artères, avec l'âge, impliquent l'élastine.

### 1.3.1. Changements de la matrice extracellulaire

Avec le temps, l'organisation des fibres élastiques se détériore. On observe un amincissement, des fragmentations. De plus, la dégénérescence des fibres élastiques s'accompagne d'une augmentation du collagène et d'une déposition de calcium sur l'élastine altérée .

#### a. Altérations de l'élastine

##### i *Dégradation*

Au cours du vieillissement, on observe une modification chimique et une désorganisation des fibres élastiques avec une fragmentation <sup>167-169</sup>. Cette désorganisation serait due à une fatigue progressive des fibres élastiques. Avolio et al ont démontré l'effet cumulatif des cycles cardiaques sur les changements de structure des fibres élastiques <sup>170</sup>. Plus le nombre de cycles cardiaques et donc d'étirements subis par la paroi artérielle est élevé, plus les fibres élastiques sont fragmentées et désorganisées. L'altération de l'élastine est aussi observée dans des modèles animaux de calcification artérielle médiale et de vieillissement. L'induction de la calcification se fait chimiquement avec de la warfarine ou de la vitamine D et de la nicotine. On observe une diminution de la proportion d'élastine dans le premier modèle <sup>171</sup> et dans le second une fragmentation et une désorganisation du réseau élastique <sup>172</sup>. Ces animaux ne présentent pas d'augmentation de la fréquence cardiaque suggérant que la théorie selon laquelle la désorganisation des fibres élastiques serait due à une fatigue mécanique ne semble pas s'appliquer. Il pourrait donc y avoir une autre explication. Cette fragmentation serait-elle la résultante d'une dégradation accrue ? En 1976, Hrnbeck et al ont montré que l'activité élastase était augmentée avec l'âge et en particulier dans les zones d'artériosclérose <sup>173</sup>. Cependant, cette activité élastase présente dans les aortes humaines n'était pas déterminée à l'époque. Les principales enzymes responsables de la dégradation de l'élastine sont des endopeptidases, sérine-, cytéine- et métallo-protéinases. La famille d'enzymes la plus étudiée est la famille des

métalloprotéinases matricielles (MMPs). Plusieurs études cliniques récentes ont mis en évidence l'implication des MMPs dans l'augmentation de la rigidité vasculaire.

D'une part, une étude clinique menée sur des patients présentant une sténose aortique calcifiée a permis d'établir une corrélation entre des niveaux sanguins élevés de MMP-9, MMP-3 et une augmentation de la vitesse de l'onde de pouls <sup>174</sup>. D'autre part, les travaux de Medley et al. sur des polymorphismes génétiques concernant les promoteurs des gènes de MMP-3 et MMP-9 démontrent une contribution de ces deux enzymes à l'augmentation de la rigidité vasculaire liée au vieillissement. En outre, un polymorphisme du promoteur du gène de MMP-3 existe couramment. La présence de 5 ou 6 adénines consécutives (5A/6A) modifie la liaison du facteur de transcription. L'allèle 5A confère une meilleure activité du promoteur et donc les patients homozygotes 5A/5A présentent une augmentation de l'expression du gène de MMP-3 d'environ 4 fois par rapport aux patients hétérozygotes 5A/6A. Par contre, les patients homozygotes 6A/6A voient une diminution de l'expression du gène. Les patients plus âgés hétérozygotes présentent une rigidité aortique moins élevée que les homozygotes 5A/5A et 6A/6A. Ceci n'est pas observé chez les patients plus jeunes. Donc l'exposition, pendant plusieurs années, à un génotype favorisant la dégradation des fibres d'élastine (5A/5A) ou l'accumulation des protéines matricielles (6A/6A) provoquerait une augmentation de la rigidité vasculaire <sup>175</sup>. Notons que l'allèle 6A a été associé à l'épaississement de l'intima-média, une modification structurelle observée au cours du vieillissement vasculaire <sup>176</sup>. Le promoteur de la MMP-9, quant à lui, présente un polymorphisme caractérisé par une substitution d'une cystéine en thymidine (C/T) qui modifie son activité. L'allèle C confère une activité diminuée du promoteur en raison d'une liaison plus importante du répresseur de la transcription. Dans cette étude de Medley et al., les porteurs de l'allèle T (T/T et T/C) présentaient des niveaux d'expression et d'activité de MMP-9 plus élevés que les patients homozygotes C/C et une augmentation de la rigidité artérielle <sup>177</sup>. Ceci suggère que cette rigidité artérielle pourraient être causée par une dégradation excessive des fibres élastiques.

Enfin, Yasmin et al ont montré que l'accroissement de l'expression de MMP-9, MMP-2 et l'activité élastase sérique étaient corrélées à l'augmentation de vitesse de l'onde de pouls chez des patients atteints d'hypertension systolique isolée. Dans cette étude regroupant des sujets entre 60 et 76 ans, la MMP-9 a été identifiée comme un important prédicteur de la vitesse de l'onde de pouls, avant même l'âge des patients. De plus, même chez les sujets jeunes et sains, la MMP-9 reste un prédicteur indépendant de la rigidité aortique (après l'âge cette fois) <sup>178</sup>.

Donc les MMPs, probablement en dégradant les fibres élastiques, favorisent la rigidité vasculaire. La dégradation de l'élastine peut diminuer son élasticité et donc réduire sa capacité à se distendre lors de l'éjection cardiaque ce qui augmente l'impédance de l'aorte et la vitesse de l'onde de pouls. En outre, la dégradation de l'élastine et d'autres macromolécules de la MEC génèrent la formation de peptides ou matrikines qui peuvent intervenir dans les processus liés à la rigidité vasculaire.

## *ii Calcification*

La calcification vasculaire est décrite depuis une centaine d'année dans les artères humaines <sup>179</sup>. Une étude menée dans les années 40 a permis de montrer que la calcification vasculaire progressait de façon importante avec l'âge. En effet, seuls 4 % des sections d'aorte des sujets âgés entre 20 et 30 ans comportaient des zones de calcification tandis qu'après 50 ans, on en trouvait dans 98 % des spécimens <sup>180</sup>. La calcification décrite est localisée autour des fibres élastiques dans la média du vaisseau. C'est la calcification artérielle médiale ou élastocalcinose. Elle implique les CMLVs et sans infiltration de macrophages ou de cellules T n'a été décrite. Il existe deux autres types de calcification vasculaire :

- La calcification liée à l'athérosclérose. Il s'agit d'un dépôt intimal de calcium associé à des lipoprotéines et une présence de macrophages et de cellules T.
- La calciphypaxie vasculaire. Dans ce cas, on observe un dépôt de calcium et de phosphate en raison de calcémie et phosphatémie élevées. Contrairement aux deux autres formes de calcification, on n'observe pas de pseudo-ostéogénèse avec l'expression de protéines osseuses.

La modification chimique de l'élastine liée à l'âge favorise la fixation du calcium dans la paroi vasculaire. En effet, Seligman et al ont montré que l'élastine isolée à partir d'aortes humaines présentait une calcification plus importante à mesure que l'âge de l'individu augmentait. L'analyse des échantillons indiquait qu'avec l'âge le nombre d'acides aminés polaires, plus susceptibles à la fixation d'hydroxyapatite, augmentait <sup>181</sup>. L'augmentation de l'affinité de l'élastine pour le calcium pourrait être due à sa dégradation par les MMPs qui libérerait des acides aminés polaires. Vyavahare et son équipe ont démontré dans plusieurs travaux que la calcification d'implants d'élastine s'accompagnait d'une augmentation de l'expression et de l'activité de MMP-2 et MMP-9. Un pré-traitement des implants d'élastine avec le chlorure d'aluminium  $AlCl_3$  empêchait complètement la calcification et réduisait l'activité des MMPs <sup>182, 183</sup>. Cette même équipe, en utilisant un modèle de calcification artérielle (application de  $CaCl_2$ ), a montré que les souris déficientes en MMP-2 ou MMP-9 ne développaient pas de calcification <sup>184</sup>. Ces modèles d'élastocalcinose sont toutefois très différents de la physiologie de l'élastocalcinose artérielle. En effet, on observe dans le premier une infiltration de fibroblastes et de macrophages et dans le second une calcification intimale associée à la calcification médiale. Néanmoins, la dégradation de l'élastine par les MMPs semble essentielle à la calcification. Récemment Qin et al, en induisant la calcification grâce à des injections de vitamine  $D_3$ , a démontré que l'inhibition des MMPs avec la doxycycline et le GM6001 diminuait l'accumulation d'hydroxyapatite dans l'aorte et réduisait l'activité des gélatinases <sup>185</sup>.

La calcification artérielle participe à l'augmentation de la rigidité vasculaire. En utilisant des modèles animaux de calcification artérielle médiale, les équipes de Atkinson et Moreau ont montré une relation directe entre la calcification et l'augmentation de la rigidité vasculaire <sup>171, 186</sup>. Cette relation a été confirmée chez des patients atteints d'insuffisance rénale chronique qui présentent une calcification artérielle accélérée <sup>187</sup>.

### **b. Accumulation des macromolécules de la matrice extracellulaire**

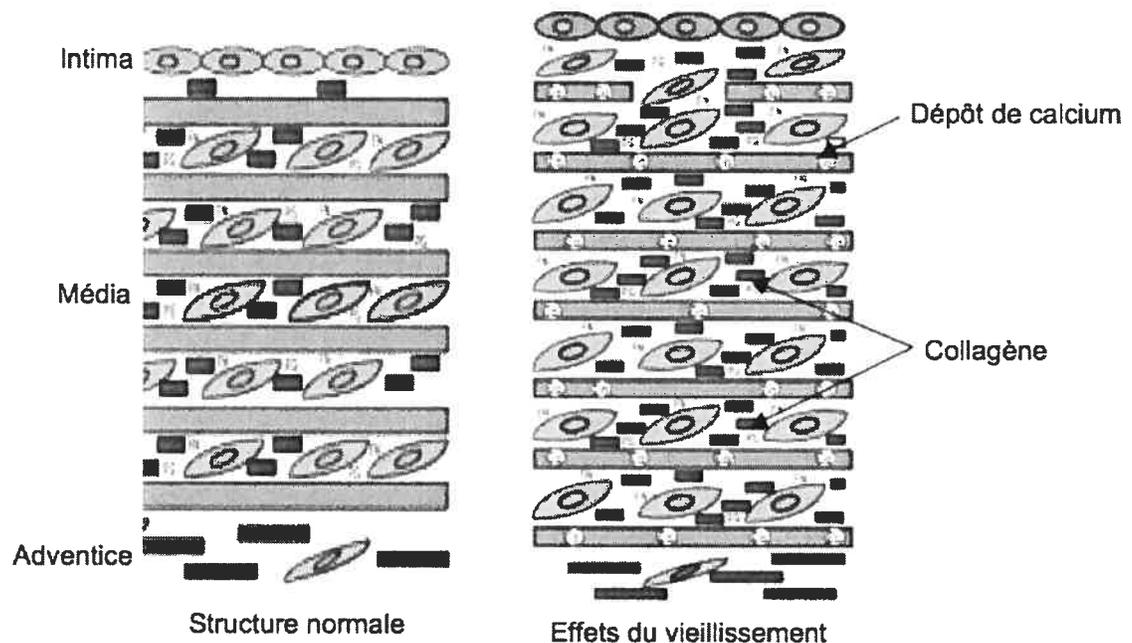
Comme nous l'avons vu précédemment, le vieillissement s'accompagne d'un accroissement de l'épaisseur de la média en partie dû à l'accumulation de macromolécules de la MEC. Une étude réalisée par Spina et al. a montré que la quantité d'élastine ne variait pas avec l'âge mais qu'une augmentation du contenu en collagène et en glycoprotéines était perceptible <sup>188</sup>. Ce processus a également été observé chez l'animal <sup>189</sup>. Cette accumulation de molécules peu élastiques confère une certaine rigidité au vaisseau et peut s'expliquer par une diminution de leur dégradation et/ou une augmentation de leur synthèse.

Avec le vieillissement, l'activité des MMPs augmente. Or, ces enzymes ne dégradent pas que l'élastine, elles peuvent catalyser l'hydrolyse de nombreux composés de la MEC. Se pourrait-il que certains composés soient résistants à l'hydrolyse ? En fait, les liaisons covalentes intermoléculaires confèrent aux protéines matricielles une protection contre l'hydrolyse. Au cours de leur maturation, le collagène et l'élastine développent des pontages catalysés par la lysyl oxydase et la transglutaminase. Ceci leur procure une résistance partielle à la protéolyse. En vieillissant, le nombre de liaisons covalentes diminue pour l'élastine <sup>167</sup>, tandis que celui du collagène augmente. Ces nouvelles liaisons sont en partie formées par un processus non-enzymatique. Il s'agit d'une glycation qui, par réaction entre un ose et un résidu lysine ou arginine, va former un produit d'Amadori. Ultérieurement, ce produit d'Amadori se transforme en produit avancé de glycation (AGE *advanced glycation endproduct*). Bruel et al ont montré l'accumulation des AGEs dans la paroi artérielle avec l'âge <sup>190</sup>. Ces liaisons, en plus de protéger le collagène de l'hydrolyse, augmentent sa résistance à l'étirement <sup>164</sup>. En outre, elles perturbent les interactions cellule-matrice via les intégrines surtout si elles touchent une séquence RGD <sup>191</sup>.

Par ailleurs, la dégradation de l'élastine et d'autres composés de la MEC par les MMPs libère des matrikines et des facteurs de croissance. Parmi ceux-ci, on trouve TGF- $\beta$ . Or, TGF- $\beta$  stimule la synthèse de collagène et de fibronectine par les CMLVs <sup>34, 192</sup>. Il peut

aussi augmenter l'expression de la lysyl oxydase <sup>193</sup>. Donc, TGF- $\beta$  pourrait participer à la fois à l'accumulation du collagène et à la réduction de sa dégradation.

Figure 17. Effets du vieillissement sur la structure de la paroi vasculaire. D'après <sup>164</sup>



### 1.3.2. Changements cellulaires

L'augmentation de la rigidité vasculaire ne dépend pas seulement de modifications structurelles. Elle est aussi affectée par l'altération du tonus vasculaire.

#### a. Dysfonction endothéliale et rigidité vasculaire

Le vieillissement vasculaire s'accompagne d'une sénescence <sup>194</sup> et d'une dysfonction des cellules endothéliales. Celermajer et al ont mesuré la dilatation au flux endothélium-dépendante chez des patients âgés de 15 à 72 ans. Cette mesure a permis de montrer que la fonction endothéliale s'altérait à partir de 50-60 ans. Cependant, la fonction des CMLVs n'était pas modifiée <sup>195</sup>. Il semble que l'activité de la eNOS et, par conséquent, la production de NO soient diminuées <sup>196</sup>. De plus, l'augmentation du stress oxydatif avec

l'âge contribuerait en partie à la dysfonction endothéliale <sup>197</sup>. En effet, l'anion superoxyde, dont les niveaux sont augmentés avec le vieillissement, diminue la biodisponibilité du NO, en formant du peroxynitrite <sup>198, 199</sup>. Or, plusieurs expériences et observations cliniques ont montré que le NO influençait la rigidité artérielle <sup>200, 201</sup>. De plus, le vieillissement est associé à une diminution de la vasodilatation dépendante de l'EDHF <sup>202</sup> et de PGI<sub>2</sub> <sup>203</sup> chez l'animal. On observe alors un déséquilibre entre la libération des facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs par l'endothélium <sup>204</sup>. Des expériences chez l'animal ont montré que la dysfonction endothéliale associée au vieillissement pouvait être due en partie à la production d'agents vasoconstricteurs dérivés de cyclooxygénases tels que TXA<sub>2</sub> et PGH<sub>2</sub> <sup>205, 206</sup>. L'utilisation de simvastatine chez des rats âgés a permis d'améliorer la fonction endothéliale en augmentant la synthèse de NO, les mécanismes antioxydants et en diminuant la génération de TXA<sub>2</sub> <sup>207</sup>. Aucune étude clinique montrant l'augmentation des prostanoïdes vasoconstricteurs avec l'âge n'est disponible à ma connaissance. Cependant, une étude récente montre qu'un traitement avec la simvastatine permet d'améliorer la fonction endothéliale et de réduire la vitesse de l'onde de pouls aortique, chez 20 patients atteints d'arthrite rhumatoïde âgés d'environ 58 ans <sup>208</sup>. Cette étude présente toutefois un faible nombre de patients et la présence d'une pathologie inflammatoire pourrait modifier les niveaux de production des prostanoïdes vasoconstricteurs. En clinique, les patients âgés présentent des taux circulants d'endothéline plus élevés que les patients jeunes <sup>209</sup>. Or, l'endothéline contribue directement à l'accroissement de la vitesse de l'onde de pouls, un indice de la rigidité vasculaire <sup>210</sup>. De plus, le vieillissement provoque une augmentation de la réponse des CMLVs aux facteurs vasoconstricteurs endothéliaux <sup>211</sup>. La diminution de la synthèse de NO et d'autres facteurs vasodilatateurs et l'augmentation de la synthèse d'endothéline semblent donc contribuer à l'augmentation de la rigidité vasculaire.

En dehors de leur effet sur le tonus vasculaire, le NO et l'ET peuvent contribuer à l'augmentation de la rigidité vasculaire en participant à la calcification vasculaire et à la fibrose. Dupuis et al ont démontré qu'une déficience en NO, induite par l'administration de N-nitro-L-arginine méthylester (L-NAME), provoquait l'expression de l'ostéopontine et de

la *bone sialoprotein* (BSP), deux protéines impliquées dans la calcification <sup>212</sup>. De plus, l'ET semble impliquée dans la calcification artérielle médiale. En effet, le darusentan, un antagoniste des récepteurs de l'endothéline, prévient et régresse la calcification induite chez le rat. Ce mécanisme semble impliquer l'anhydrase carbonique IV <sup>213</sup>. Par ailleurs, la déficience en NO produit une augmentation de l'expression de TGF- $\beta$  (qui stimule la synthèse d'endothéline) et de macromolécules de la MEC qui sont impliquées dans la fibrose <sup>214</sup>.

### **b. Changements phénotypiques**

La calcification artérielle médiale n'est pas le fruit du dépôt passif de cristaux d'hydroxyapatite sur l'élastine altérée. Plusieurs études démontrent l'implication dans cette calcification de protéines pro- et anti-calcifiantes habituellement reliées à la minéralisation osseuse. Les souris déficientes en *matrix Gla protein* (MGP) montrent une calcification artérielle importante <sup>215</sup>. Cette protéine anti-calcifiante est exprimée par les CMLVs dans la média des vaisseaux sanguins normaux et son expression est diminuée dans les CMLVs durant leur calcification <sup>216</sup>. Par ailleurs, même si les souris déficientes en ostéopontine (OPN) ne présentent pas de calcification artérielle <sup>217</sup>, l'implication de cette protéine a été démontrée *in vitro*. En effet, OPN est capable d'inhiber la croissance de dépôts d'hydroxyapatite dans les cultures de CMLVs <sup>218</sup>. Dans un modèle animal de calcification artérielle médiale, le modèle warfarine-vitamine K, on observe l'expression de l'OPN uniquement au niveau des sites de calcification <sup>219</sup>. Il semble que la protéine s'accumule à la frontière entre les CMLVs et les dépôts d'hydroxyapatite. De plus, des changements phénotypiques ont été mis en évidence dans des études *in vitro* avec des cellules animales et humaines et *in vivo* avec des modèles animaux de calcification <sup>219-221</sup>. Mais qu'en est-il chez l'homme ? Les artères présentant de la calcification artérielle médiale montrent une diminution des niveaux d'expression de la MGP par rapport à des artères saines <sup>222</sup>. Cependant, l'expression de la phosphatase alcaline, de la BSP et de la *bone Gla protein* (BGP ou ostéocalcine) est augmentée dans ce même contexte <sup>222</sup>. Ces protéines sont habituellement exprimées de façon importante au niveau des os. La BSP est impliquée dans

la formation osseuse car elle induit la nucléation de l'hydroxyapatite. La phosphatase alcaline est exprimée dans plusieurs tissus mais, son expression est marquée dans les ostéoblastes. Elle catalyse l'hydrolyse de monophosphate d'esters comme le  $\beta$ -glycérophosphate. Les phosphates libérés sont alors incorporés dans les cristaux d'hydroxyapatite. Enfin, l'ostéocalcine est une protéine matricielle exprimée par les ostéoblastes et un marqueur du remodelage osseux. Donc, ces changements phénotypiques, surtout observés pour les CMLVs, démontrent que la calcification artérielle médiale est un processus complexe fortement régulé.

Notons que la dégradation de la matrice peut aussi contribuer aux changements phénotypiques des CMLVs grâce à la libération de TGF- $\beta$  et de peptides solubles de l'élastine. Simionescu et al ont démontré que la stimulation des CMLVs in vitro par des peptides solubles de l'élastine et TGF- $\beta_1$  induisaient la synthèse de protéines osseuses<sup>223</sup>. De plus, TGF- $\beta$  favorise la calcification in vitro de CMLVs aortiques avec un phénotype ostéogénique<sup>224</sup>.

### **1.3.3. Hypertension systolique isolée**

#### **a. Rigidité vasculaire et hypertension systolique isolée**

Tel que décrit auparavant, plusieurs phénomènes modifient la paroi vasculaire au cours du vieillissement. On observe une diminution de la proportion d'élastine, sa fragmentation, l'augmentation de la proportion des collagènes. La charge mécanique est transférée de l'élastine au collagène qui est 100 à 1000 fois plus rigide que l'élastine. En outre, la multiplication des pontages, la fixation du calcium à l'élastine et l'accroissement du tonus vasculaire participent à l'augmentation de la rigidité artérielle. Mais pourquoi l'augmentation de rigidité se traduit-elle par une hypertension systolique isolée ?

En raison de l'augmentation de la rigidité artérielle, l'impédance aortique augmente ce qui provoque, au moment de l'éjection du sang par le ventricule gauche, une augmentation de la pression systolique. De plus, l'éjection du bolus durant la systole

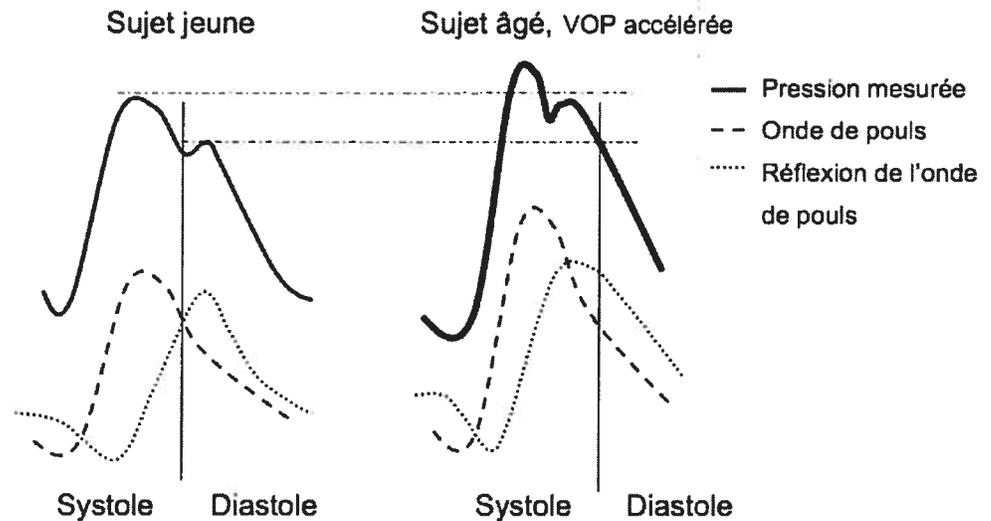
produit une onde le long de la paroi vasculaire. Cette onde se déplace à une certaine vitesse appelée vitesse de l'onde de pouls (VOP). Cette vitesse dépend de la rigidité, de l'épaisseur et du rayon du vaisseau, et de la viscosité du sang.

$$VOP = (Eh/2\rho r)^{1/2}$$

E module élastique représente la rigidité de la paroi, h épaisseur de la paroi,  $\rho$  viscosité du sang, r rayon interne du vaisseau. Équation de Moens-Korteweg.

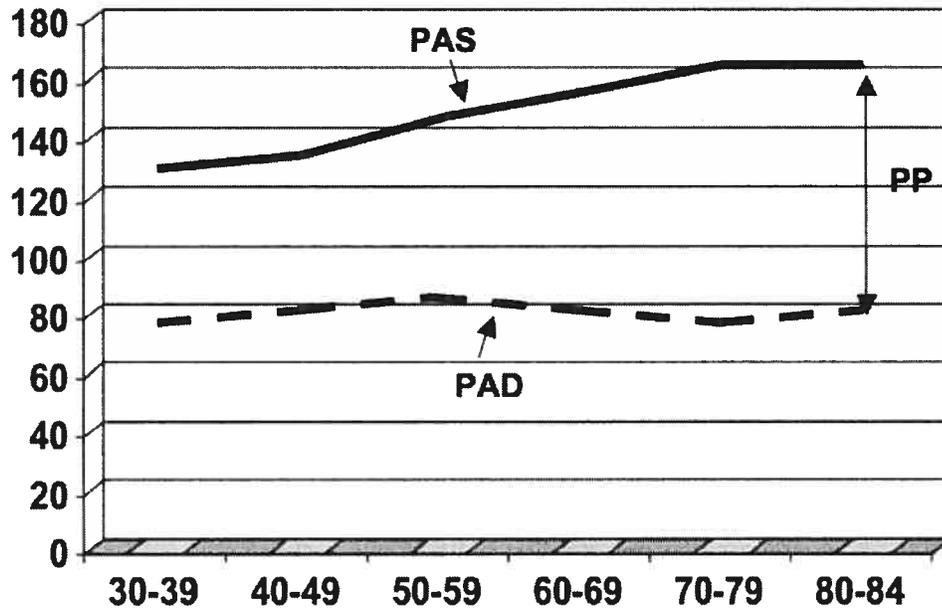
Lorsque l'onde de pouls générée par le cœur rencontre une résistance, elle produit une autre onde en sens inverse. La réflexion de l'onde de pouls survient physiologiquement le long de l'arbre vasculaire. En effet, plus on s'éloigne du cœur plus la paroi vasculaire est rigide en raison de la présence accrue du collagène et plus le diamètre des artères diminue. Chez les sujets jeunes, la réflexion de l'onde de pouls survient au moment de la diastole car l'onde de pouls se déplace lentement (l'aorte est compliant). Par contre, chez un sujet âgé où l'aorte est rigide et la VOP élevée, l'onde réfléchie arrive en même temps que la systole. Ceci se traduit par une diminution de la pression diastolique et une augmentation de la pression systolique due à la réflexion de l'onde de pouls et à l'accroissement de l'impédance aortique (Figure 18). On observe donc une augmentation de la pression pulsée (différence entre la pression systolique et la pression diastolique).

Figure 18. Réflexion de l'onde de pouls, impact sur la pression artérielle mesurée.



Lorsque la pression systolique dépasse 140 mmHg avec une pression diastolique inférieure à 90 mmHg, il y a hypertension systolique isolée. C'est la forme la plus courante d'hypertension artérielle essentielle chez les patients âgés de plus de 65 ans. Elle touche environ 65 % de ce groupe d'âge <sup>225</sup>. À partir de la cohorte de patients de l'étude Framingham, Franklin et al. ont dressé un portrait de l'évolution de la pression systolique et diastolique avec l'âge. Ils ont observé une augmentation progressive de la pression artérielle systolique et une diminution tardive de la pression artérielle diastolique (après 50 à 60 ans) <sup>226</sup> (Figure 19).

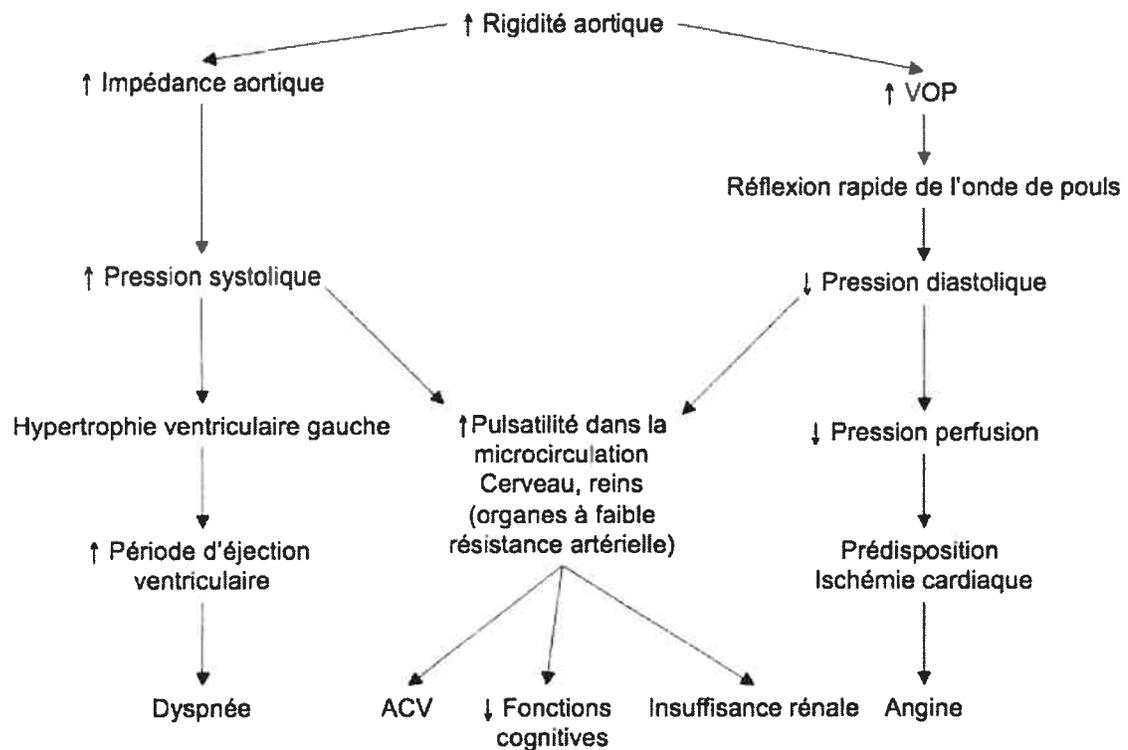
Figure 19. Distribution de la pression artérielle en fonction de l'âge.



Quelles sont les conséquences de ces modifications des pressions artérielle ?

Les conséquences cardiaques de l'augmentation de la rigidité artérielle et, par conséquent, des modifications des pressions artérielles sont exposées dans la figure suivante.

Figure 20. Conséquences de l'augmentation de la rigidité aortique.



VOP : vitesse de l'onde de pouls, ACV : accident cérébrovasculaire. D'après <sup>227</sup>.

Notons que l'hypertrophie ventriculaire gauche, en augmentant la demande en O<sub>2</sub> du cœur, participe à l'ischémie cardiaque. La prolongation de la période d'éjection en fait de même. De plus, l'ischémie cardiaque induit un allongement de la période d'éjection.

L'augmentation de la rigidité artérielle est significativement associée avec le risque de mortalité <sup>228</sup>. Hormis le cœur, deux autres organes sont particulièrement touchés par l'augmentation de la pression pulsée : le cerveau et les reins. L'augmentation de la pulsativité de la pression a peu d'effet sur la plupart des organes car les cellules et les capillaires sont protégés par la vasoconstriction des artères et des artérioles en amont. Cependant, le système vasculaire en amont du cerveau et des reins offrent une faible résistance à ces variations de pressions <sup>229</sup>. Cette faible résistance permet d'accroître les débits sanguins. Ainsi, Le cerveau et les reins sont perfusés en permanence par des débits sanguins élevés afin de nourrir les cellules cérébrales et d'assurer une bonne filtration du

sang. Selon les travaux de Byrom, l'augmentation des étirements pulsatiles est à l'origine d'artériosclérose, de nécroses et d'anévrysmes au niveau des artères cérébrales de rats hypertendus<sup>230</sup>. Ceci pourrait expliquer que l'augmentation de rigidité vasculaire soit un prédicteur des accidents vasculaires cérébraux<sup>231</sup> et de la diminution des fonctions cognitives<sup>232</sup>. Au niveau rénal, on observe une association entre la PP et la microalbuminurie<sup>233</sup> ainsi que la diminution de la fonction glomérulaire<sup>234</sup>. Ces complications rénales pourraient aussi être liées à une détérioration des artères rénales par l'augmentation des étirements pulsatiles.

#### **b. Comment traiter l'hypertension systolique isolée ?**

La plupart des antihypertenseurs actuellement sur le marché réduisent la pression artérielle en diminuant la résistance vasculaire périphérique. Le traitement de l'hypertension systolique isolée comprend l'utilisation de diurétiques, d'antagonistes de canaux calciques, d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) et d'antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA). Ces médicaments ont permis une réduction de la mortalité et de la morbidité dans le contexte d'une hypertension systolique isolée dans les études SHEP<sup>235</sup> et SYST-EUR<sup>236</sup>. En plus de provoquer une vasodilatation qui améliore la compliance artérielle<sup>237</sup>, ils présentent des propriétés spécifiques potentiellement intéressantes pour le traitement de l'hypertension systolique isolée. En fait, il a été montré que les diurétiques antagonistes des récepteurs à l'aldostérone, les IECA et les ARA prévenaient l'apparition de la fibrose artérielle chez le rat. En outre, les IECA et les ARA peuvent renverser la fibrose cardiaque et vasculaire<sup>214</sup>. Dans un modèle animal d'hypertension systolique isolée associée à une calcification artérielle médiale, Dao et al ont montré qu'un traitement avec un antagoniste des récepteurs ET<sub>A</sub> (darusentan) ou un ARA (irbésartan) ou un diurétique (hydrochlorothiazide) prévenait la calcification artérielle médiale et l'élévation du ratio collagène élastine. De plus, ces médicaments permettaient aussi une régression de ce ratio tandis que seul le darusentan régressait la calcification artérielle médiale<sup>238</sup>. Comme le NO joue un rôle important dans le tonus de la paroi artérielle, les nitrates pourraient être utilisés dans le traitement de l'hypertension systolique

isolée. Le mono et le dinitrate d'isosorbide permettent de réduire la pression systolique et la pression pulsée dans l'hypertension systolique isolée<sup>239, 240</sup>. Enfin, les biphosphonates, inhibiteurs de la résorption osseuse, préviennent la calcification vasculaire chez l'animal<sup>241</sup>. Une étude récente chez des patients diabétiques a démontré que l'etidronate, un biphosphonate, limitait la calcification vasculaire<sup>242</sup>.

### **c. Comment mesurer la rigidité vasculaire ?**

Les méthodes invasives utilisées en expérimentation animale pour mesurer la rigidité vasculaire ne peuvent être utilisées en clinique. Il faut donc mesurer des paramètres substitutifs liés à la rigidité vasculaire. Pour cela, on peut étudier plusieurs indices : la vitesse de l'onde de pouls (VOP), la pression pulsée, l'estimation de la rigidité en utilisant des mesures de diamètre et de la pression dilatant le vaisseau. Pour ce dernier indice, on a recours à plusieurs paramètres : la distensibilité artérielle, la compliance artérielle et le module élastique. Le tableau suivant regroupe les différents paramètres permettant d'évaluer la rigidité artérielle<sup>243-245</sup>.

Tableau 8. Paramètres permettant d'évaluer la rigidité artérielle.

Paramètre	Définition
Vitesse de l'onde de pouls	Vitesse de parcours de l'onde de pression le long d'un segment artériel défini $VOP = \text{distance}/\Delta\text{temps}$
Pression pulsée (PP)	Différence de pression entre la pression systolique (PAS) et la pression diastolique (PAD) $PP = PAS - PAD$
Index d'augmentation (AIx)	Proportion de la pression pulsée résultant de la réflexion de l'onde de pouls.
Indice de rigidité $\beta$	Rapport entre la pression et le changement relatif de diamètre $\beta = [\ln (PAS/PAD)] / [(D_{\text{sys}} - D_{\text{dias}}) / D_{\text{dias}}]$
Compliance artérielle (CA)	Ratio du changement de diamètre causé par un changement de pression donné $CA = \Delta D / \Delta P$
Compliance artérielle systémique (CAS)	Relation entre le volume d'éjection systolique (VS) et la pression pulsée $CAS = VS / PP$
Distensibilité artérielle (DA)	Relation entre la fraction de changement de compliance et le changement de diamètre correspondant $DA = CA / D \text{ ou } DA = \Delta D / (\Delta P \times D)$
Module élastique (E)	Propriétés élastiques de la paroi artérielle. Ratio de la déformation du vaisseau et de la force requise pour la produire $E = (\Delta P \times V) / (\Delta V \times h)$

P : pression, D : diamètre, V : volume, h : épaisseur de la paroi, sys : systolique, dias : diastolique.

La majorité de ces paramètres sont mesurées de façon non-invasive en utilisant des techniques d'écho-doppler pour les diamètres, volumes et épaisseur de paroi. Les pressions sont mesurées par tonométrie. Notons que pour le calcul de la pression pulsée, la prise de pressions brachiales grâce au sphyngomanomètre peut être utilisée. Ces paramètres présentent certaines limites dans l'exécution de la méthode de mesure ou dans l'interprétation des résultats obtenus. Par exemple, la mesure non-invasive de la VOP présente plusieurs difficultés : la mesure de l'onde de pouls en transcutané (carotide-fémorale), l'estimation de temps d'arrivée de l'onde au deuxième point et l'évaluation de la distance entre les deux points. Par ailleurs, la mesure de la compliance artérielle pose un problème pour la comparaison des résultats entre des vaisseaux de diamètres différents.

#### **1.3.4. Modèles animaux**

Plusieurs modèles animaux sont disponibles pour étudier le vieillissement et la calcification artérielle médiale qui lui est reliée.

Le modèle le plus proche de la physiologie humaine est le vieillissement chez l'animal. Une étude menée par Kieffer et al a permis de montrer que différentes souches de rats soit les rats Wistar, les rats Fischer 344 et les rats Wistar Kyoto, présentaient une augmentation du calcium dans les parois artérielles avec un vieillissement de 12 à 18 mois. Durant le même laps de temps, une augmentation d'environ 29 mmHg de la pression artérielle systolique a été rapportée. Dans les organes, la calcification n'a pas augmentée avec l'âge<sup>246</sup>. Donc, le vieillissement chez l'animal semble constituer un modèle fidèle pour étudier les modifications vasculaires induites par le vieillissement.

**a. Souris modifiées génétiquement**

*i Déficience en MGP*

La *matrix Gla protein* (MGP) est une protéine exprimée dans différents tissus dont l'os et la paroi vasculaire (CMLVs). Elle inhibe la calcification vasculaire. Toutefois, le mécanisme exact impliqué dans cette inhibition n'est pas encore connu. La MGP est capable de lier les ions calcium et les cristaux d'hydroxyapatite. En outre, elle peut lier la BMP-2 et l'élastine ce qui préviendrait une ostéoinduction par la BMP-2 et la fixation du calcium sur l'élastine <sup>247</sup>. Les souris déficientes en MGP ne montrent pas de changement phénotypique durant les deux premières semaines de vie. Toutefois, après deux semaines, elles développent une calcification extensive de l'aorte, des carotides et des artères fémorales. La calcification constituée de cristaux d'hydroxyapatite affecte toutes les artères élastiques et musculaires. Cette calcification est surtout localisée au niveau de la média des vaisseaux. En outre, la présence de cellules avec des phénotypes de chondrocytes (cellules impliquées dans la production et le maintien de la matrice du cartilage) est observée dans la MEC des artères. Les souris déficientes en MGP meurent d'hémorragie en raison d'une rupture de l'aorte thoracique ou abdominale devenue totalement rigide <sup>215</sup>.

*ii Déficiences combinées en MGP et OPN*

L'ostéopontine (OPN) est une protéine capable de se lier aux cristaux d'hydroxyapatite et d'inhiber leur croissance. Elle est localisée à la surface des zones calcifiées au niveau des artères <sup>222</sup>. En outre, elle bloque la calcification des CMLVs *in vitro* <sup>218</sup>. Bien que les souris déficientes en OPN présentent une calcification osseuse plus importante <sup>217</sup>, elles ne présentent pas de calcification vasculaire. Ceci peut s'expliquer par une absence d'expression d'OPN dans les vaisseaux normaux. Les souris déficientes en MGP et OPN présentent une calcification vasculaire plus importante encore que celle observée chez les souris déficientes en MGP seulement <sup>248</sup>.

**b. Traitements induisant la calcification artérielle médiale**

*i Chlorure de calcium*

Il s'agit d'une application périvasculaire de chlorure de calcium (0,2 mol/L) au niveau de la paroi externe de l'aorte abdominale. Ce traitement provoque une augmentation majeure de la quantité de calcium dans la paroi vasculaire (20 à 40 fois) et une calcification médiale, au niveau des fibres élastiques. Ce traitement s'accompagne d'une dégradation de la matrice extracellulaire, en particulier de l'élastine<sup>184</sup>. Ces manifestations apparaissent 7 jours après le traitement. Elles semblent dues à une surcharge en calcium que les mécanismes anticalcifians du vaisseau sont incapables de contrer.

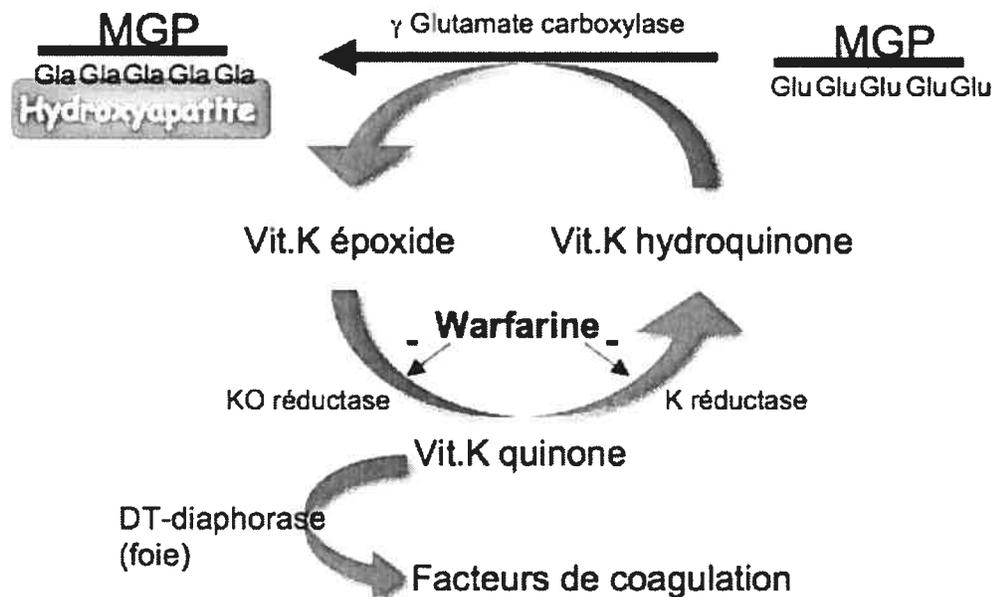
*ii Vitamine D et nicotine*

Le traitement vitamine D<sub>3</sub> et nicotine (VDN) consiste en une injection de vitamine D (300 000 IU/kg) suivie de deux injections de nicotine espacées de 9 heures (25 mg/kg). Ce traitement provoque une augmentation du calcium aortique de 10 à 40 fois. Ce calcium se dépose surtout sur les fibres élastiques de la média. Ceci s'accompagne d'une augmentation de la pression systolique et de la rigidité vasculaire<sup>186, 249</sup>. Cette calcification médiale serait due à la capacité de la nicotine d'induire une augmentation du calcium intracellulaire (vasoconstriction) et de la production de catécholamines. En effet, il semble que l'épinéphrine favorise la calcification aortique<sup>250</sup>. En outre, la vitamine D<sub>3</sub> provoquerait une calcification des CMLVs in vitro et une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline en diminuant le peptide relié à l'hormone parathyroïde<sup>251</sup>. Dans le modèle VDN, la calcification ne se limite pas aux vaisseaux. On trouve une augmentation du contenu en calcium du myocarde et des reins<sup>246</sup>.

iii *Warfarine et vitamine K*

Ce modèle est lui aussi basé sur la MGP. Il s'agit cette fois d'empêcher sa maturation bloquant ainsi sa capacité de fixation du calcium. La MGP mature contient 5 résidus acide  $\gamma$ -carboxyglutamique qui proviennent de la  $\gamma$ -carboxylation de résidus d'acide glutamique par la  $\gamma$ -glutamate-carboxylase. Cette enzyme utilise la vitamine K comme cofacteur. Le traitement avec la warfarine bloque le recyclage de la vitamine K en inhibant la vitamine K époxide reductase (VKOR) et la vitamine K réductase (VKR). Ainsi, la vitamine K hydroquinone ou vitamine K<sub>1</sub>, nécessaire à la  $\gamma$ -glutamate-carboxylase, ne se forme pas. Donc, la maturation de la MGP n'a pas lieu ce qui inhibe son activité anti-calcifiante<sup>252</sup> (Figure 21).

Figure 21. Schéma représentant l'effet de la warfarine sur la maturation de la MGP.



L'équipe de Paul Price est la première à avoir développé ce modèle de calcification vasculaire associée à une calcification des valves cardiaques<sup>253</sup>. Mais, la warfarine bloque aussi la maturation des facteurs de coagulation (Gla-protéines) dans le foie, provoquant ainsi des hémorragies. En fournissant aux rats de la vitamine K phytonadione, l'effet de la warfarine sur la maturation des facteurs de coagulation est contourné. En effet, le foie

possède une enzyme capable de réduire la vitamine K phytonadione en vitamine K hydroquinone. Cette enzyme, la DT-diaphorase, est 100 fois plus active dans le foie que dans les artères ce qui explique que l'ajout de vitamine K phytonadione n'empêche pas la calcification artérielle médiale <sup>254</sup>. Nous avons adapté le modèle original de l'équipe de Paul Price qui impliquait deux injections par jour de warfarine et une injection de vitamine K<sub>1</sub>. La warfarine est administrée dans l'eau de boisson et la vitamine K<sub>1</sub> est injectée tous les deux jours. On observe après 4 semaines de traitement une calcification des lamelles élastiques médiales au niveau des artères élastiques et des artères musculaire (aorte, carotides et artères fémorales) <sup>171</sup>. L'augmentation du contenu en calcium est de l'ordre de 5 fois au niveau de l'aorte et de 40 fois au niveau des carotides et des artères fémorales. Elle s'accompagne d'une rigidité des artères (augmentation de la VOP) et d'une HSI.

Notons que trois polymorphismes de la MGP (A-7, Ala 83 et 138) sont plus présents chez les patients avec une calcification vasculaire <sup>255, 256</sup>. Ceci supporte le rôle de la MGP dans la calcification artérielle médiale et corrobore l'utilisation de modèles modifiant la MGP pour en étudier les déterminants et les conséquences.

### c. Comparaison des différents modèles

Tableau 9. Avantages et inconvénients de différents modèles animaux de calcification artérielle médiale et de vieillissement vasculaire.

Modèle	Avantages	Inconvénients
Vieillessement	Physiologique	Peu flexible et coûteux
MGP <sup>-/-</sup>	Mécanisme spécifique	Calcification exagérée
MGP <sup>-/-</sup> et OPN <sup>-/-</sup>	Mécanisme spécifique	Calcification exagérée
CaCl <sub>2</sub>	Rapide	Mécanisme non-spécifique  Lien avec la pathologie humaine incertain
VDN	Flexible (études de prévention et de régression)	Mécanisme non-spécifique  Lien avec la pathologie humaine incertain
WVK	Flexible  Mécanisme endogène	Métabolisme de la warfarine par le CYP 2C9, cytochrome utilisé pour dde nombreuses molécules

Il est également possible d'utiliser des modèles *in vitro* pour étudier la calcification artérielle médiale. Plusieurs équipes ont établi des modèles de calcification des CMLVs en augmentant les concentrations en phosphate inorganique dans le milieu de culture <sup>257, 258</sup>.

La formation de cristaux d'hydroxyapatite est observée au niveau de la MEC synthétisée par les cellules. Ces modèles permettent d'étudier des mécanismes moléculaires de la calcification. Cependant, l'effet des autres composés de la paroi vasculaire (cellules et macromolécules de la MEC) et l'impact sur les paramètres hémodynamiques ne peuvent être évalués.

Le vieillissement vasculaire et son incidence sur l'apparition de maladies cardiovasculaire peuvent être accélérés et accentués en présence d'insuffisance rénale chronique et de diabète.

#### **1.4. Diabète et vieillissement vasculaire**

Plusieurs études ont montré que la rigidité des artères de gros calibre, prémice de pathologies cardiovasculaires, était accrue chez les patients diabétiques de type 1 ou de type 2 <sup>259-261</sup>. Cette augmentation de la rigidité est liée à la durée du diabète, à sa sévérité et à la présence de neuropathie <sup>262, 260</sup>. D'après l'étude menée par Wahlqvist et al, la glycémie tout comme l'âge serait un prédicteur important de la rigidité vasculaire <sup>263</sup>. En 2003, Cameron et al ont montré que l'accroissement de la rigidité semblait survenir plus rapidement et plus tôt chez les patients diabétiques que chez les patients non-diabétiques. En effet, les valeurs de VOP pointaient un âge biologique de 75 ans (établi grâce aux paramètres des patients non-diabétiques) pour des patients diabétiques qui n'en avait que 60 <sup>264</sup>. Bien avant les mesures de VOP ou de compliance artérielle, de nombreuses études sur la calcification artérielle, processus impliqué dans la rigidité vasculaire, ont montré les mêmes liens entre la durée, la sévérité du diabète, la neuropathie et la présence de calcification <sup>265-267</sup>. Par ailleurs, la calcification artérielle médiale est associée à une augmentation du taux de mortalité d'environ 1,5 fois chez les patients diabétiques <sup>267</sup>. C'est un important prédicteur de la mortalité d'origine cardiovasculaire (accidents vasculaires cérébraux, insuffisance cardiaque), plus importante que la calcification intimale <sup>268, 269</sup>. Enfin, elle est reliée à une augmentation de 5,5 fois des taux d'amputation chez les patients diabétiques <sup>267</sup>.

La rigidité et la calcification artérielles sont accrues chez les sujets diabétiques et même chez les sujets pré-diabétiques<sup>270</sup>. En outre, elles sont associées à une augmentation des complications cardiaques et vasculaires dont certaines sont spécifiques au diabète. Mais une question demeure.

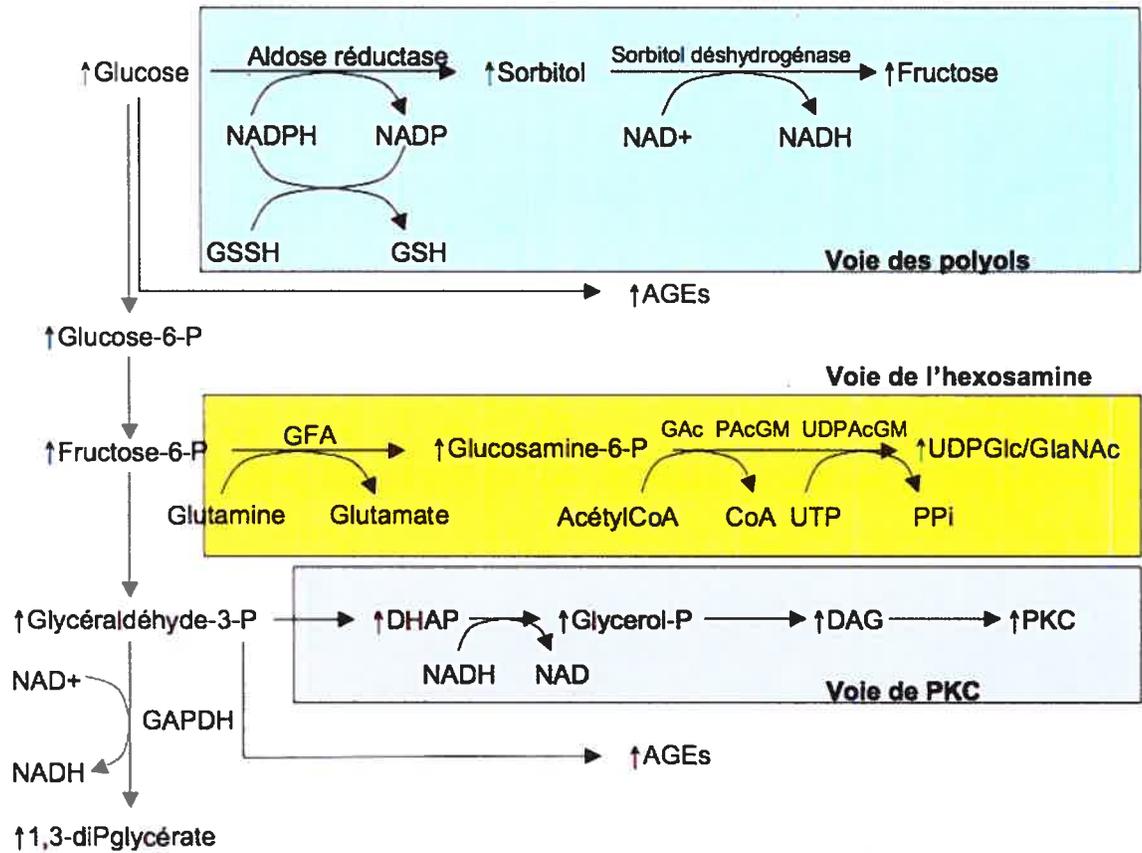
#### **1.4.1. Pourquoi le diabète favorise-t-il la rigidité vasculaire ?**

Plusieurs mécanismes sont avancés pour expliquer l'impact du diabète sur la rigidité vasculaire : une accumulation de macromolécules de la MEC, une dysfonction endothéliale et des modifications des CMLVs. Cette liste non-exhaustive regroupe les mécanismes les mieux connus jusqu'à présent.

##### **a. Accumulation et modifications des macromolécules de la matrice extracellulaire et calcification**

Plusieurs voies métaboliques ou biochimiques sont activées en présence d'hyperglycémie (Figure 20). Certaines participent à l'accumulation ou à la modification des macromolécules de la MEC. Parmi celles-ci, on trouve l'activation de la protéine kinase C, la voie de l'hexosamine et la formation des produits avancés de glycation (AGEs pour *advanced glycation end products*).

Figure 22. Voies chimiques et métaboliques activées lors de l'hyperglycémie.



NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme réduite, NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme oxydée, GSSH : glutathion oxydé, GSH : glutathion réduit, NAD<sup>+</sup> : nicotinamide adénine dinucléotide forme oxydée, NADH : nicotinamide adénine dinucléotide forme réduite, GFA : glucosamine-fructose-6P-aminotransférase, GAc : Glucosamine-6P-N-acétyltransférase, PAcGM : P-acétylglucosamine mutase, UDPAcGM : uridine diP-N-acétylglucosamine pryophosphorylase, DHAP : dihydroxyacétonéphosphate, DAG : diacylglycérol, PKC : phosphokinaseC, GAPDH : glycéraldéhyde-3P déshydrogénase, AGEs : advanced glycation end-products, AcétylCoA : AcétylCoenzyme A, CoA : Coenzyme A, UDPGlc/GlaNAc : uridine diphosphate N-acétylglucosamine/galactosamine.

*i Activation de la protéine kinase C*

L'activation de la protéine kinase C (PKC) par l'hyperglycémie contribue à l'accumulation de la MEC. En effet, on observe une augmentation de l'expression de TGF- $\beta$ , de la fibronectine et du collagène de type IV grâce à l'activation de PKC, en présence d'hyperglycémie *in vitro*<sup>271</sup> ou de diabète *in vivo*<sup>272</sup>. Rasmussen et al ont montré une accumulation significative de fibronectine dans l'aorte de patients diabétiques (type 1 et type 2) par rapport aux niveaux retrouvés chez des patients non-diabétiques<sup>273</sup>. En outre, l'activation de PKC par l'hyperglycémie est impliquée dans la surexpression de PAI-1<sup>274</sup> ce qui contribue à l'accumulation de la MEC en diminuant sa dégradation.

*ii Voie de l'hexosamine*

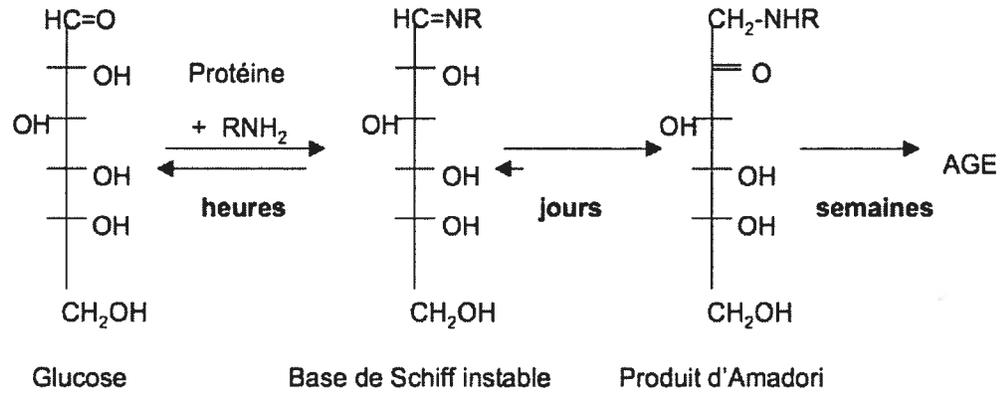
Dans cette voie mineure de glycolyse, une partie du fructose-6-phosphate est utilisée pour former de l'uridine diphosphate N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc), de l'UDP-N-acétylgalactosamine (UDP-GlaNAc) et de l'acide sialique cytidine monophosphate (CMP-sialic acid)<sup>275</sup>. Ces composés sont essentiels à la formation des structures glucidiques des protéoglycanes, les glycosaminoglycanes (GAG). Le GlcNAc est aussi impliqué dans la modification de protéines n'appartenant pas aux protéoglycanes. En effet, on observe une O-GlcNAcylation au niveau des résidus sérine et thréonine de protéines comme des facteurs de transcription Sp1. Ce dernier favorise la transcription de PAI-1<sup>276</sup>. La voie des hexosamines stimule également la synthèse de TGF- $\beta$  en présence d'hyperglycémie<sup>277</sup>. Ce facteur de croissance est responsable de l'augmentation de la synthèse de fibronectine et de laminine induite par une hyperglycémie. Notons que TGF- $\beta$  régule l'expression de certains gènes associés à la fibrose en interagissant avec le facteur de transcription Sp1<sup>278</sup>.

*iii Produits avancés de glycation*

La formation des produits avancés de glycation est le résultat d'une glycation non-enzymatique de protéines, de lipides et de groupes d'acides nucléiques. Il s'agit d'une suite

de réactions qui se produisent sur plusieurs semaines (plus rapidement dans le milieu intracellulaire). L'ensemble des réactions permettant la formation des AGEs s'appellent aussi la réaction de Maillard (Figure 23). Cette réaction commence par la formation d'une base de Schiff, résultat de la réaction du groupement carbonyle d'un sucre réducteur avec le groupement amine d'une protéine (ou d'un lipide ou d'ADN). La base de Schiff étant un produit instable, elle subit un réarrangement d'Amadori donnant un 1-amino-1-deoxyketose. Ce produit d'Amadori, formé sur plusieurs jours, est beaucoup plus stable que la base de Schiff. En outre, la réaction inverse étant plus lente, le produit d'Amadori a tendance à s'accumuler. Il peut aussi se former au cours de cette réorganisation des  $\alpha$ -dicarbonyles ou  $\alpha$ -oxoaldéhydes, tels que le glyoxal. Ces produits, tout comme les produits d'Amadori, forment des AGEs après quelques semaines. Contrairement aux produits précédents, le produit avancé de glycation est une étape ultime quasi irréversible. Au cours du réarrangement, certains composés, comme la carboxyméthyllysine ou la pentosidine, subissent une oxydation, catalysée par des ions métalliques. Par ailleurs, certains AGEs, comme la pentosidine, sont fluorescents. Enfin, en interagissant avec plusieurs acides aminés, les composés forment des liaisons covalentes entre les protéines<sup>279-281</sup>. Tous les acides aminés peuvent être impliqués dans la réaction de Maillard. Cependant, les acides aminés comportant plusieurs groupements amines comme la lysine réagissent plus facilement. Par ailleurs, tous les sucres réducteurs ne réagissent pas de la même façon. Le glucose, par exemple, est moins réactif que le fructose expliquant la glycation intracellulaire plus rapide. La glycation peut toucher toutes les protéines mais, les protéines avec une longue durée de vie y sont plus susceptibles.

Figure 23. Réaction de Maillard ou la formation des AGEs.



Sims et al ont montré que la présence de AGEs était corrélée avec l'augmentation de la rigidité de l'aorte chez des patients diabétiques <sup>282</sup>. En outre, la glycation du collagène provoque l'expansion de sa structure tri-dimensionnelle <sup>283</sup>. Une modification de cette structure peut accroître sa rigidité. Les AGEs agissent aussi à d'autres niveaux. Premièrement, les protéines intracellulaires modifiées par les AGEs présentent une modification de leur fonction et les AGEs peuvent aussi se former sur l'ADN modifiant l'expression de plusieurs protéines. Deuxièmement, les composés de la matrice extracellulaire, modifiés par les AGEs, interagissent de façon anormale avec les autres composés de la MEC et avec leurs récepteurs (intégrines) <sup>191</sup>. La formation des AGEs sur la laminine diminue sa liaison avec le collagène de type IV <sup>284</sup> et inhibe l'adhésion des CEs <sup>285</sup>. Par ailleurs, la glycation diminue la susceptibilité du collagène à être dégradé par les MMPs <sup>286</sup>. Troisièmement, les AGEs se lient à leurs récepteurs ce qui provoque l'activation de différentes cascades de signalisation. On dénombre six récepteurs des AGEs : AGE-R1 (oligosaccharyl-transférase-48), AGE-R2 (80K-H phosphoprotéine), AGE-R3 (galectine-3), les *macrophage scavenger receptor* type I et II et le récepteur des AGEs RAGE. Ils sont exprimés par de nombreuses cellules dont les CMLVs, les CEs, les macrophages <sup>280</sup>. RAGE est un récepteur de la superfamille des immunoglobulines et est le plus étudié. Son expression est augmentée dans les tissus cardiovasculaires de rats diabétiques <sup>287</sup>. Par ailleurs, il est associé à plusieurs cascades de signalisation incluant p21ras, MAPkinases, ERK1/2 et p38. Celles-ci produisent l'activation et la translocation de facteurs de

transcription dont NF- $\kappa$ B<sup>288</sup>. La liaison AGE-RAGE permet la synthèse de TGF- $\beta$  grâce aux voies ERK1/2 et p38, ce qui stimule la production de collagène<sup>289</sup>. La glycation provoque aussi l'augmentation de la synthèse du collagène de type III, du collagène de type IV, de la laminine et de la fibronectine via TGF- $\beta$ <sup>290, 291</sup>.

#### *iv*                    *Calcification*

L'hyperglycémie influence l'expression de nombreuses protéines ce qui favorise la calcification. Comme mentionné précédemment, la fibronectine s'accumule en présence d'hyperglycémie. Ceci n'a pas pour seule conséquence l'augmentation de la matrice extracellulaire par l'accumulation d'un de ses composés. En effet, la fibronectine agit directement sur les cellules en favorisant la calcification des cellules vasculaires<sup>292</sup> et en accélérant le passage d'un phénotype contractile à un phénotype synthétique des CMLVs en culture<sup>293</sup>. Par ailleurs, la glycation de l'élastine semble reliée à une augmentation de sa calcification in vitro<sup>294</sup> et dans l'aorte de rats diabétiques<sup>295</sup>.

L'effet direct de l'insuline sur la calcification est controversé. En effet, deux études in vitro, parues en 2007, montrent que l'insuline atténue la calcification des CMLVs pour l'une<sup>296</sup> et qu'elle l'accélère pour l'autre<sup>297</sup>.

### **b.                    Dysfonction endothéliale**

#### *i*                    *Rôle de l'hyperglycémie*

L'hyperglycémie aiguë produit une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium, même chez les sujets non-diabétiques<sup>298, 299</sup>. Cette dysfonction serait reliée à la formation de radicaux libres. En effet, en présence d'une augmentation du glucose dans le milieu de culture, les CE accroissent leur production d'espèces réactives de l'oxygène, en particulier de l'anion superoxide. Cet accroissement impliquerait la chaîne respiratoire mitochondriale<sup>300</sup>. En outre, les effets aigus de l'hyperglycémie sur la fonction endothéliale sont contre-balançés par l'utilisation d'antioxydants aussi bien in vivo<sup>301</sup> que in vitro<sup>302</sup>.

La production d'anion superoxyde peut désactiver le NO et ainsi réduire la vasodilatation dépendante de l'endothélium. D'ailleurs, on observe une diminution de la disponibilité du NO en présence d'hyperglycémie <sup>303</sup>. Par ailleurs, l'augmentation du stress oxydatif produite par l'hyperglycémie transitoire pourrait aussi stimuler plusieurs voies habituellement activées par des hyperglycémies plus soutenues <sup>304</sup> : la voie des polyols, l'activation de PKC, la formation des AGEs.

La voie des polyols est normalement peu utilisée pour métaboliser le glucose. Le glucose y est converti en fructose. Dans un premier temps, le glucose est métabolisé en sorbitol par l'aldose réductase. Dans un second temps, le sorbitol est converti en fructose par la sorbitol deshydrogénase <sup>304</sup>. En présence d'hyperglycémie, cette voie est fortement stimulée <sup>305</sup>. Cameron et al ont mis en évidence l'implication de la voie des polyols dans la dysfonction endothéliale associée au diabète <sup>306</sup>. Le mécanisme exact reliant la voie des polyols et les modifications de contraction et de relaxation des artères en présence de diabète reste incertain. Toutefois, on sait que le sorbitol a tendance à s'accumuler dans les cellules ce qui augmente l'osmolarité intracellulaire <sup>307</sup>. Cette augmentation semble favoriser l'apoptose cellulaire. On observe en même temps une diminution de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite (NADPH), nécessaire à la synthèse de NO. Par ailleurs, la voie des polyols consomme du glutathion réduit (GSH) ce qui réduit les réserves anti-oxydantes <sup>308</sup>. Ceci participerait à la dysfonction endothéliale.

Comme nous l'avons vu précédemment, en présence d'hyperglycémie chronique, on observe la formation des AGEs. Les niveaux sériques de AGEs sont inversement reliés à la vasodilatation dépendante et indépendante de l'endothélium chez les patients diabétiques de type 2 <sup>309</sup>. Les AGEs désactivent le NO ce qui réduit la dilatation dépendante de l'endothélium <sup>310</sup>. En outre, ils diminuent l'activité de la NOS endothéliale, directement ou via leur récepteur <sup>281</sup>. L'interaction AGEs-RAGE aurait plusieurs autres implications dans la dysfonction endothéliale. En effet, elle provoquerait une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène en partie par l'activation de la NADPH oxydase <sup>311</sup> et la

régulation à la hausse du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Ce dernier augmente la transcription de plusieurs gènes dont celui de l'endothéline<sup>312</sup>.

Enfin, l'hyperglycémie provoque une augmentation des niveaux de diacylglycérol (DAG) ce qui conduit à l'activation de la protéine kinase C (PKC)<sup>313</sup>. De plus, l'hyperglycémie peut activer PKC indirectement grâce à la liaison des AGEs sur leur récepteur<sup>314</sup> et à l'augmentation de la voie des polyols<sup>315</sup>. D'ailleurs, l'inhibition de l'aldose reductase prévient les effets de l'activation de la PKC, en présence d'hyperglycémie<sup>316</sup>, et la dysfonction endothéliale induite par l'hyperglycémie est corrigée par l'inhibition de la PKC<sup>317</sup>. Selon quels mécanismes l'activation de la PKC induit une dysfonction endothéliale ? L'activation de PKC provoque la synthèse de la NAD(P)H oxydase qui contribue à l'augmentation du stress oxydatif<sup>318</sup>. On observe également une augmentation de l'expression de la NOS endothéliale et de la production de radicaux libres liées à PKC<sup>318</sup>. Cette augmentation du stress oxydatif peut être due à un découplage de la NOS endothéliale ou à une augmentation de la production de NO. En présence d'une surproduction d'anion superoxyde, le NO favorise la formation de peroxynitrite. Ce radical libre réagit avec les acides aminés dont la tyrosine pour former des résidus nitrotyrosine. On observe d'ailleurs une augmentation des niveaux plasmatiques de nitrotyrosine chez les patients diabétiques de type 2<sup>319</sup>. Notons que le peroxynitrite et la nitrotyrosine semblent favoriser l'apoptose ce qui pourrait contribuer à la dysfonction endothéliale<sup>320</sup>. En plus de modifier la production de NO, l'activation de PKC semble augmenter l'expression de l'endothéline qui est impliquée dans l'augmentation du tonus vasculaire et dans la calcification artérielle médiale<sup>321, 322</sup>.

Il semble que le stress oxydatif soit largement impliqué dans la dysfonction endothéliale liée à l'hyperglycémie. Ceriello et al ont montré que la normalisation de la glycémie et une diminution du stress oxydatif chez les diabétiques de type 1 permettent de restaurer la fonction endothéliale<sup>323</sup>. Toutefois, l'hyperglycémie n'est pas la seule cause de la dysfonction endothéliale observée chez les patients diabétiques.

*ii Rôle de la résistance à l'insuline et des lipides*

L'altération de la fonction endothéliale apparaît tôt dans l'évolution vers le diabète de type 2. En effet, elle est présente chez les patients atteints d'intolérance au glucose <sup>324</sup>. Dans ce cas, la dysfonction endothéliale ne peut être expliquée par l'hyperglycémie. En outre, la dysfonction endothéliale est plus importante chez les patients atteints de diabète de type 2 que de type 1, avec un niveau de glycémie similaire <sup>325</sup>. En condition physiologique, l'insuline stimule la production de NO. En cas de résistance à l'insuline, cet effet peut être diminué. Par ailleurs, Watts et al ont démontré que la vasodilatation dépendante de l'endothélium était inversement corrélée avec les concentrations élevées de triglycérides <sup>326</sup>. De plus, des niveaux d'acides gras libres élevés inhibent la production de NO dans les cellules endothéliales en culture <sup>327</sup>. Finalement, la présence de lipides oxydés favorisent la calcification des cellules vasculaires de façon temps et dose dépendants <sup>328</sup>. Donc des facteurs autres que l'hyperglycémie peuvent intervenir dans la dysfonction endothéliale liée au diabète : la résistance à l'insuline ou l'altération des lipides (propres au diabète de type 2).

**c. CMLVs et changements phénotypiques**

Par ailleurs, le vieillissement vasculaire s'accompagne de changements phénotypiques. Or, l'hyperglycémie provoque l'augmentation de l'expression de l'ostéopontine dans les CMLVs grâce à la voie de l'hexosamine et de la PKC <sup>329</sup>. En outre, le stress oxydatif peut augmenter la différenciation ostéoblastique de cellules vasculaires se traduisant par une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline et de la calcification <sup>330</sup>. Enfin, la présence de AGEs in vitro augmente les niveaux d'ARNm de la phosphatase alcaline et de l'ostéopontine. De plus, les AGEs accélèrent la calcification des péricytes <sup>331</sup>. Donc, le diabète augmente aussi les changements phénotypiques associés à la calcification et à la rigidité vasculaire.

### 1.4.2. Traitements

Même si tous les mécanismes reliés à l'accélération de l'augmentation de la rigidité vasculaire par le diabète ne sont pas bien compris, des interventions pharmacologiques ont été tentées.

Le stress oxydatif semble jouer un rôle important dans cette accélération. Cependant, les résultats obtenus avec les anti-oxydants sont mitigés. En effet, l'utilisation de la vitamine E chez des sujets diabétiques n'a pas amélioré la rigidité vasculaire malgré la restauration de la fonction endothéliale<sup>332</sup>. L'emploi de vitamine C a cependant permis une réduction de plusieurs paramètres de la rigidité vasculaire chez les patients diabétiques de type 2<sup>333</sup>. Cette observation a également été faite chez des sujets sains<sup>334</sup>. Toutefois, l'utilisation quotidienne d'antioxydants ne réduit pas le vieillissement vasculaire comme le montre l'étude SUVIMAX (supplémentation en vitamines et minéraux antioxydants). Cette étude randomisée, en double aveugle et avec un groupe recevant un placebo, a été menée sur 1162 patients apparemment en bonne santé durant 7,5 ans<sup>335</sup>. Donc il semble hasardeux de se fier aux antioxydants pour traiter la rigidité vasculaire.

Une autre avenue thérapeutique semble prometteuse : le traitement des AGEs. Il existe trois possibilités d'action sur les AGEs, empêcher leur formation avec les inhibiteurs des AGEs comme l'aminoguanidine ou la pyridoxamine, les détruire une fois formés avec les briseurs des AGEs comme l'ALT711 (alagebrium) et bloquer leurs récepteurs. L'aminoguanidine inhibe la formation des AGEs en réagissant avec les  $\alpha$ -dicarbonyles. C'est aussi un inhibiteur de NOS surtout de la forme inductible<sup>336</sup>. Vu son mode d'action, l'aminoguanidine, tout comme les autres inhibiteurs de AGEs, ne peut que prévenir ou limiter la progression des pathologies et non permettre de les traiter. Plusieurs études utilisant des modèles animaux de diabète ou de vieillissement ont montré un effet bénéfique de l'aminoguanidine au niveau vasculaire<sup>337</sup>. En effet, cet inhibiteur des AGEs améliore la compliance et l'élasticité artérielle et réduit l'accumulation de la MEC<sup>338</sup>. Les études cliniques utilisant l'aminoguanidine n'avaient pour but que d'évaluer son efficacité pour

retarder la progression de l'insuffisance rénale chez les patients diabétiques et non du vieillissement vasculaire<sup>339, 340</sup>. Cependant, les résultats ont été peu concluants. La pyridoxamine, isoforme de la vitamine B6, semble être meilleure que l'aminoguanidine pour retarder le développement de l'insuffisance rénale chez le rat diabétique<sup>341</sup>. Elle inhibe la conversion des produits d'Amadori en liant les ions métalliques qui catalysent la réaction<sup>342</sup>. Au niveau vasculaire, elle diminue l'hypertension et l'épaisseur de la paroi dans un modèle animal de syndrome métabolique<sup>343</sup> mais, aucune étude ne montre de résultats sur des mesures de rigidité artérielle. Enfin, les briseurs de AGEs semblent les molécules les plus prometteuses dans cette voie thérapeutique. L'ALT711 réagit et détruit le lien covalent constitué par les AGEs entre les protéines<sup>344</sup>. Dans un modèle expérimental de diabète de type 1, l'ALT711 régresse l'augmentation de rigidité vasculaire au niveau aortique et carotidien et améliore la solubilité du collagène<sup>345</sup>. Des études cliniques sur des patients âgés présentant une hypertension systolique isolée et, pour 25% d'entre eux un diabète, ont montré que l'ALT711 améliorait la compliance artérielle<sup>346</sup> et la fonction endothéliale<sup>347</sup>. En outre, le traitement a permis une diminution des niveaux sériques de TGF- $\beta$  et de marqueurs de synthèse du collagène<sup>347</sup>.

Finalement, les bloqueurs des RAGEs, la forme soluble du récepteur ou un anticorps anti-RAGE, présentent aussi un intérêt. La forme soluble du récepteur (sRAGE) permet d'inhiber l'expression de TGF- $\beta$ , de la fibronectine et du collagène de type IV dans un modèle animal de diabète<sup>348</sup>. En outre, sRAGE est capable de supprimer l'accélération de l'athérosclérose par le diabète<sup>349</sup> et même de régresser l'athérosclérose<sup>350</sup>. Il n'y a pas encore d'étude concernant la rigidité vasculaire avec les bloqueurs des RAGEs.

### 1.4.3. Modèles animaux

En parcourant la littérature scientifique, on dénombre de nombreux modèles de diabète de type 1 et 2 surtout développés chez le rat ou la souris. Il existe deux sortes de modèles, les modèles de diabète induit chimiquement et les lignées d'animaux qui développent un diabète.

Dans les modèles expérimentaux, le diabète est induit par une injection de streptozotocine ou d'alloxan. Ces deux composés détruisent les cellules  $\beta$  du pancréas. L'alloxan exerce son effet diabétogène à une dose unique d'environ 40 à 65 mg/kg en injection intra-veineuse et 2 à 3 fois plus en injection intra-péritonéale chez le rat. Dans un premier temps, l'alloxan est capté rapidement par les cellules  $\beta$ . Puis, il est réduit par différents agents réducteurs dont des composés contenant un groupement thiol (-SH) <sup>351</sup>. L'acide dialurique ainsi formé est ensuite oxydé pour reformer l'alloxan. Ce cycle redox permet de former des radicaux superoxydes et un radical alloxan. Ces espèces radicalaires libèrent l'ion ferrique de la ferritine et le réduisent en ion ferreux. Ce dernier participe à la formation du radical hydroxyl, très réactif <sup>352</sup>. Ces espèces réactives de l'oxygène causent des dommages dans les cellules  $\beta$  du pancréas. Une des cibles des espèces réactives de l'oxygène est l'ADN qu'elles endommagent. Ceci stimule la poly ADP-ribosylation. Ce procédé diminue le  $\text{NAD}^+$  cellulaire et l'ATP favorisant l'inhibition de la synthèse et de la sécrétion de l'insuline <sup>353</sup>. L'alloxan perturbe aussi l'homéostasie du calcium intracellulaire <sup>354</sup>. Ceci provoquerait la libération d'une concentration élevée d'insuline délétère pour la cellule, après l'injection d'alloxan <sup>355</sup>. Cependant, l'alloxan n'agit pas de façon très sélective. Des effets nécrotiques au niveau du foie, du rein et une diminution de la sensibilité de différentes cellules à l'insuline ont été rapportés <sup>356</sup>.

La streptozotocine (STZ) peut être utilisée pour provoquer un diabète insulino-dépendant ou non-insulino-dépendant. Dans le premier cas, les doses utilisées sont comprises entre 40 et 60 mg/kg chez le rat en injection intra-véneuse ou intrapéritonéale. Dans le deuxième cas, la STZ peut être injectée à 100 mg/kg un jour après la naissance. Les manifestations du diabète apparaissent à 8-10 semaines d'âge <sup>357, 358</sup>. De plus, une faible dose de STZ (15 à 35 mg/kg) associée à une diète riche en lipides permettrait d'établir un modèle de diabète de type 2 <sup>359-361</sup>. La STZ pénètre dans la cellule grâce au transporteur de glucose GLUT2. Elle diminue la synthèse et la sécrétion d'insuline en augmentant le stress oxydatif et en endommageant l'ADN. Mais, contrairement à l'alloxan, la STZ ne semble pas exercer son effet cytotoxique en modifiant la concentration intracellulaire en calcium <sup>362</sup>.

Les lignées génétiques développant un diabète sont très nombreuses. Le tableau suivant en présente quelquesunes.

Tableau 10. Lignées génétiques de souris et de rats développant un diabète.

Lignée	Diabète insulino-dépendant	Diabète non-insulino-dépendant
Souris db/db (défiance en leptine)		X
Souris KK (K Kondo)		X
Souris NOD (non-obese diabetic)	X	
Rat BB (BioBreeding)	X	
Rat OLETF (Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty)		X
Rat ZDF (Zucker diabetic fat)		X
Rat Zucker		Syndrome métabolique

La majorité des lignées ont une origine pluri-génétique qui n'est pas clairement définie. L'exception est la lignée de souris db/db qui présente une défiance du gène codant pour la leptine. Ces lignées génétiques et les modèles de diabète induit chimiquement sont des modèles limités pour étudier le développement de la pathologie diabétique. En effet, tous ces modèles sont assez éloignés de la pathologie humaine humaine. Par exemple, la défiance en leptine est rare et ne peut expliquer qu'exceptionnellement l'apparition du diabète de type 2 chez les patients.

Toutefois, ces modèles expérimentaux permettent d'étudier certaines complications associées au diabète mais, la seule possibilité pour étudier l'accélération du vieillissement vasculaire par le diabète est de laisser vieillir les animaux. Ceci est très coûteux et peu flexible.

## 1.5. Objectifs

Mes travaux de doctorat avait pour but d'étudier certaines interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules vasculaires apparaissant au cours de remodelages vasculaires. Nous souhaitons surtout établir l'implication d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire, des effets de la dégradation matricielle et de modifications de l'expression de protéines à l'interface entre la matrice et les cellules dans le développement des remodelages vasculaires associés à l'hypertension essentielle (systolo-diastolique et systolique isolée) et au vieillissement vasculaire. Nous nous sommes aussi intéressés à l'effet du diabète sur le vieillissement vasculaire, en nous concentrant sur le rôle des produits avancés de glycation (AGEs). Pour ce faire, nous avons tenté de répondre aux objectifs suivants :

1. Établir une chronologie d'apparition des modifications de structure et de composition de la paroi vasculaire, liées à l'hypertension essentielle et à l'hypertension systolique isolée.
2. Évaluer l'importance des métalloprotéinases matricielles dans ces processus.
3. Établir un modèle animal de diabète associé à une calcification artérielle médiale permettant d'étudier l'effet du diabète sur cette dernière.
4. Évaluer et comprendre le rôle des produits avancés de glycation dans la calcification artérielle médiale.

Dans le but de tenir compte des influences hémodynamiques essentielles au remodelage vasculaire, la majorité des études présentées ont été faites dans des modèles animaux. De plus, il nous apparaissait important de préserver l'interface cellule-matrice le plus possible, et ainsi l'intégrité des vaisseaux, afin de rendre nos expériences pertinentes pour les objectifs visés.

## **1.6. Méthodes**

Afin de répondre aux objectifs exposés précédemment, plusieurs techniques ont été utilisées. Les techniques moins courantes seront détaillées dans cette partie.

### **1.6.1. Évaluation de la structure des artères**

#### **a. Artériographie pour les artères mésentériques**

Suite au sacrifice de l'animal, une artère mésentérique de troisième ordre est isolée par dissection sous le microscope. Cette artère est ensuite montée sur deux canules en verre dans une chambre perfusée. La pression de perfusion intraluminaire peut être modifiée. L'artère est stabilisée pendant 30 minutes dans un tampon Krebs sans calcium afin de prévenir tout tonus myogénique, à une pression de perfusion de 25 mmHg. La pression de perfusion est augmentée par palier de 10 mmHg jusqu'à une valeur de 75 mmHg. La structure vasculaire (diamètres interne, médial et externe) est mesurée à chaque palier de pression grâce à un système d'analyseur vidéo de dimension. Toutefois, la distinction entre la média et l'adventice ne peut se faire au delà de 55 mmHg. Les résultats présentés dans l'article sont obtenus à 35 mmHg et permettent de calculer la média, le rapport média/lumière et l'aire de section de l'artère. L'ensemble des valeurs de diamètres permet de calculer la distensibilité de l'artère, la tension et la contrainte s'exerçant sur celle-ci. Finalement, nous pouvons aussi calculer un indice de rigidité  $\beta$ .

#### **b. Coloration et dissection 3 dimension pour l'aorte**

Après dissection, une section de l'aorte thoracique est fixée dans le paraformaldéhyde 4% et incluse dans un bloc de paraffine. Elle est ensuite coupée à l'aide d'un microtome en tranches de 4  $\mu\text{m}$  d'épaisseur qui sont colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine. Les images des coupes d'aorte sont traitées avec NIH image afin de mesurer l'aire de la lumière ou aire interne et l'aire de l'aorte et de calculer l'aire de section de

l'aorte, le diamètre interne, le diamètre externe, le rapport média/lumière. Par ailleurs, nous avons déterminé le nombre de CMLVs dans la paroi de l'aorte, suivant la méthode du dissecteur 3D. Il faut deux coupes d'aorte successives (4 $\mu$ m) sur lesquelles on détermine une aire identique. On compte alors les noyaux sur la première section et les noyaux encore présents sur la deuxième section. On calcule le nombre de noyau disparus et le volume de la section. Ces valeurs permettent de calculer la densité cellulaire par unité de longueur.

### **1.6.2. Évaluation de la composition des artères**

Plusieurs paramètres ont été évalué à l'aide de la technique d'immunobuvardage de type western associée ou non à une immunoprécipitation. Nous avons également utilisé la technique d'immunohistochimie afin d'évaluer la présence et la localisation de certaines protéines. Ces méthodes courantes ne seront pas détaillées dans cette section.

#### **a. Quantification du calcium dans la paroi artérielle**

Après dissection, les artères sont séchées à 50 °C puis pesées. Le calcium contenu dans les artères est dissout à l'aide d'acide formique 10% (30  $\mu$ L/mg tissu sec), mis en présence des artères pendant 18 heures. Après centrifugation, l'acide formique contenant le calcium est utilisé pour le dosage (Teco Diagnostics). Il s'agit d'une réaction colorimétrique basée sur la formation d'un complexe violet à partir du calcium et de l'o-crésolphtaléine complexone, en milieu alcalin. L'addition de la 8-hydroxyquinoléine permet d'éviter les interférences du fer et du magnésium. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de calcium.

Notons que la présence de cristaux d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) est détectée sur les coupes histologique d'artères grâce à la coloration Von Kossa. Cette coloration au nitrate d'argent ( $\text{AgNO}_3$ ) révèle les dépôts de sels de calcium. Le  $\text{Ca}^{2+}$  est remplacé par l' $\text{Ag}^+$  qui, une fois réduit par une exposition à une lumière intense, forme un dépôt noir visible à l'aide d'un microscope.

### **b. Évaluation de la fragmentation des fibres d'élastine**

Des coupes d'aortes incluses dans la paraffine subissent une coloration avec la solution de Weigert (fuchsine, résorcine et chlorure de fer (III)). Cette dernière permet de colorer les fibres d'élastine en bleu foncé. On détermine une aire de la paroi aortique dans laquelle on dénombre les interruptions dans les filaments d'élastine.

### **c. Quantification des produits avancés de glycation dans la paroi artérielle**

Il s'agit en fait de la quantification des produits avancés de glycation fluorescents formés sur le collagène. Les sections d'artères desséchées sont pulvérisées à  $-80^{\circ}\text{C}$  et mises en suspension dans du tampon PBS. Après plusieurs rinçages et centrifugations, les lipides sont extraits à l'aide d'un mélange chloroforme-méthanol (18 heures d'incubation). Après des rinçages successifs dans le méthanol, l'eau distillée et le tampon HEPES, les échantillons sont resuspendus dans du tampon HEPES. Puis, ils sont digérés à l'aide de collagénase bactérienne. Les quantités de collagène sont déterminées indirectement par la quantification de l'hydroxyproline, un acide aminé peu courant présent dans le collagène. Une partie des échantillons digérés est utilisée pour la quantification de l'hydroxyproline. Pour cette dernière, les échantillons digérés sont hydrolysés à  $120^{\circ}\text{C}$  puis oxydés avec de la chloramine-T. Le dosage de l'hydroxyproline est un dosage colorimétrique (réactif de Ehrlich). À partir de la quantification en hydroxyproline d'échantillons de collagène pur ayant subi la digestion, l'hydrolyse et l'oxydation, on peut déterminer la quantité de collagène contenu dans les échantillons tissulaires.

Une partie des échantillons digérés sert à mesurer la fluorescence des produits avancés de glycation. Les quantités de produits avancés de glycation sont exprimées en unités arbitraires/mg de collagène.

### 1.6.3. Évaluer l'activité des métalloprotéinases

#### a. Détermination de l'activité de la MMP-2 à l'aide du kit commercial Biotrak, Amersham Pharmacia Biotech

Il s'agit d'une méthode *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Les tissus sont homogénéisés et les surnageants sont mis en contact avec un anticorps anti-MMP-2 fixé sur une plaque. La forme pro-MMP-2 est activée à l'aide d'acétate p-aminophénylmercurique (APMA). Les échantillons sont incubés avec ou sans l'activateur de MMPs afin d'évaluer les quantités de MMP-2 totale (forme active et pro-forme activée par l'APMA) et de MMP-2 active. La présence de MMP-2 active est mesurée suite à la dégradation par une enzyme de détection d'un substrat chromogène. Une courbe standard permet de quantifier la MMP-2.

#### b. Zymographie et zymographie inverse

Les protéines sont extraites de section d'aorte en utilisant un tampon ne contenant pas d'agent chélatant. Les échantillons (45 µg de protéines) sont ensuite préparés comme pour un immunobuvardage de type western à ceci près que le tampon d'électrophorèse ne contient pas de β mercaptoéthanol. Ils sont soumis à une électrophorèse dans un gel de sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide contenant 0,1% de gélatine comme substrat pour la digestion par les MMPs. Après l'électrophorèse, les enzymes sont renaturées avec du Triton 2,5% puis incubées pendant 36 heures à 37 °C dans un tampon d'incubation à pH 8. À la fin de l'incubation, la dégradation de la gélatine est bloquée par la précipitation des protéines à l'aide d'acide trichloracétique 10%. Finalement, le gel est coloré avec du bleu de Coomassie. L'activité des MMPs apparaît sous forme de bandes claires sur fond bleu soit les zones où le substrat a été dégradé. Les MMPs sont identifiées à l'aide de leur poids moléculaire et d'un contrôle positif pour la MMP-9.

La zymographie inverse permet de visualiser l'activité inhibitrice des TIMPs. Le principe est le même que la zymographie mais on ajoute au gel de SDS-polyacrylamide +

gélatine des gélatinases actives (MMP-2/MMP-9). L'activité des TIMPs apparaît sous forme de bandes bleues sur fond clair soit des bandes de substrat épargné par les gélatinases. Les TIMPs sont identifiés à l'aide de leur poids moléculaire.

**c. Détermination de l'activité élastase à l'aide du kit commercial Enz Chek, Molecular Probes**

Les protéines sont extraites de section d'aorte en utilisant un tampon ne contenant pas d'agent chélatant. Les protéines (30 µg) sont incubées pendant 18 heures à 37 °C en présence d'élastine DQ. Cette élastine a la particularité de devenir fluorescente lorsqu'elle est dégradée. La fluorescence est mesurée puis est normalisée à l'aide d'une courbe standard réalisée avec de l'élastase pancréatique porcine et de l'élastine DQ. Les résultats sont exprimés en unités d'équivalent d'activité élastolytique de l'élastase pancréatique. Afin de déterminer l'implication des métalloprotéinases dans cette dégradation, une partie des échantillons a été incubée avec de la 1,10 phénanthroline qui inhibe les métalloprotéinases. Notons que nous avons testé l'implication des serine-protéases et des cystéine-protéases en utilisant de l'aprotinine et du E-64, respectivement.

**1.6.4. Modèle de calcification artérielle médiale sur culture d'artères**

Ce modèle a été créé pour palier à certaines difficultés rencontrées avec le modèle animal. En effet, nous ne pouvons tester certaines molécules (inhibiteurs, antagonistes, activateurs) sur l'animal en raison de la toxicité, de la complexité d'administration et/ou du coût trop élevé. De plus, le modèle de calcification sur des CMLVs a été un échec.

Les artères sont prélevées puis disséquées sous un microscope. Les artères sont ensuite placées dans un milieu de culture sans sérum (pour éviter l'angiogénèse) contenant des quantités déterminées d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  (1,8 mM) et  $\text{PO}_4^{3-}$  (0,9 mM). Afin d'induire une calcification médiale, les artères sont incubées en présence de warfarine durant deux jours. Puis, la concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$  est augmentée (3,8 mM), toujours en présence de warfarine.

Après 4 jours, les artères sont rincées dans un tampon PBS et utilisées pour le dosage du calcium, l'immunohistochimie après une fixation dans le paraformaldéhyde ou l'immunobuvardage de type western.

## **2. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition.**

Hypertension 2005; 45(3) : 432-7

Céline Bouvet, D.Pharm. <sup>1</sup>, Liz-Ann Gilbert, B.Sc. <sup>1</sup>, Daphné Girardot, M.Sc. <sup>1</sup>,

Denis deBlois, Ph.D. <sup>2</sup>, and Pierre Moreau, Ph.D. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Université de Montréal

and <sup>2</sup>CHUM Research Center, Hôtel-Dieu de Montréal, Québec, Canada

*Le premier auteur a contribué majoritairement aux travaux de cette étude (75% du travail).*

*Le deuxième auteur a réalisé 25% des expériences présentées dans cet article.*

**Condensed title:** Matrix changes during eutrophic remodeling

## 2.1. Résumé

L'hypertension essentielle est associée à des remodelages vasculaires, hypertrophique dans les artères de conductance et eutrophique dans les artères de résistance. L'implication des métalloprotéinases matricielles (MMPs) et des protéines de désadhésion (ténascine-C et thrombospondine) a été largement étudiée dans le remodelage hypertrophique. Leur contribution dans le remodelage eutrophique est jusqu'à présent inconnue. Nos objectifs étaient de déterminer la séquence de modulation de la ténascine C, de la thrombospondine et de l'activation de la MMP-2 au cours du développement des remodelages vasculaires induits par l'hypertension artérielle. De plus, nous souhaitons déterminer l'impact de l'inhibition des MMPs sur les remodelages vasculaires.

Des rats Wistar mâles ont été traités avec du L-NAME durant 1, 3, 7, 14, 21 jours. L'activité de la MMP-2 a été mesurée à l'aide d'un ELISA tandis que les niveaux d'expression de ténascine-C et de thrombospondine ont été évalués par immunobuvardage de type western. Afin d'évaluer l'implication des MMPs dans les remodelages vasculaires, des rats ont reçu, en plus du traitement au L-NAME, de la doxycycline, un inhibiteur non sélectif des MMPs.

Après 1 jour de traitement au L-NAME, la pression artérielle moyenne des rats était augmentée. Après 28 jours de traitement, les artères mésentériques et l'aorte présentaient un remodelage vasculaire eutrophique et hypertrophique, respectivement. Dans les artères de résistance, l'activité de la MMP-2 était augmentée de façon transitoire après 7 jours de traitement au L-NAME pour revenir à un niveau basal à 28 jours. Cependant, l'activation de la MMP-2 dans l'aorte était progressive et plus soutenue. Par ailleurs, les niveaux de thrombospondine suivaient les niveaux d'activité de la MMP-2 dans les artères mésentériques alors que l'expression de la ténascine-C était réduite après 7 jours de traitement au L-NAME. La doxycycline a empêché le développement du remodelage hypertrophique mais n'a eu aucune influence sur le remodelage eutrophique.

Contrairement au remodelage hypertrophique, le remodelage eutrophique ne dépend pas de l'augmentation de l'activité des MMPs pour se produire. Donc il semble que ces deux remodelages diffèrent dans leur structure, leur fonction et leur mécanisme d'apparition.

## 2.2. Abstract

In essential hypertension, conduit arteries present hypertrophic remodeling (increased cross sectional area), while small arteries undergo eutrophic remodeling. The involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and de-adhesion proteins, such as tenascin-C and thrombospondin, has been relatively well characterized in large artery remodeling, but their contribution is not known in small artery remodeling. Rats received L-NAME (50mg/kg/d) in their drinking water during 1, 3, 7, 14 and 28 days. Arterial MMP-2 activity was measured by ELISA, while levels of tenascin-C and thrombospondin were assessed by western blotting. To determine the involvement of MMPs, additional L-NAME rats received the non-selective MMP inhibitor doxycycline (30mg/kg/d) during 7, 14, 28 days. Already at day 1, pressure was elevated. Media/Lumen ratio of mesenteric arteries and the aorta increased gradually to reach significance at 28 days. However, the cross-sectional area increased only in the aorta, confirming the heterogeneous remodeling process. In small arteries, MMP-2 activity increased after 7 and 14 days of treatment and returned to baseline at 28 days, while the elevation was more progressive but sustained in the aorta. The level of thrombospondin paralleled that of MMP-2 in small arteries, while tenascin-C levels declined rapidly and stayed below control values. Doxycycline blunted large artery remodeling, but had no influence on the development of eutrophic remodeling despite elevation of MMP-2 activity in the process. Thus, in contrast to large artery hypertrophic remodeling, where the contributions of cellular de-adhesion and matrix breakdown is manifest, the contribution of MMPs in eutrophic remodeling appears less crucial.

**Keywords:** vascular remodeling, hypertension, matrix metalloproteinases, tenascin C, thrombospondin

### 2.3. Introduction

Vascular remodeling is considered an adaptive response to elevation of arterial pressure in order to normalize the wall tension. In essential hypertension, large artery remodeling is characterized by an increase in media thickness-lumen diameter ratio (M/L) and cross-sectional area (CSA). This augmentation of media mass, or hypertrophic remodeling, is explained by changes in size or number of vascular smooth muscle cells (VSMC) and matrix collagen deposition <sup>1</sup>. In resistance arteries (diameter < 300  $\mu\text{m}$ ), essential hypertension is associated with a reduced lumen and increased M/L ratio but without CSA increase, producing a type of remodeling designated as inward eutrophic remodeling <sup>2</sup>. To explain this different response between large and small arteries, it is suggested that small arteries are not submitted to an augmented wall stress because they are initially constricted <sup>3-5</sup>. Thus, we hypothesized that inward eutrophic remodeling, which appears as a fixed form of vasoconstriction, could proceed through specific modifications of VSMC-matrix interactions.

As in essential hypertension, chronic inhibition of nitric oxide synthesis with the L-arginine analogue N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) produces hypertrophic remodeling in large arteries <sup>6</sup>, whereas resistance arteries undergo inward eutrophic remodeling <sup>7-9</sup>. As seen during normal development, inflammation, wound healing and cancer, remodeling likely involves modification of cell-matrix interactions and breakdown of existing extracellular matrix (ECM). In the ECM a group of secreted glycoproteins, the matricellular proteins, like tenascin-C (TN-C) and thrombospondin (TSP), are believed to disrupt cell-matrix interaction by favoring de-adhesion and have been associated with remodeling. Indeed, TSP expression is augmented in hypertensive pulmonary arteries <sup>10</sup>, and TN-C is implicated in progressive pulmonary vascular disease <sup>11</sup>, in arterialization of human vein grafts <sup>12</sup> and in hypertension <sup>13</sup>. Thus, TN-C and TSP are increased in vascular remodeling associated with cell proliferation, but their regulation in small artery eutrophic remodeling is unknown. In order to breakdown the ECM or simply cell-matrix adhesions,

vascular cells produce proteases like matrix metalloproteinases (MMPs), which are secreted in a latent proform and require an enzymatic cleavage for activation. They can degrade several ECM proteins unless bound to specific tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). They have been implicated in large artery remodeling during atherosclerosis and restenosis <sup>14, 15</sup>, and in hypertrophic remodeling of pulmonary arteries <sup>16</sup>. Some evidence suggest that mechanical stretch and strain upregulate MMP-2 and MMP-9 in vascular smooth muscle cells <sup>17</sup>. The same was observed when vein grafts were mechanically stretched <sup>18</sup>, or when transmural pressure was elevated *ex vivo* in porcine carotid arteries <sup>19</sup>, suggesting that hypertension could trigger MMP activation in small arteries.

Our objectives were to determine the modulation of TN-C and TSP abundance and to examine the kinetic of MMP-2 activation during the development of hypertension-induced remodeling of large and small arteries. Moreover, we tested the impact of MMP inhibition on the progression vascular remodeling in the L-NAME model.

## **2.4. Methods**

### **2.4.1. Treatments**

Male Wistar rats (275-300 g) were obtained from Charles-River (St Constant, Quebec, Canada). To induce hypertension, 40 rats received 50 mg/kg per day of L-NAME (Sigma), in the drinking water. They were treated during 1, 3, 7, 14 and 28 days (n=8/group). In an additional 24 rats, doxycycline, a non-selective MMP inhibitor, was administered (30 mg/kg/d) in the drinking water concomitantly with L-NAME for 7, 14 and 28 days (n=8/group). Five age-matched control rats were studied at one day and five at 28 days to establish a baseline. Since the values of the parameters measured were not statistically different, they were pooled for further statistical analyses. Eight rats received only doxycycline during 28 days to provide additional control values. Rats were instrumented<sup>20</sup> and the following day mean (MBP), systolic (SBP) and diastolic blood

pressures (DBP) were measured in awake animals. All procedures were approved by the Animal Care and Use Committee at Université de Montréal.

#### **2.4.2. Vascular structure and mechanical properties**

Animals were sacrificed by an overdose of pentobarbital. A portion of a third order mesenteric artery was isolated by dissection under microscope in Krebs solution. The arteries were then mounted and tied on two glass cannulas in a vessel chamber, and perfused intra and extra-luminally with a calcium-free Krebs solution. The procedures for the determination of structural and mechanical parameters are detailed elsewhere <sup>20</sup>. For the biochemical analyses, the remaining small mesenteric arteries were pooled individually for each rat and frozen.

Thoracic aortas were also collected, cleaned in cold Krebs, fixed in phosphate-buffered paraformaldehyde 4 %, embedded in paraffin blocks and 4 µm thick slices were stained with HPS (hematoxylin, phloxine and safran). We have previously shown that this procedure provides accurate structure determination <sup>21</sup>. The determination of vascular smooth muscle cell number was performed by the three-dimensional dissector method, which is independent of nuclei orientation, form and size and is described in details elsewhere <sup>20,21</sup>.

#### **2.4.3. MMP-2 activity**

MMP-2 activity was assessed by a commercial kit (Biotrak, Amersham Pharmacia Biotech) that provides a quantitative determination of active and total (pro- plus active) MMP-2 in tissue homogenates. Tissue samples were homogenized in 50mM Tris-HCl buffer at pH 7.4 containing 1mM monothioglycerol (18 µL of Tris-HCl buffer/mg of tissue) and centrifuged (2000 g for 10 minutes). The same amount of supernatant was loaded in microtitre wells pre-coated with an anti-MMP-2 antibody (active form). In the other half of the sample volume, pro-MMP-2 was activated by p-aminophenylmercuric acetate (APMA) to estimate the total amount of MMP-2. Active MMP-2 concentration was measured by

degradation of a specific chromogenic peptide substrate emitting at 405 nm, by interpolation from a standard curve (0.75 to 12 ng/mL).

In 4 rats per group, MMP-2 activity was also measured by standard gelatin zymography <sup>22</sup> to confirm the results obtained with the commercial assay. MMP-2 was localized at 72kDa and its activity was visualized as areas of lytic activity on an otherwise blue background. The activity is expressed in comparison with the same external control repeated on all gels.

#### **2.4.4. Western blots**

Tissue levels of TN-C, TSP <sup>23</sup> and TIMP-2 (n=4-8 per group) were quantified by western blot analysis. Equal quantities of proteins (30µg) were separated on 6 % SDS-polyacrilamide gels for TN-C and TSP, and on 15 % SDS-polyacrilamide gels for TIMP-2. Proteins were detected with specific antibodies for TN-C (2 µg/mL, Chemicon), TSP (3 µg/mL, Neomarkers, clone A6.1) and TIMP-2 (5 µg/mL, Oncogene).

#### **2.4.5. Statistical analysis**

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was done by either one-sample t-test (TN-C and TSP) or one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's correction for multiple comparisons. We selected a priori the following comparisons: L-NAME and doxycycline (used alone) groups compared to the control group and L-NAME + doxycycline compared to the time-matched L-NAME groups. A value of  $P < 0.05$  was considered significant.

### **2.5. Results**

After one day of L-NAME treatment, blood pressure measure in freely moving rats was already elevated (**Fig. 1A**). The increase was progressive over the 28 days of treatment, and was not modified by concomitant doxycycline administration. Doxycycline alone had

no effect on blood pressure. The increase in small artery M/L became significant after 14 days of L-NAME treatment (**Fig. 1B**). The augmented M/L was not associated with a significant increase in CSA, confirming the eutrophic nature of small artery remodeling in this model (**Table 1**). The addition of doxycycline did not modify the evolution of the remodeling process, as the M/L values were not different from time-matched L-NAME-treated rats (**Fig. 1B**). However, doxycycline seemed to reduce CSA at intermediate time points (**Table 1**). The mechanical properties of the arterial wall (distensibility and the geometry-independent stiffness expressed as the  $\beta$ -stiffness index) were not modified by chronic L-NAME treatment (**Table 1**). Moreover, the MMP inhibitor doxycycline did not modify these mechanical properties either when used alone or in combination with L-NAME.

During the development of eutrophic remodeling, a transient elevation of MMP-2 activity was observed (**Fig. 2A**). Total MMP-2 abundance, assessed after activation of the pro-form, was not modified in small arteries throughout the experimental protocol (**Fig. 2B**). Gel zymograms of mesenteric arteries confirmed that MMP-2 activity was enhanced (**Fig. 2C**). Interestingly, TIMP-2 was not reduced, but its abundance increased during L-NAME treatment (**Table 1**). Doxycycline inhibited MMP-2 activity (**Fig. 2A and 2C**), had no effect on total MMP (**Fig. 2B**) and increased TIMP-2 levels even further (**Table 1**). In small arteries, TN-C levels decreased gradually to reach 35% of control values at day 14 (**Table 1**). In contrast, TSP levels did not initially change but increased at day 14.

The aorta of rats having received L-NAME during 28 days had a significantly larger internal diameter and an increased media thickness compared with that of control rats, resulting in an increased media-lumen ratio (**Fig. 1, table 2**). In contrast to small arteries, however, the CSA was elevated after 28 days of treatment. Remodeling did not seem to be consistent at earlier time points, as these parameters were variable until 14 days of treatment. Using the three-dimensional dissector method, we observed that the number of cells per length was not different between rats treated with L-NAME for 28 days ( $1607 \pm 128$ ) and control rats ( $1481 \pm 218$ ), suggesting cellular hypertrophy rather than hyperplasia

to explain the increased CSA. Co-administration of doxycycline during 28 days prevented hypertrophic remodeling of the aorta; it significantly reduced lumen diameter, media thickness and CSA (**Fig. 1, table 2**).

Continuous L-NAME treatment induced a progressive elevation of MMP-2 activity in the aorta, which became significant after 28 days (**Fig. 2A**). It was paralleled by an increase of total MMP-2 levels (**Fig. 2B**). MMP-2 activity was reduced by doxycycline, mainly during the last week of treatment (**Fig. 2A**). Total MMP-2 levels were also reduced, but not to the same extent.

## 2.6. Discussion

Administration of L-NAME increased mean arterial pressure, as expected from several studies using this NOS inhibitor. The M/L ratio gradually increased both in the aorta and mesenteric arteries, suggesting that it took several days of hypertension to modify the matrix more permanently. However, CSA increased only in the aorta, confirming that remodeling is heterogeneous along the vascular tree<sup>5</sup>. Thus, the aorta adapted to sustained pressure elevation by hypertrophic remodeling, whereas mesenteric resistance arteries underwent eutrophic remodeling. Interestingly, this heterogeneity also occurs in essential hypertension<sup>24, 25</sup>, making the L-NAME model particularly suitable to study hypertension-induced vascular remodeling. Although there have been reports on heterogeneous responses in rats in terms of activation of the renin-angiotensin system and the development of left ventricular hypertrophy and renal alterations<sup>26</sup>, we never observed RAS activation in our experimental conditions<sup>27</sup>.

There is ample evidence that MMPs in general, and MMP-2 more specifically, are involved in hypertrophic cardiovascular remodeling (see introduction). We chose MMP-2 as our primary candidate, since MMP-2 is expressed at lower transmural pressures in coronary arteries studied *ex vivo*<sup>19</sup>. Furthermore, a predominance of MMP-2 activity in VSMC was observed under mechanical stretch and strain<sup>28</sup>. Consistent with previous

findings, the present study demonstrates a progressive augmentation of total MMP-2 level and activity in hypertrophic remodeling of large arteries. The major novel finding is the transient increase of MMP-2 activity after 14 days of hypertension that parallels the establishment of stable and significant remodeling of small mesenteric arteries. Indeed, to our knowledge, this is the first study to report the evolution of MMP-2 activity in hypertension-induced eutrophic remodeling. The total amount of the enzyme was not increased, as suggested by the activity assay after APMA treatment. Moreover, the augmentation of MMP-2 activity cannot be explained by a decrease of its inhibitor, TIMP-2. Thus, our results suggested that MMP-2 could be implicated in eutrophic remodeling, as it is in several forms of cardiovascular remodeling. To examine the direct involvement of MMP-2 activation in eutrophic remodeling, rats were treated with doxycycline, a tetracycline known to inhibit MMPs non-selectively<sup>29</sup>. The mechanism of this inhibition is not completely understood, but doxycycline binds directly the  $Zn^{2+}$  or  $Ca^{2+}$  ion associated with MMPs, thus either blocking their active site or modifying their activation. Inhibition of MMPs could also be related to inhibition of the transcription of MMP mRNAs<sup>30</sup>. In our study, doxycycline significantly reduced aortic MMP-2 upregulation and MMP-2 activity in the two types of arteries. This suggests that it could act on MMP-2 expression, activation and activity. However, since the processing of tissues required for activity measurements (gelatin zymography and ELISA) is likely to remove doxycycline bound to the enzyme, we may have measured mainly *in vivo* activation inhibition rather than blockade of its activity. Nonetheless, as a result of MMPs inhibition, hypertrophic arterial remodeling was prevented. This is in line with studies showing prevention of blood flow-induced artery enlargement<sup>31</sup> and inhibition of several phases of intimal thickening after arterial injury<sup>32</sup>. In contrast to results obtained in large arteries, doxycycline treatment did not modify vascular remodeling in mesenteric arteries, suggesting that despite the increase of MMP-2 activity, this family of enzymes does not appear to be necessary for the eutrophic remodeling process to occur. Interestingly, doxycycline appeared to influence small artery “hypertrophy”, although it is not a main feature in this model. To investigate whether MMPs could influence other parameters than the overall structure during the remodeling

process, we studied the distensibility of small arteries during L-NAME and doxycycline treatment. According to our observations, and in accordance with several studies in experimental hypertension<sup>33</sup>, eutrophic remodeling was not associated with modification of the mechanical properties of the arteries. Doxycycline did not modify these properties, suggesting that the elevation of MMP-2 observed during L-NAME treatment is not involved in the control of small artery stiffness.

In large pulmonary arteries, hypertrophic remodeling appears to involve reduced adhesion of cells to the ECM, as several matricellular molecules with reduced adhesion properties, such as TN-C and TSP, are overexpressed<sup>10,11</sup>. This could be necessary to allow cells to grow, proliferate and migrate within the matrix. In the present study, only TN-C was elevated in the aorta and could serve such a function. The expression of TSP was not modified during the development of aortic hypertrophy, suggesting that its involvement may be less than in pulmonary arteries. In small arteries facing a chronic elevation of arterial pressure, cell adhesion may have to be weakened to allow VSMC to move within the contracted matrix<sup>34</sup>. Indeed, eutrophic remodeling is considered to be a rearrangement of cells around a smaller lumen, and after an initial shortening, cells appear to regain initial elongation despite a sustained contracted vessel structure<sup>3</sup>. In line with this, TSP was upregulated at the same time (14 days) as remodeling became significant. Alternatively, enhanced adhesion could be important to keep the cells attached to the contracted matrix, to allow them to pursue their vasomotion function. To support this alternative hypothesis, TN-C was reduced throughout the treatment period, with a clear reduction at 14 days. The results concerning these matricellular proteins could also be interpreted in light of MMP-2 activity. Indeed, TSP-1 has been shown to stimulate MMP-2 activity<sup>35</sup>, and both proteins show concurrent kinetics in our study. In large elastic arteries, TN-C abundance appears to parallel that of MMP activity<sup>36</sup>, as it is the case in the present study. It has been suggested that TN-C induces MMP expression<sup>37</sup>. Our results do not support such a relation in small arteries, but are in line with a recent report demonstrating that TN-C could be a substrate of MMP-2<sup>38,39</sup>. Thus, the decline of TN-C abundance that was observed could result from enhanced MMP-2 activity. Our results support, but do not prove, the interplay between

MMP-2 and matricellular proteins during the remodeling process and more work is needed to identify their exact role.

### **Perspectives**

We postulated that in order to stabilize vasoconstriction into eutrophic remodeling, VSMC had to modify their matrix interactions. Although such alterations could be demonstrated during the development of this process, we were unable to demonstrate a causative role of MMPs, in contrast to what can be observed in large arteries. Thus, the development of eutrophic remodeling of small arteries may involve a complex interplay of ECM enzymes and de-adhesive proteins that is not decisive for the remodeling to proceed. However, future studies may involve the evaluation of plasmin, which is known to degrade glycoprotein components of the ECM. Plasmin is formed by enzymatic cleavage of plasminogen by tissue plasminogen activator (t-PA) and urokinase plasminogen activator (u-PA). Indeed, a very recent study (abstract form) has shown that during reverse vascular remodeling induced by antihypertensive therapy, u-PA activity was more important than MMP-2 activity<sup>40</sup>. Since doxycycline does not inhibit u-PA, our study did not evaluate this possibility.

In conclusion, the development of eutropic remodeling of small arteries is associated, in a timely fashion, with varying expression of several proteins involved in cell-matrix interactions. In contrast to large artery hypertrophic remodeling, eutrophic remodeling does not appear to depend on enhanced MMP activity to evolve in its final form. Thus we provide evidence that the remodeling process in arteries with different functions also involves alternative mechanisms.

## **2.7. Acknowledgements**

The authors acknowledge the skillful technical assistance of Louise Ida Grondin and Michelle P. Bendeck (University of Toronto) for her help with gel zymography. The Heart and Stroke Foundation of Canada funded the study. CB receives a studentship from the

Health Research Foundation / Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and DG from Rx&D/CIHR. DdB is a scholar from the Fonds de la recherche en santé du Québec and PM from the CIHR.

## 2.8. References

1. Lehoux S, Tedgui A. Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall. *Hypertension*. 1998;32:338-345.
2. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD. Vascular remodeling (letter). *Hypertension*. 1996;28:505-506.
3. Martinez-Lemus LA, Hill MA, Bolz SS, Pohl U, Meininger GA. Acute mechanoadaptation of vascular smooth muscle cells in response to continuous arteriolar vasoconstriction: implications for functional remodeling. *Faseb J*. 2004;18:708-710.
4. Bakker EN, Buus CL, VanBavel E, Mulvany MJ. Activation of resistance arteries with endothelin-1: from vasoconstriction to functional adaptation and remodeling. *J Vasc Res*. 2004;41:174-182.
5. Girardot D, Demeilliers B, deBlois D, Moreau P. ERK1/2-mediated vasoconstriction normalizes wall stress in small mesenteric arteries during NOS inhibition in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003;42:339-347.
6. Kato H, Hou J, Chobanian AV, Brecher P. Effects of angiotensin II infusion and inhibition of nitric oxide synthase on the rat aorta. *Hypertension*. 1996;28:153-158.
7. Deng LY, Thibault G, Schiffrin EL. Effect of hypertension induced by nitric oxide synthase inhibition on structure and function of resistance arteries in the rat. *Clin Exp Hypertens*. 1993;15:527-537.
8. Moreau P, Takase H, Kung CF, van Rooijen MM, Schaffner T, Luscher TF. Structure and function of the rat basilar artery during chronic nitric oxide synthase inhibition. *Stroke*. 1995;26:1922-1928; discussion 1928-1929.

9. Martens FM, Demeilliers B, Girardot D, Daigle C, Dao HH, deBlois D, Moreau P. Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition: role of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Hypertension*. 2002;39:16-21.
10. Botney MD, Kaiser LR, Cooper JD, Mecham RP, Parghi D, Roby J, Parks WC. Extracellular matrix protein gene expression in atherosclerotic hypertensive pulmonary arteries. *Am J Pathol*. 1992;140:357-364.
11. Jones PL, Cowan KN, Rabinovitch M. Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease. *Am J Pathol*. 1997;150:1349-1360.
12. Wallner K, Li C, Shah PK, Fishbein MC, Forrester JS, Kaul S, Sharifi BG. Tenascin-C is expressed in macrophage-rich human coronary atherosclerotic plaque. *Circulation*. 1999;99:1284-1289.
13. Mackie EJ, Scott-Burden T, Hahn AW, Kern F, Bernhardt J, Regenss S, Weller A, Buhler FR. Expression of tenascin by vascular smooth muscle cells. Alterations in hypertensive rats and stimulation by angiotensin II. *Am J Pathol*. 1992;141:377-388.
14. Jenkins GM, Crow MT, Bilato C, Gluzband Y, Ryu WS, Li Z, Stetler-Stevenson W, Nater C, Froehlich JP, Lakatta EG, Cheng L. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*. 1998;97:82-90.
15. Godin D, Ivan E, Johnson C, Magid R, Galis ZS. Remodeling of carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model. *Circulation*. 2000;102:2861-2866.
16. Jones PL, Chapados R, Baldwin HS, Raff GW, Vitvitsky EV, Spray TL, Gaynor JW. Altered hemodynamics controls matrix metalloproteinase activity and tenascin-C expression in neonatal pig lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282:L26-35.

17. Asanuma K, Magid R, Johnson C, Nerem RM, Galis ZS. Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:H1778-1784.
18. Meng X, Mavromatis K, Galis ZS. Mechanical stretching of human saphenous vein grafts induces expression and activation of matrix-degrading enzymes associated with vascular tissue injury and repair. *Exp Mol Pathol.* 1999;66:227-237.
19. Chesler NC, Ku DN, Galis ZS. Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo. *Am J Physiol.* 1999;277:H2002-2009.
20. Dao HH, Martens FM, Lariviere R, Yamaguchi N, Cernacek P, de Champlain J, Moreau P. Transient involvement of endothelin in hypertrophic remodeling of small arteries. *J Hypertens.* 2001;19:1801-1812.
21. Dao HH, Lemay J, de Champlain J, deBlois D, Moreau P. Norepinephrine-induced aortic hyperplasia and extracellular matrix deposition is endothelin-dependent. *Journal of Hypertension.* 2001;19:1965-1973.
22. Hou G, Mulholland D, Gronska MA, Bendeck MP. Type VIII collagen stimulates smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase synthesis after arterial injury. *Am J Pathol.* 2000;156:467-476.
23. Stenina OI, Krukovets I, Wang K, Zhou Z, Forudi F, Penn MS, Topol EJ, Plow EF. Increased expression of thrombospondin-1 in vessel wall of diabetic Zucker rat. *Circulation.* 2003;107:3209-3215.
24. Laurent S. Arterial wall hypertrophy and stiffness in essential hypertensive patients. *Hypertension.* 1995;26:355-362.
25. Mulvany MJ. Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2002;4:49-55.

26. Xu Y, Arnal JF, Hinglais N, Appay MD, Laboulandine I, Bariety J, Michel JB. Renal hypertensive angiopathy. Comparison between chronic NO suppression and DOCA-salt intoxication. *Am J Hypertens*. 1995;8:167-176.
27. Girardot D, Jover B, Moles JP, Deblois D, Moreau P. Chronic nitric oxide synthase inhibition prevents new coronary capillary generation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44:322-328.
28. Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, Schieffer B. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res*. 2003;92:e80-86.
29. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:178-193.
30. Jonat C, Chung FZ, Baragi VM. Transcriptional downregulation of stromelysin by tetracycline. *J Cell Biochem*. 1996;60:341-347.
31. Tronc F, Mallat Z, Lehoux S, Wassef M, Esposito B, Tedgui A. Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:E120-126.
32. Bendeck MP, Conte M, Zhang M, Nili N, Strauss BH, Farwell SM. Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am J Pathol*. 2002;160:1089-1095.
33. Intengan HD, Schiffrin EL. Mechanical properties of mesenteric resistance arteries from Dahl salt-resistant and salt-sensitive rats: role of endothelin-1. *J Hypertens*. 1998;16:1907-1912.
34. Murphy-Ullrich JE. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest*. 2001;107:785-790.

35. Lee T, Esemuede N, Sumpio BE, Gahtan V. Thrombospondin-1 induces matrix metalloproteinase-2 activation in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg.* 2003;38:147-154.
36. Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res.* 1994;75:539-545.
37. Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn.* 2000;218:235-259.
38. Siri A, Knauper V, Veirana N, Caocci F, Murphy G, Zardi L. Different susceptibility of small and large human tenascin-C isoforms to degradation by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1995;270:8650-8654.
39. Cai M, Onoda K, Takao M, Kyoko IY, Shimpo H, Yoshida T, Yada I. Degradation of tenascin-C and activity of matrix metalloproteinase-2 are associated with tumor recurrence in early stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8:1152-1156.
40. Shoichet MJ, Hale TM, Graham CH, Bushfield TL, Adams MA. Differential involvement of matrix degrading enzymes in antihypertensive-drug induced vascular structural changes. *Cardiovasc Pathol.* 2004;13:S120 (abstract).

## 2.9. Figure legends

Figure 1. Mean arterial blood pressure (MBP) (A) and Media/Lumen ratio (M/L) of small mesenteric arteries (B) during treatment with L-NAME alone (open circles), with L-NAME + doxycycline (closed circles) and doxycycline alone (open squares). Pooled control values are presented at the zero time point. (C) Aortic Media/Lumen ratio (M/L) and cross-sectional area (CSA), assessed from histological sections, in control rats (Ctl) and rats treated with L-NAME alone (NAME) or with doxycycline (+D) during 28 days. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM, n=8 to 10 per group. \*  $P < 0.05$  vs Control, †  $P < 0.05$  vs L-NAME alone, ANOVA with Bonferonni's correction.

Figure 2. Quantification of active MMP-2 (A) and total MMP-2 after activation with APMA (B) in small mesenteric arteries (circles) and in aortas (triangles) during treatment with L-NAME alone (open symbols) or with L-NAME + doxycycline (closed symbols). n=8 to 10 per group. (C) Gelatinase activity of MMP-2 in mesenteric arteries during treatment with L-NAME alone (open circles) or with L-NAME + doxycycline (closed circles), n=4 per group. Pooled control values are presented at the zero time point. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  vs Control, †  $P < 0.05$  vs L-NAME alone, ANOVA with Bonferonni's correction.

## 2.10. Tables

Table 1. Morphological characteristic, mechanical properties and protein expression in small mesenteric arteries.

Variables	Treatment	Control	1 day	3 days	7 days	14 days	28 days	Doxy 28 days
	n =	10	8	8	8	8	8	8
ID ( $\mu\text{m}$ )	L-NAME	245 $\pm$ 7	246 $\pm$ 7	248 $\pm$ 9	258 $\pm$ 10	226 $\pm$ 9	241 $\pm$ 6	257 $\pm$ 10
	+ Doxy				211 $\pm$ 10	227 $\pm$ 9	222 $\pm$ 7	
Media ( $\mu\text{m}$ )	L-NAME	17.0 $\pm$ 0.7	18.5 $\pm$ 1.3	16.5 $\pm$ 0.9	18.1 $\pm$ 1.0	19.0 $\pm$ 0.9	20.0 $\pm$ 1.1	16.8 $\pm$ 1.2
	+ Doxy				17.4 $\pm$ 0.6	16.9 $\pm$ 0.8	19.4 $\pm$ 1.1	
CSA ( $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ )	L-NAME	15.5 $\pm$ 0.6	17.5 $\pm$ 1.3	15.4 $\pm$ 0.9	17.4 $\pm$ 0.8	16.2 $\pm$ 0.9	17.2 $\pm$ 0.8	14.8 $\pm$ 0.9
	+ Doxy				14.2 $\pm$ 0.8	14.2 $\pm$ 1.1	17.1 $\pm$ 0.6	
					†			
Distensibility ( $\mu\text{m mmHg}^{-1}$ )	L-NAME	1.1 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.03	0.9 $\pm$ 0.04
	+Doxy				1.2 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1	
$\beta$ -stiffness index	L-NAME	2.77 $\pm$ 0.1	2.84 $\pm$ 0.1	2.66 $\pm$ 0.1	2.75 $\pm$ 0.1	2.56 $\pm$ 0.2	3.07 $\pm$ 0.1	3.03 $\pm$ 0.0
		4	2	7	6	3	0	9
	+ Doxy				2.67 $\pm$ 0.2	2.64 $\pm$ 0.1	3.00 $\pm$ 0.2	
					4	7	0	
TIMP-2	L-NAME	78.5 $\pm$ 22.			168.2 $\pm$ 15	265.7 $\pm$ 88	291.3 $\pm$ 37	
		5			.6*	.5*	.5*	

	+ Doxy				351.7±70	415.5±60	303.3±10
					.9†	.5†	9.8
TSP	L-NAME	100	112.4±1	114.8±14	111.2±6.	175.6±11	
			1.7	.6	4	.9*	
TN-C	L-NAME	100	67.6±14.	79.6±11.	50.4±15.	34.4±4.6	
			3	6	9*	*	

---

Doxy: doxycyclin; ID: internal diameter; Media: media thickness; CSA: cross-sectional area; TSP: thrombospondin; TN-C: tenascin C; TIMP-2: tissue inhibitor of metalloproteinase-2. Media/Lumen ratio is presented in figure 1. For TSP and TN-C, n=4. \*  $P < 0.05$  vs Control, †  $P < 0.05$  vs L-NAME alone

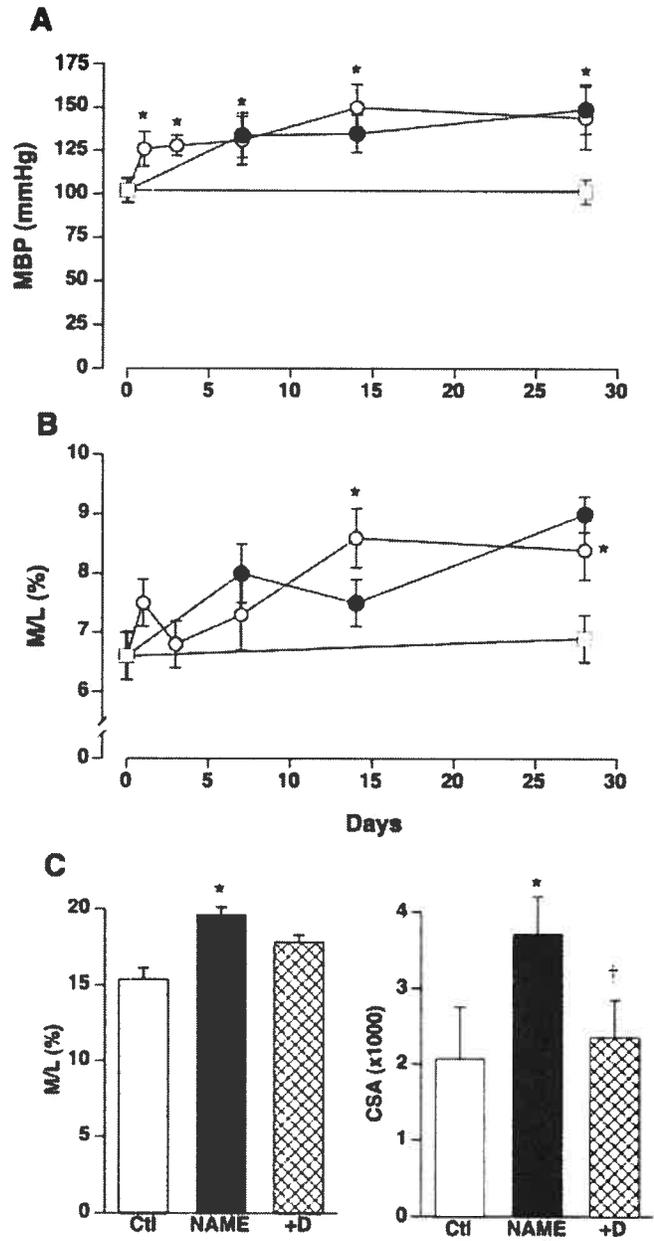
Table 2 Morphological characteristics of aorta in control rats and rats receiving L-NAME treatment alone or with doxycyclin.

Variables	Treatment	Control	1 day	3 days	7 days	14 days	28 days
	n =	10	8	8	8	8	8
ID ( $\mu\text{m}$ )	L-NAME	1564 $\pm$ 22	1520 $\pm$ 36	1580 $\pm$ 19	1666 $\pm$ 26*	1527 $\pm$ 27	1686 $\pm$ 21*
	+Doxy				1496 $\pm$ 40†	1589 $\pm$ 22	1545 $\pm$ 37†
ED ( $\mu\text{m}$ )	L-NAME	1787 $\pm$ 22	1747 $\pm$ 35	1805 $\pm$ 15	1891 $\pm$ 29*	1772 $\pm$ 27	1989 $\pm$ 24*
	+Doxy				1753 $\pm$ 42†	1833 $\pm$ 25	1797 $\pm$ 39†
Media ( $\mu\text{m}$ )	L-NAME	293 $\pm$ 11	291 $\pm$ 9	298 $\pm$ 7	316 $\pm$ 11	318 $\pm$ 8	437 $\pm$ 14*
	+Doxy				329 $\pm$ 12	330 $\pm$ 11	332 $\pm$ 12†
M/L (%)	L-NAME	15.4 $\pm$ 0.7	16.5 $\pm$ 0.8	15.5 $\pm$ 0.7	14.4 $\pm$ 0.2	17.4 $\pm$ 0.4	19.6 $\pm$ 0.5*
	+Doxy				18.9 $\pm$ 0.7†	16.6 $\pm$ 0.4	17.8 $\pm$ 0.5
CSA ( $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ )	L-NAME	206.0 $\pm$ 11.7	198.7 $\pm$ 13.6	211.5 $\pm$ 5.1	254.9 $\pm$ 18.0	217.0 $\pm$ 12.0	371.3 $\pm$ 20.7*
	+Doxy				221.2 $\pm$ 17.5	242.3 $\pm$ 14.2	234.6 $\pm$ 18.8†
TSP	L-NAME	100	119.6 $\pm$ 19.0	95.5 $\pm$ 15.4	72.3 $\pm$ 9.2*	92.2 $\pm$ 18.8	
TN-C	L-NAME	100	109.3 $\pm$ 9.1	112.7 $\pm$ 13.4	136.1 $\pm$ 12.6*	166.1 $\pm$ 15.6*	

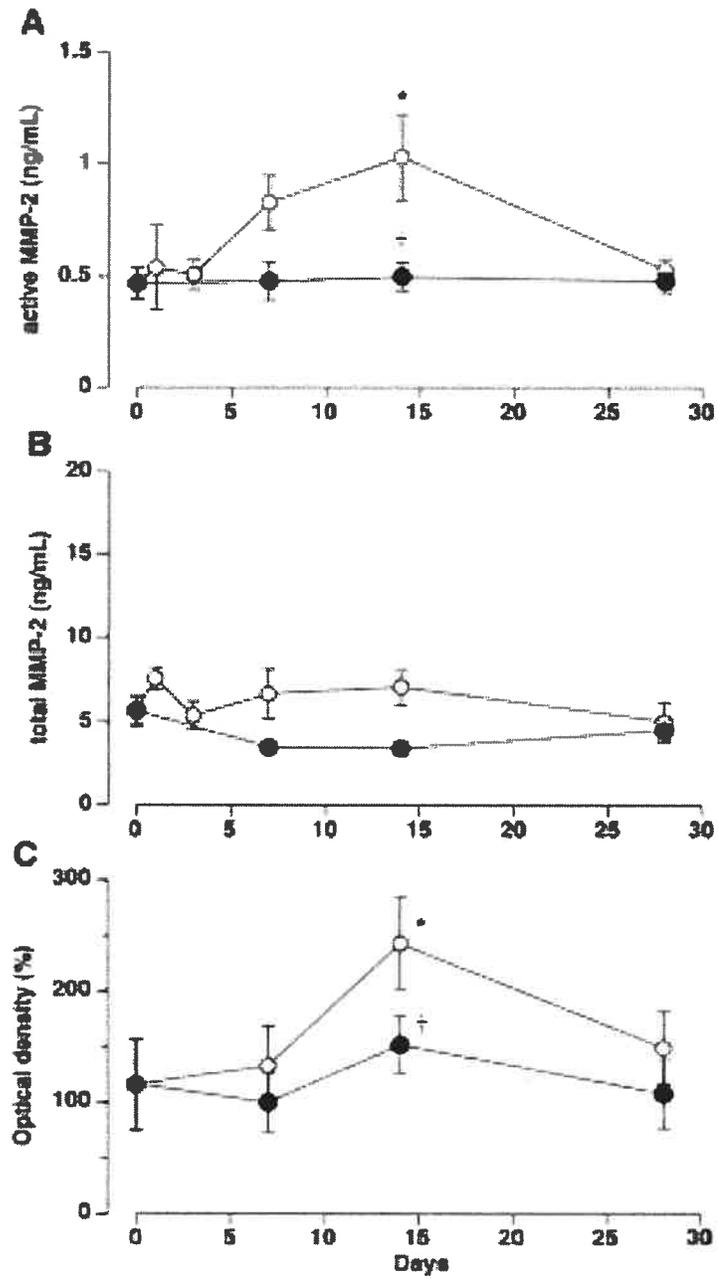
Doxy: doxycyclin; ID: internal diameter; ED: external diameter; Media: media thickness; M/L: media / lumen ratio; CSA: cross-sectional area; TSP: thrombospondin; TN-C: tenascin C. The values of M/L and CSA at 28 days are also presented in figure 1. \*  $P < 0.05$  vs Control, †  $P < 0.05$  vs L-NAME alone

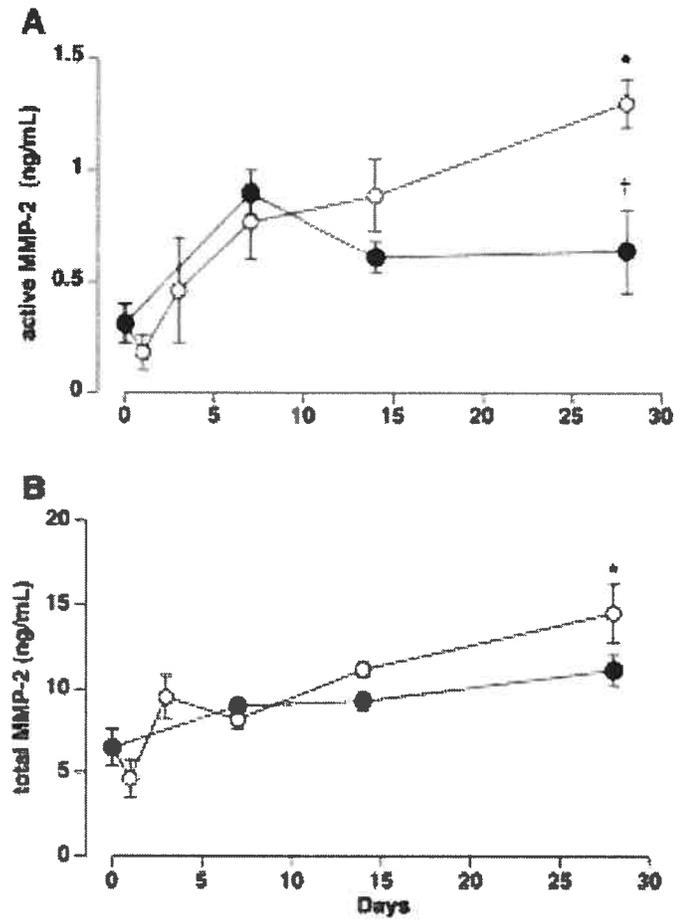
## 2.11. Figures

Bouvet et al. Figure 1



Bouvet et al. Figure 2





### **3. Sequential activation of MMP-9 and TGF- $\beta$ in arterial elastocalcinosis.**

En révision pour Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology

Céline Bouvet, Pharm D. <sup>1\*</sup>, Simon Moreau <sup>1\*</sup>, Joannie Blanchette <sup>1</sup>,

Denis deBlois, PhD. <sup>2</sup> and Pierre Moreau, PhD. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Québec, Canada

<sup>2</sup> Department of pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Québec, Canada

\* These authors contributed equally to the project.

*Les deux premiers auteurs ont contribué de façon équivalente à cette étude. Le troisième auteur a participé à 10% des travaux.*

Short title: MMP-9 and TGF- $\beta$  in elastocalcinosis

### 3.1. Résumé

L'hypertension systolique isolée est associée à une augmentation de la dégradation de l'élastine et de la matrice extracellulaire libérant des produits de dégradation de l'élastine et du TGF- $\beta$ . Cette hypertension est aussi associée à une calcification artérielle médiale et une augmentation de la rigidité vasculaire. Notre objectif était de déterminer l'importance de l'activité élastase et de la dégradation de la matrice dans le développement de la calcification artérielle médiale ou élastocalcinose.

L'hypertension systolique isolée est provoquée chez le rat wistar mâle par l'utilisation de la warfarine qui inhibe de la maturation de la protéine anti-calcifiante *matrix Gla protein* (MGP), induisant une élastocalcinose. Les paramètres hémodynamiques, l'accumulation de calcium, la dégradation de l'élastine, l'activité élastase et l'association de Smad2/3 et Smad 4 (cascade de signalisation du récepteur de TGF- $\beta$ ) ont été évalués entre 0 et 28 jours de traitement à la warfarine. Les métalloprotéinases, les sérine-protéases et les cytéine-protéases ont été bloquées afin d'évaluer leur implication relative dans la dégradation de l'élastine. L'inhibition des métalloprotéinases par la doxycycline a permis de considérer leur rôle dans le développement de l'élastocalcinose. Nous avons aussi utilisé un modèle d'élastocalcinose en culture d'aorte (modèle ex vivo) pour déterminer l'implication de TGF- $\beta$  dans la calcification, à l'aide du SB-431542, un inhibiteur de l'activité du récepteur de TGF- $\beta$ .

La calcification et la dégradation de l'élastine ont progressé parallèlement dans ce modèle animal pour atteindre des niveaux significatifs après 21 jours de traitement. L'activité de la MMP-9 et la liaison Smad2/3-Smad4 étaient augmentées de façon précoce, après 5 et 7 jours de traitement, respectivement. Ces augmentations étaient transitoires. Par ailleurs, la dégradation de l'élastine impliquait majoritairement les métalloprotéinases. L'inhibition de ces dernières par la doxycycline a permis de prévenir la calcification. Enfin, l'utilisation du SB-431542, dans le modèle ex vivo, a empêché la calcification.

Nous avons mis en évidence, dans ce modèle animal d'hypertension systolique isolée, la chronologie suivante : l'activation précoce de MMP-9, l'augmentation de la cascade de signalisation du récepteur de TGF- $\beta$ , l'apparition de l'élastocalcinose et finalement l'augmentation de la rigidité aortique. La modulation de la dégradation de la matrice pourrait représenter une nouvelle avenue thérapeutique dans la prévention de la rigidité artérielle et de l'hypertension systolique isolée.

### 3.2. Abstract

**Objective:** Isolated systolic hypertension is associated with increased elastase activity, vascular calcification and vascular stiffness. We sought to determine the importance of elastase activity and matrix degradation in the development of elastocalcinosis.

**Methods and Results:** Elastocalcinosis was induced in vivo and ex vivo using warfarin. Hemodynamic parameters, calcium amount, elastin degradation, TGF- $\beta$  and elastase activity were evaluated at different time points of the in vivo model. Metalloproteinases, serine proteases and cysteine proteases were blocked to measure their relative implication in elastin degradation. Gradual elastocalcinosis was obtained, and paralleled the elastin degradation pattern. MMP-9 activity was increased at 5 days of warfarin treatment, while TGF- $\beta$  was increased at 7 days. Calcification was significantly elevated after 21 days. Blocking metalloproteinases activation with doxycycline and TGF- $\beta$  signaling with SB-431542 were able to prevent calcification.

**Conclusions:** Early MMP-9 activation precedes the increase of TGF- $\beta$  signaling, and overt vascular elastocalcinosis and stiffness. Modulation of matrix degradation could represent a novel therapeutic avenue to prevent the gradual age-related stiffening of large arteries, leading to isolated systolic hyperetension.

#### Condensed abstract

The objective was to determine the importance and timing of matrix degradation in relation to elastocalcinosis associated with enhanced vascular stiffness. Matrix degradation and its cellular signaling are essential to elastocalcinosis and precede elastin fragmentation, overt calcification and enhanced vascular stiffness. These early events could represent means to limit stiffening of large arteries.

**Key words:** Elastocalcinosis, elastases, extracellular matrix, MMP-9, TGF- $\beta$

### 3.3. Introduction

With aging, alterations of the vascular structure and function occur, including medial arterial calcification (MAC or elastocalcinosis) and elastin degradation. These modifications induce gradual stiffening of arteries that contributes to the development of isolated systolic hypertension (ISH), the predominant type of hypertension in elderly patients.

Elastocalcinosis is characterized by a deposition of hydroxyapatite on the elastic lamellae of arteries. It occurs independently of atherosclerosis<sup>2</sup>. Until recently, it was considered as a passive process taking place with time. However, several studies demonstrated that vascular calcification is an active phenomenon controlled by serum and matrix proteins, such as matrix Gla protein<sup>3</sup>. Moreover, it involves phenotypic changes of vascular smooth muscle cells with the expression of bone-related proteins<sup>4</sup>.

Aging is associated with an increased collagen/elastin ratio explained in part by an enhanced degradation of elastin<sup>5, 6</sup>. Indeed, elastase activity, mainly by endopeptidases, including cysteine proteases, serine proteases and metalloproteinases, is increased with age in human aortas<sup>7</sup>. In the context of aging and vascular calcification, metalloproteinases, especially matrix metalloproteinases (MMPs), have been thoroughly studied. Investigations on the genetic mutations of MMPs demonstrated its contribution to age-related large artery stiffening<sup>8, 9</sup>. Furthermore, enhanced MMP-9 and MMP-2 levels and serum elastase activity were observed in patients with ISH and correlated independently with PWV<sup>10</sup>. Moreover, Qin *et al.* demonstrated, in an animal model, that matrix metalloproteinases inhibition with doxycycline and GM6001 decreased hydroxyapatite accumulation in the aorta<sup>11</sup>. All these results suggest that MMPs and elastin degradation are involved in MEC.

Elastin degradation induces the release of soluble elastin peptides and TGF- $\beta$ 1<sup>12</sup>. These peptides interact with elastin-laminin receptor (ELR)<sup>13</sup> and TGF- $\beta$  receptor, respectively. Simionescu *et al.* demonstrated that elastin peptides (through ELR) and TGF- $\beta$ 1 induced phenotypic changes of VSMCs with osteogenic responses<sup>14</sup>. Moreover, TGF- $\beta$  stimulated vascular cells with an osteogenic phenotype to calcify<sup>15</sup>.

Therefore, evidence is mounting that MMPs and elastin degradation are implicated in the calcification process. However, many questions remain unanswered. Indeed, we do not know the implication of MMPs in a physiopathological model that seems relevant to the human condition is not known. Moreover, when the enzymes intervene in the process is also an open question. Finally, do MMPs act alone or do other elastases also contribute? This study aimed at answering these uncertainties. Our working hypothesis is that elastase activity and extracellular matrix degradation are essential to the early development of arterial elastocalcinosis in ISH and that MMPs are not the only elastases implicated.

### **3.4. Methods**

#### **3.4.1. In vivo experiments**

##### **a. Treatments**

Male Wistar rats (initial weight of 175-200g, n = 6-20 per group) were obtained from Charles River Breeding Laboratories (St-Constant, Qc, Canada). They received warfarin (20 mg. kg<sup>-1</sup>. day<sup>-1</sup> in drinking water) and vitamin K (phylloquinone, 15 mg. kg<sup>-1</sup>. day<sup>-1</sup> sub-cutaneous injection) (WVK) during 1, 3, 5, 7, 14, 21 and 28 days. Dosages were adjusted every second day. Controls consisted of age-matched untreated rats (Ctrl). In additional rats, doxycycline, a non-selective MMP inhibitor, was administrated (30 mg. kg<sup>-1</sup>. day<sup>-1</sup>, in the food) during 14 days, from day 1 to day 14 (WVK<sub>28</sub>+Doxy<sub>1-14</sub>) or day 15 to day 28 (WVK<sub>28</sub>+Doxy<sub>15-28</sub>) and during 28 days (WVK<sub>28</sub>+Doxy<sub>1-28</sub>), concomitantly with 28 days of WVK. All animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of Université de Montréal.

##### **b. Hemodynamic parameters**

Animals were anesthetized with pentobarbital (65 mg/kg) and short catheters (polyethylene-50, approx. 10 cm, Folioplast SA, France) were inserted into the distal

abdominal aorta through the left femoral artery and into the aortic arch through the left carotid. Catheters were connected to a pressure transducer to allow the measurement of systolic (SBP) and diastolic blood pressures (DBP) at each location. Mean arterial blood pressure (MBP), as well as carotid and femoral pulse pressures (PP) were calculated from these parameters. Pulse wave velocity (PWV) was measured by the foot-to-foot method from the 2 signals, as previously described<sup>16</sup>. Finally, the aorta was harvested. Portions were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for calcium amount, western blot analysis and elastases activity evaluation. A section of aorta was fixed in 4% cacodylate-buffered paraformaldehyde and embedded in paraffin blocks for histological evaluation.

#### **c. Vascular wall composition**

To measure calcium content, sections of the aorta were dried at  $55^{\circ}\text{C}$  and calcium was extracted with 10% formic acid ( $30\ \mu\text{L}/\text{mg}$  of dry tissue) overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . The colorimetric quantification was achieved through a reaction with o-cresolphthalein (Teco Diagnostics, Anaheim CA, USA).

Fragmentation of the medial elastic fiber network (excluding the external and internal laminae) and calcium deposition were evaluated on  $7\text{-}\mu\text{m}$  thick sections stained with Weigert solution<sup>17</sup> and von Kossa, respectively. The number of elastin breaks was evaluated by a blinded observer.

#### **d. Elastases activity**

Proteins were extracted from aorta using 20 mM Tris HCl pH 7.5, 5mM EGTA, 150mM NaCl, 20mM Glycerophosphate, 10mM NaF, 1% Triton X-100, 0,1% Tween 20. Elastase activity was evaluated using EnzChek elastase activity assay kit (Molecular Probes by Invitrogen, Burlington, On, Canada). This kit contains DQ elastin that become fluorescent once digested by elastase and proteases. After incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  during 18 hours, the fluorimetric reaction was revealed at 505/515 nm. The results were normalized with porcine pancreatic elastase and expressed as elastolytic activity of pancreatic elastase equivalent units. In order to determine the different families of elastases involved, anti-

proteases were added to the samples: aprotinin (2 $\mu$ g/mL) for serine proteases, 1,10 phenanthroline (10mM) for metalloproteinases and E-64 (10 $\mu$ M) for cysteine proteases.

For western blot, immunoprecipitation and zymography analysis, proteins were extracted from rat aorta using 20mmol/L Tris HCl pH 7.5, 5mM EGTA, 150mM NaCl, 20mM Glycerophosphate, 10mM NaF, 1% Triton X-100, 1mM sodium orthovanadate, 0,1% Tween 20, 1  $\mu$ g/mL aprotinin and 1mM PMSF <sup>18</sup>.

#### **e. MMPs and TIMPs activity**

MMPs activity was measured by standard gelatin zymography. Sample, renaturation and incubation buffers were purchased from Biorad. SDS-polyacrylamide gels were incubated 36 hours at 37 °C. Active MMP-2 and MMP-9 were localized at 62kDa and 82 kDa respectively, and visualized as areas of lytic activity on an otherwise blue background. TIMPs activity was evaluated by reverse zymography. A mix of human MMP-2/MMP-9 (Chemicon Inc., Temecula, CA, USA) was incorporated into gelatin-containing zymogram gel at 0.13  $\mu$ g/mL <sup>19</sup>. Active TIMP-1 (27 kDa) and TIMP-2 (21 kDa) were visualized as undigested bands (dark blue) on an otherwise clear background. Activity was expressed in arbitrary units and normalized by control values (presented as 100).

#### **f. Western blot**

For western blot analysis, equal amounts of proteins (30  $\mu$ g), were resolved by electrophoresis on 12% PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Afterward, membranes were incubated overnight at 4°C with Cbfa-1 antibody (Chemicon, 1: 200 in 5% nonfat milk). Following 4 washes of 5 min with TTBS, membranes were incubated with anti-rabbit secondary antibody (New England BioLabs, Pickering, On, Canada) 1: 2000 for 45 minutes at room temperature. Immunoreactive bands were then revealed with ECL reactive (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Qc, Canada) using the Typhoon scanner 9410. A protein loading control was established using a  $\beta$ -actin antibody 1: 5000 (Sigma, Oakville, On, Canada).

For immunoprecipitation analysis, 350  $\mu\text{g}$  of protein extracts from rat aorta were incubated overnight at 4 °C with polyclonal Smad 2/3 antibody (New England BioLabs, 1: 100). The immune complexes were then collected with protein G sepharose beads. Binding of Smad 2/3 to Smad 4 was assayed by Western blot using Smad 4 antibody (New England BioLabs, 1: 1000) corrected by Smad 2/3 protein content.

### 3.4.2. Ex vivo experiments

Aortic segments of untreated Wistar rats were placed into DMEM (Hyclone by Fisher scientific, Whitby, On, Canada) containing 1.8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and 0.9 mM  $\text{PO}_4^{3-}$  with penicillin and streptomycin. Medium was maintained at 37°C in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere and changed every 2 days. In order to induce calcification, 10  $\mu\text{M}$  of warfarin was added to the medium. The concentration of  $\text{PO}_4^{3-}$  was increased to 3.8 mM, two days after the addition of warfarin. The aortic rings were placed in this medium with high  $\text{PO}_4^{3-}$  and warfarin during 4 days (CM). Thereafter, they were cleaned in PBS and frozen at -80°C or fixed in paraformaldehyde for paraffin sectioning. For viability staining, the aortic rings were incubated with 0.5 mg/mL methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) in DMEM for 3 hours at 37°C and washed in physiologic saline three times, and then embedded for frozen sectioning. Calcification was assessed by both von Kossa staining and colorimetric quantification.

In order to determine the implication of different families of elastases in vascular calcification, antiproteases were added to the media : aprotinin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for serine proteases, E-64 (10  $\mu\text{M}$ ) for cysteine proteases, 1,10 phenanthroline (10 mM) or doxycycline (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for metalloproteinases. Moreover, the addition of SB-431542 (10  $\mu\text{M}$ ), an inhibitor of activin receptor-like kinase, and of lactose (5 mM), an elastin-laminin receptor antagonist allowed to evaluate the involvement of TGF- $\beta$ 1 and elastin-derived peptides in this process.

### **3.4.3. Drugs and statistical analysis**

All drugs were purchased from Sigma Chemical Co. unless specified otherwise. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. An ANOVA followed by Bonferonni's correction was used to compare the groups. We used the one sample t test and fixed control values at 100 in zymography analysis.

## **3.5. Results**

### **3.5.1. In vivo experiments**

#### **a. Hemodynamic parameters**

WVK treatment induced isolated systolic hypertension after 28 days. This was associated with an enhanced pulse pressure, suggesting increased arterial rigidity. In fact, an elevated vascular stiffness was observed by measuring the pulse wave velocity, a blood pressure independent parameter. From this method, gradual stiffening (PWV) of the aorta was observed with WVK treatment, reaching significance after 21 days (Figure 1A), while the maximum value was obtained after 28 days of treatment.

#### **b. Vascular wall composition**

Calcium content in the aorta followed a similar pattern as the one observed for PWV. Indeed, a gradual increase of vascular calcification was observed from day 7 to day 28 of WVK treatment. This increase was significant after 21 days of WVK treatment. However, the maximum value was not obtained until the 4th week of treatment (Figure 1A). This calcium deposition was localized on the elastic lamellae (Figure 1B).

The breaks in the elastic network of the vascular wall perfectly matched the kinetic defined by vascular calcification. As demonstrated in Table 1, this parameter was also significantly increased compared to controls after 21 days of WVK treatment, and reached its maximum after 28 days.

### **c. Phenotypic changes**

In line with the increase in vascular calcification, we observed a time dependant increase in the expression of Cbfa-1 (n = 5 per group). The increase reached significance after 21 days ( $246 \pm 29\%$ ,  $p < 0.05$ ) and a maximum of expression at 28 days ( $259 \pm 44\%$ ,  $p < 0.05$ ).

### **3.5.2. Ex vivo model of elastocalcinosis**

To assess cell viability, aortic rings were incubated with MTT at the end of a six day culture period. The smooth muscle cells in the media of the vessels exposed to the calcifying media were stained. This did not differ from fresh aortas. Moreover, aortic rings exposed to a non-calcifying media presented a similar staining (data not shown). Incubation of aortic sections in DMEM with warfarin and high concentration of  $\text{PO}_4^{3-}$  induced a significant increase of calcium amount in vascular wall (Ctrl:  $0.35 \pm 0.05$  vs CM:  $4.41 \pm 1.08$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  of dry tissue,  $p < 0.05$ ). Von Kossa staining showed calcification on the elastin lamellae of aortas, incubated in calcifying media (Figure 1C).

### **3.5.3. Elastases in elastocalcinosis**

#### **a. Elastases activity in vivo**

Elastolytic activity was already increased after 7 days of WVK treatment, and the augmentation was significant and maximal after 14 days of WVK treatment (Figure 2A). At this time-point, 1,10-phenanthroline, the inhibitor of metalloproteinases, completely suppressed elastolytic activity (Figure 2B). However, serine and cysteine proteases inhibitors did not decrease significantly elastin degradation at 14 days. 1,10-phenanthroline reduced elastolytic activity at all time-points (data not shown).

### **b. Elastases implication *ex vivo***

Inhibition of different families of elastases demonstrated that only metalloproteinases seemed to be important in calcification, using our *ex vivo* model. Indeed, 1,10-phenanthroline and doxycycline, two nonselective inhibitors of metalloproteinases, significantly prevented calcification, whereas aprotinin and E-64 did not (Figure 2C).

### **c. MMPs and TIMPs activity *in vivo***

Gelatine zymography on aortic extracts allowed visualization of MMP-9 and MMP-2 activity. Whereas MMP-2 activity remained unchanged during WVK treatment, a transient and significant increase of MMP-9 activity was observed after 5 days of WVK treatment (Figure 3A). MMP-9 activity went back to a normal level at 14 days of WVK treatment. These variations of MMP activity were not associated with changes of TIMP-1 or TIMP-2 activity (data not shown).

The implication of metalloproteinases in the elastocalcinosis process was confirmed by doxycycline treatment in the rat model. When doxycycline was added to the WVK treatment, both calcium content (Figure 3B) and elastin fragmentation (Table 1) were significantly prevented with the three administrations regimen of doxycycline. However, only 28 days of doxycycline could successfully prevent the increase in vascular stiffness (Table 1). Indeed, administration of doxycycline for the first or second half of the WVK treatment had no effect on PWV. Moreover, 28 days of doxycycline partially reduced Cbfa-1 expression ( $45 \pm 22\%$ , ns).

### **3.5.4. TGF- $\beta$ signaling**

The activation of TGF- $\beta$  pathway, evaluated by smad 2/3 – smad 4 binding, increased in a rapid and transitory fashion. It reached significance as early as 7 days of WVK treatment and then returned to control levels (figure 4A).

The implication of some products of ECM degradation was evaluated with the use of lactose and SB-431542 (Figure 4B) *ex vivo*. This inhibitor of TGF- $\beta$  receptor activity prevented the increase of calcium deposition in our *ex vivo* model. However, lactose, an antagonist of elastin-derived peptides receptor, did not prevent aortic calcification. The association of lactose with SB-431542 produced a reduction of calcium amount similar to the one induced by SB-431542 alone.

### 3.6. Discussion

Herein, we establish a time course of extracellular matrix events taking place in the development of elastocalcinosis and vascular stiffness. Our results suggest an essential implication of early MMP-9 and TGF- $\beta$  activation, in the process.

WVK treatment *in vivo* increased SBP without DBP change, thus increasing PP. This was associated with increased calcification and elastin degradation, which were accompanied by increased PWV. Since these changes occur in humans with ISH<sup>16,20</sup>, these data lend support to the validity of our model. However, a surprising observation was the transitory fall in PWV in WVK<sub>7</sub> rats compared to controls. This could be explained by the early activation of elastases, such as MMP-9, which could trigger matrix degradation prior to calcification, thus “loosening” the vascular walls. Interestingly, elastic arteries show two physical changes during aging. Before stiffening, arteries dilate. O’Rourke et al suggested that this dilation could be a consequence of fracture of elastic lamellae. Through a transfer of stresses to collagen, this fracture could participate also to arterial stiffening<sup>21</sup>.

Elastin presents a high affinity for calcium<sup>22</sup>. Seligman et al. demonstrated that elastin mineralization *in vitro* increased with the age of the individual from whom the vessel was obtained<sup>23</sup>. This was associated with an augmentation of polar amino acids in the older elastin samples<sup>23-25</sup>. Moreover, mineralized elastin was associated with a higher content of N-terminal amino acids, indicative of its degradation<sup>6</sup>. Therefore, elastin degradation seems to favor calcification through an increase of polarity, which enhances elastin affinity for calcium. The close association between elastin breaks and calcification observed in the present study lends support to this concept.

The degradation of elastin requires elastase activation. In our *in vivo* model of elastocalcinosis, we observed such an increase after only one week of WVK treatment, significant after two weeks of treatment. This elastase activity was persistently reduced by 1,10 phenanthroline, suggesting the implication of metalloproteinases. Among metalloproteinases, the metzincins and especially the matrix metalloproteinases (MMPs) are the most studied. The involvement of MMPs in vascular calcification and elastin degradation has already been studied. Indeed, Bailey et al showed that pretreating elastin with  $\text{AlCl}_3$  not only prevented its degradation by decreasing the activity of MMPs, but also prevented its subsequent calcification<sup>26</sup>. Furthermore, Basalyga demonstrated, in an arterial injury model involving the periarterial application of calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ), that MMP knock-out mice were resistant to elastin degradation and calcification<sup>27</sup>. Thus, the role of MMPs in the calcification process was suspected. Herein, we demonstrated that WVK treatment increased selectively MMP-9 activity in an acute and transient fashion, after only 5 days. Indeed, no change to MMP-2 activity was observed. Our results of elastin DQ degradation with aortic extracts of WVK treated animals suggested no implication of cysteine and serine proteases in the process of elastocalcinosis. These results were confirmed with the model of elastocalcinosis *ex vivo* (cultured aortas in calcifying media: warfarin and  $\text{PO}_4^{3-}$ ). In this *ex vivo* model, aprotinin was used to block serine proteases, E-64 to inhibit cysteine proteases and 1,10-phenanthroline and doxycycline to reduce metalloproteinases activity. Only the metalloproteinase inhibitors were able to prevent calcification, thus strengthening their implication in the process. However, we cannot exclude a direct binding of metalloproteinases inhibitors to calcium cation.

Recently, the implication of MMPs in calcification was also demonstrated in a vitamin D3 model, where their inhibition with either doxycycline or GM6001 prevented vascular calcification<sup>11</sup>. Several mechanisms have been proposed for the actions of doxycycline, a tetracycline, on the extracellular matrix : direct inhibition of the enzyme, downregulation of gene transcription and alteration of enzyme processing associated with pro-MMP activation<sup>28, 29</sup>. In our experiments, doxycycline prevented the development of calcification and elastin degradation when used during two weeks or during the whole

duration of WVK treatment, confirming the central role of MMPs. However, only 28 days of doxycycline prevented the PWV increase, suggesting that not only elastin degradation and calcification are implicated in arterial stiffness, but also fibrosis could intervene in this process, thus increasing stiffness. Fibrosis implication in vascular stiffness has previously been observed in our laboratory<sup>30</sup>.

As mentioned earlier, degraded elastin presents an increased affinity for calcium. However, extracellular matrix degradation also induces the release of soluble elastin peptides and TGF- $\beta$ <sup>12</sup> that can influence the process of elastocalcinosis. Soluble elastin peptides present biological effects mediated by the ELR; leading to phenotypic changes characterized by the synthesis of bone proteins like type I collagen<sup>31</sup> and Cbfa-1<sup>14</sup>. TGF- $\beta$  is a potent multifunctional regulator of cell growth and differentiation. TGF- $\beta_1$ , a member of the TGF- $\beta$  superfamily, induces different cellular responses, including stimulation of osteogenesis<sup>32</sup>. Following TGF- $\beta$  binding to its receptor, the associated kinase, target of SB-431542, is activated and phosphorylates Smads. Once phosphorylated, Smad-2/3 interacts with co-Smad or Smad-4. This complex moves into the nucleus to stimulate the transcription of several target genes<sup>33</sup>. Smads interact with Runx2/ Cbfa1, a transcription factor required in osteoblast gene expression, to increase its transactivation ability<sup>34,35</sup>. In the present experiments, a transient increase of Smad2/3-4 complex formation was observed early during the process of elastocalcinosis (after 7 days of WVK treatment), suggesting an enhanced stimulation of target genes, like Cbfa1. Although the current study does not show an increased transcriptional activity of Cbfa-1, we observed a significant increase of its expression after 3 weeks of WVK treatment, revealing a phenotypic modification in the vascular wall. Therefore, our results support a role for TGF- $\beta$  in elastocalcinosis as suggested by Simionescu et al<sup>14</sup>. Indeed, experiments in the *ex vivo* model demonstrated that TGF- $\beta$  inhibition prevented vascular calcification. In contrast to evidence also presented by Simionescu, the elastin laminin receptor was not crucial for vascular calcification, since lactose, an ELR antagonist, had no effect on aortic elastocalcinosis. It is important to mention here that our *ex vivo* aortas maintained viability

in culture, as determined with MTT, and that Von Kossa staining revealed the same calcification localization as our in vivo model experiments.

In summary, during the process of vascular medial elastocalcinosis, we observed acute MMP-9 activation, closely followed by TGF- $\beta$  activation. Then, a phenotypic change of VSMCs occurred, associated with progressive increases of medial calcification and elastin fragmentation. Ex vivo experiments confirmed the crucial role played by these two elements. The other elastases evaluated (cystein and serine proteases) were not implicated in elastocalcinosis nor elastin degradation. Thus, this study brings to light a sequence of events leading, through several pathophysiological processes, to enhanced vascular stiffness and isolated systolic hypertension. This better understanding of the pathological process leading to large artery stiffness is crucial to allow the development of new therapies targeted at the arterial wall.

### **3.6.1. Acknowledgement**

We acknowledge the skilled technical assistance of Louise Ida Grondin and are thankful for the support of the Canadian Institutes for Health Research. CB received a studentship from the Rx&D/CIHR. PM and DdB are scholars from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

### 3.7. References

1. Dao HH, Essalihi R, Bouvet C, et al. Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc Res*. May 1 2005;66(2):307-317.
2. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, et al. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation*. Nov 23 1999;100(21):2168-2176.
3. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Sep 1998;18(9):1400-1407.
4. Shanahan CM, Proudfoot D, Tyson KL, et al. Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification. *Z Kardiol*. 2000;89 Suppl 2:63-68.
5. Fulop T, Jr., Douziech N, Jacob MP, et al. Age-related alterations in the signal transduction pathways of the elastin-laminin receptor. *Pathol Biol (Paris)*. May 2001;49(4):339-348.
6. Spina M, Garbin G. Age-related chemical changes in human elastins from non-atherosclerotic areas of thoracic aorta. *Atherosclerosis*. Jul-Aug 1976;24(1-2):267-279.
7. Hornebeck W, Derouette JC, Roland J, et al. [Correlation between age, arteriosclerosis and elastolytic activity of human aorta wall]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. Jun 14 1976;282(22):2003-2006.

8. Medley TL, Kingwell BA, Gatzka CD, et al. Matrix metalloproteinase-3 genotype contributes to age-related aortic stiffening through modulation of gene and protein expression. *Circ Res*. Jun 13 2003;92(11):1254-1261.
9. Medley TL, Cole TJ, Dart AM, et al. Matrix metalloproteinase-9 genotype influences large artery stiffness through effects on aortic gene and protein expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Aug 2004;24(8):1479-1484.
10. Yasmin, McEniery CM, Wallace S, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Feb 2005;25(2):372.
11. Qin X, Corriere MA, Matrisian LM, et al. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jul 2006;26(7):1510-1516.
12. Hindson VJ, Ashworth JL, Rock MJ, et al. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: identification of amino- and carboxy-terminal cleavage sites. *FEBS Lett*. Jun 11 1999;452(3):195-198.
13. Labat-Robert J. Cell-matrix interactions in aging: role of receptors and matricryptins. *Ageing Res Rev*. Apr 2004;3(2):233-247.
14. Simionescu A, Philips K, Vyavahare N. Elastin-derived peptides and TGF-beta1 induce osteogenic responses in smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 26 2005;334(2):524-532.
15. Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, et al. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest*. May 1994;93(5):2106-2113.

16. Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, et al. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am J Hypertens*. Feb 2003;16(2):103-110.
17. Gaillard V, Casellas D, Seguin-Devaux C, et al. Pioglitazone improves aortic wall elasticity in a rat model of elastocalcinotic arteriosclerosis. *Hypertension*. Aug 2005;46(2):372-379.
18. Tronc F, Mallat Z, Lehoux S, et al. Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Dec 2000;20(12):E120-126.
19. Bendeck MP, Nakada MT. The beta3 integrin antagonist m7E3 reduces matrix metalloproteinase activity and smooth muscle cell migration. *J Vasc Res*. Nov-Dec 2001;38(6):590-599.
20. Essalihi R, Dao HH, Gilbert LA, et al. Regression of medial elastocalcinosis in rat aorta: a new vascular function for carbonic anhydrase. *Circulation*. Sep 13 2005;112(11):1628-1635.
21. O'Rourke MF, Hashimoto J. Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J Am Coll Cardiol*. Jul 3 2007;50(1):1-13.
22. Rucker RB. Calcium binding to elastin. *Adv Exp Med Biol*. 1974;48(0):185-209.
23. Seligman M, Eilberg RF, Fishman L. Mineralization of elastin extracted from human aortic tissues. *Calcif Tissue Res*. Jun 2 1975;17(3):229-234.
24. Lansing AI, Rosenthal TB, Alex M, et al. The structure and chemical characterization of elastic fibers as revealed by elastase and by electron microscopy. *Anat Rec*. Dec 1952;114(4):555-575.

25. Nejjar I, Pieraggi MT, Thiers JC, et al. Age-related changes in the elastic tissue of the human thoracic aorta. *Atherosclerosis*. Jan 1990;80(3):199-208.
26. Bailey M, Pillarisetti S, Jones P, et al. Involvement of matrix metalloproteinases and tenascin-C in elastin calcification. *Cardiovasc Pathol*. May-Jun 2004;13(3):146-155.
27. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, et al. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation*. Nov 30 2004;110(22):3480-3487.
28. Ryan ME, Ashley RA. How do tetracyclines work? *Adv Dent Res*. Nov 1998;12(2):149-151.
29. Uitto VJ, Firth JD, Nip L, et al. Doxycycline and chemically modified tetracyclines inhibit gelatinase A (MMP-2) gene expression in human skin keratinocytes. *Ann N Y Acad Sci*. Sep 6 1994;732:140-151.
30. Essalihi R, Zandvliet ML, Moreau S, et al. Distinct effects of amlodipine treatment on vascular elastocalcinosis and stiffness in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens*. Sep 2007;25(9):1879-1886.
31. Tummalapalli CM, Tyagi SC. Responses of vascular smooth muscle cell to extracellular matrix degradation. *J Cell Biochem*. Dec 1 1999;75(3):515-527.
32. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, et al. Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr Rev*. Feb 1994;15(1):27-39.
33. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. Dec 4 1997;390(6659):465-471.

34. Zhang YW, Yasui N, Ito K, et al. A RUNX2/PEBP2alpha A/CBFA1 mutation displaying impaired transactivation and Smad interaction in cleidocranial dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 12 2000;97(19):10549-10554.
35. Lee KS, Kim HJ, Li QL, et al. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol*. Dec 2000;20(23):8783-8792.

### 3.8. Figures legend

**Figure 1:** (A) Gradual calcification (squares) and vascular stiffening (PWV, diamonds) in the warfarin/vitamin K model. \*P < 0.05 vs Ctrl. Von Kossa staining in aorta of a rat treated with WVK during 28 days (B) and in aorta treated with calcifying medium during 4 days (C). L : lumen; M: media; A: adventitia

**Figure 2:** (A) Total elastase activity during elastocalcinosis development. (B) Elastin degradation at 14 days of WVK treatment, with or without elastase inhibitors. \*P < 0.05 vs Ctrl, #P < 0.05 vs Total. (C) Effects of elastase inhibitors on ex vivo elastocalcinosis. Ctrl: control, CM: calcifying medium, treatment with 3.8 mM PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> and 10 μM warfarin during 4 days, aprotinin: 2 μg/mL of aprotinin associated with CM, E-64: 10 μM of E-64 associated with CM, 1,10-phenant: 1mM of 1,10-phenanthroline with CM and doxycycline: 100 μg/mL of docycycline with CM. \*P < 0.05 Ctrl, ∞ P < 0.05 vs CM.

**Figure 3:** (A) Kinetic of MMP-9 (filled squares) and MMP-2 activity (filled triangles). (B) Prevention of calcification by doxycycline. Ctrl: control; WVK<sub>28</sub>: warfarin/vitamin K treatment for 28 days; WVK<sub>28</sub> + Doxy<sub>1-14</sub>: doxycycline treatment for the first half of WVK<sub>28</sub>; WVK<sub>28</sub> + Doxy<sub>15-28</sub>: doxycycline treatment for the second half of WVK<sub>28</sub>; WVK<sub>28</sub> + Doxy<sub>1-28</sub>: doxycycline added to the WVK treatment for 28 days. \*P < 0.05 vs Ctrl, #P < 0.05 vs WVK<sub>28</sub>.

**Figure 4:** Involvement of degradation products of the extracellular matrix in elastocalcinosis. (A) TGF-β activity during the development of elastocalcinosis. \*P < 0.05

vs Ctrl. **(B)** Effect of TGF- $\beta$  inhibitor and ELR antagonist on ex vivo calcification. Ctrl: control; CM: calcifying medium; SB: 10  $\mu$ M of SB-431542 associated with CM; lactose: 5 mM of lactose associated with CM; SB + lactose: combination of SB-431542 and lactose in CM. \*P < 0.05 vs Ctrl,  $\infty$ P < 0.05 vs CM.

### 3.9. Table

**Table 1:** Hemodynamic parameters and elastin breaks.

	Ctrl	WVK <sub>7</sub>	WVK <sub>14</sub>	WVK <sub>21</sub>	WVK <sub>28</sub>	WVK <sub>28</sub> <sup>+</sup> Doxy <sub>1-14</sub>	WVK <sub>28</sub> <sup>+</sup> Doxy <sub>14-28</sub>	WVK <sub>28</sub> <sup>+</sup> Doxy <sub>1-28</sub>
n=	20	20	20	20	20	8	11	6
SBP mmHg	141±3	132±3	140±5	141±4	155±4*	160±8	153±4	141±7
DBP mmHg	104±3	95±4	95±4	100±3	105±3	113±7	113±4	104±7
MBP mmHg	119±2	107±4*	112±4	113±3	123±3	134±5	126±4	116±7
PP mmHg	38±2	37±2	45±2*	43±2	50±2*	47±3	40±2#	35±2#
PWV cm/s	571±8	498±10*	578±15	618±13*	693±17*	711±26	678±18	605±37#
Elastin breaks/ 10 <sup>4</sup> µm <sup>2</sup>	0.14±0.05	0.22±0.07	0.34±0.10	0.59±0.09*	0.66±0.10*	0.16±0.04#	0.21±0.05#	0.20±0.04#

Ctrl: control; WVK<sub>x</sub>: x days of warfarin/vitamin K treatment; Doxy: doxycycline treatment for 14 or 28 days in association with 28 day WVK treatment. \*  $P < 0.05$  vs Ctrl; #  $P < 0.05$  vs WVK<sub>28</sub>. ANOVA followed by Bonferroni's correction for multiple comparisons.

### 3.10. Figures

Figure 1

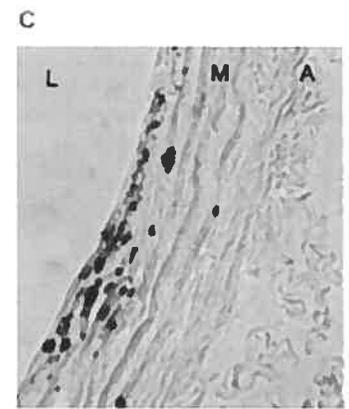
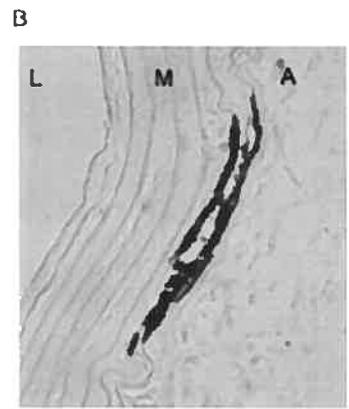
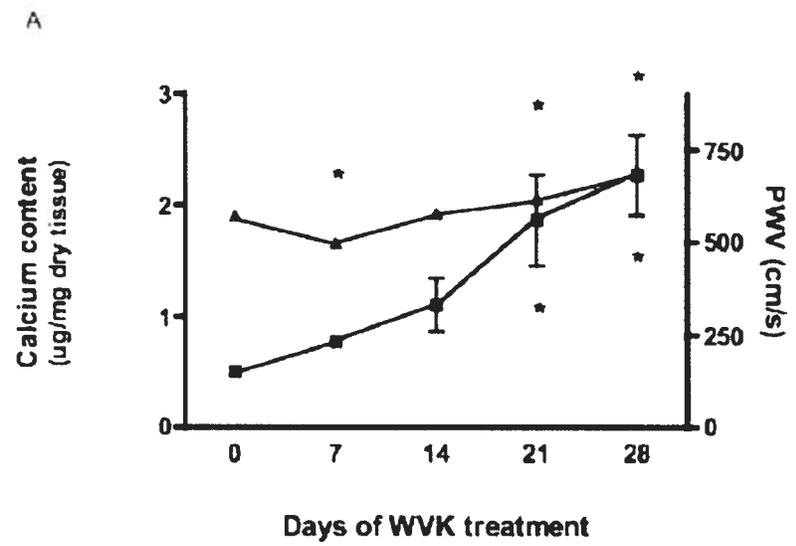


Figure 2

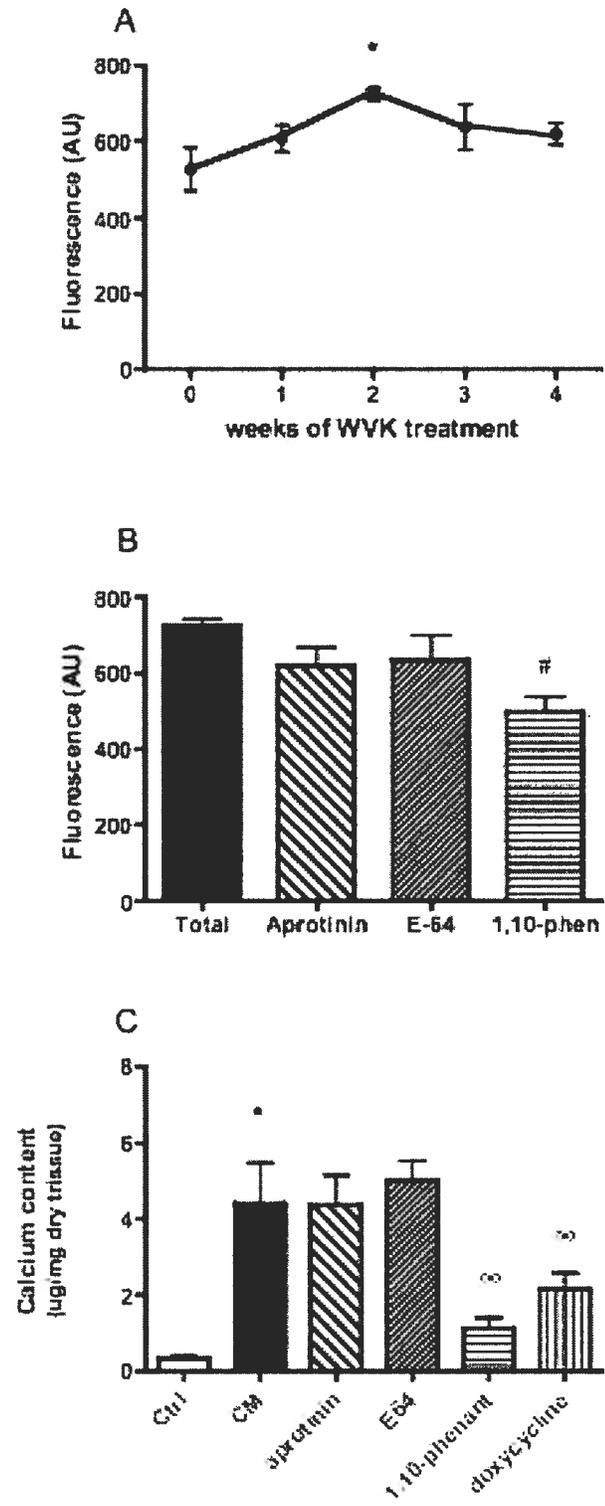


Figure 3

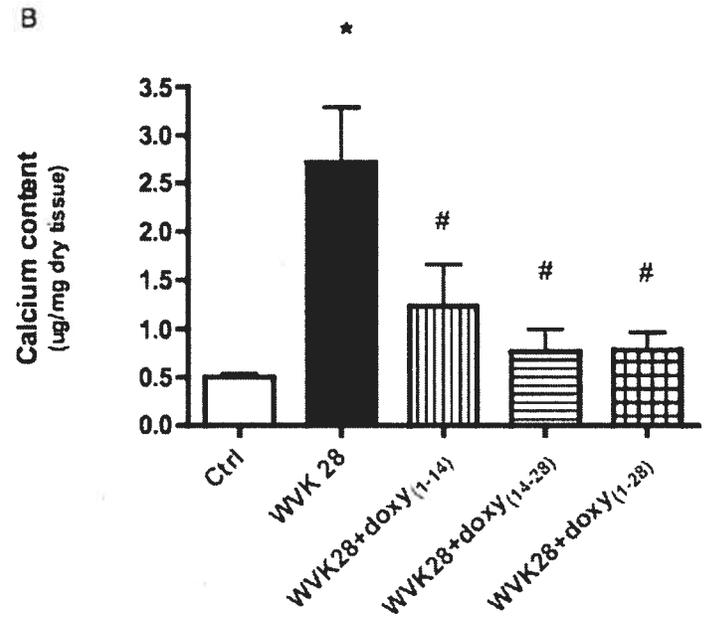
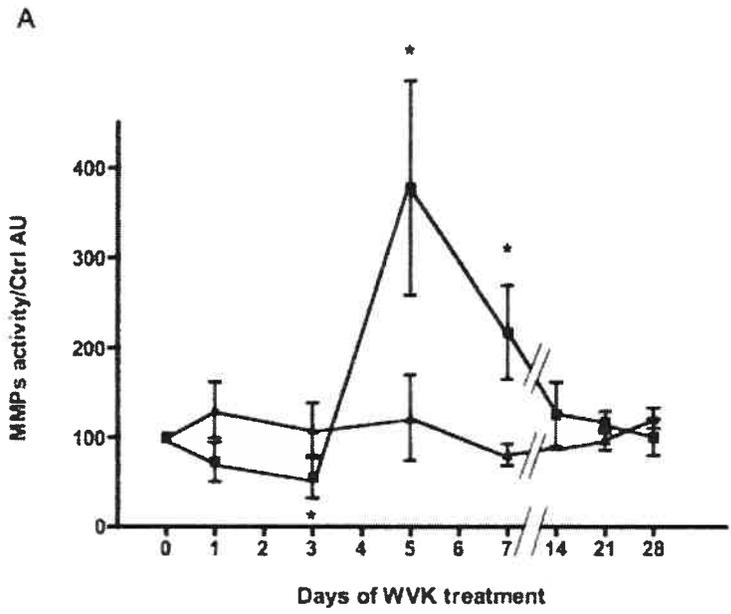
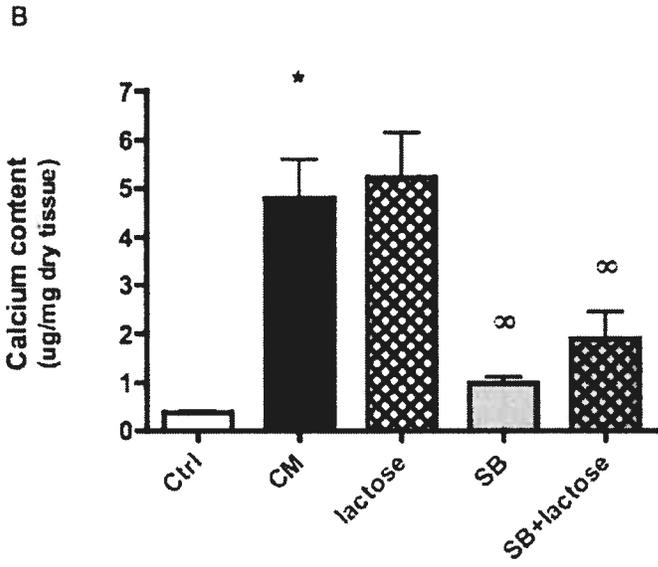
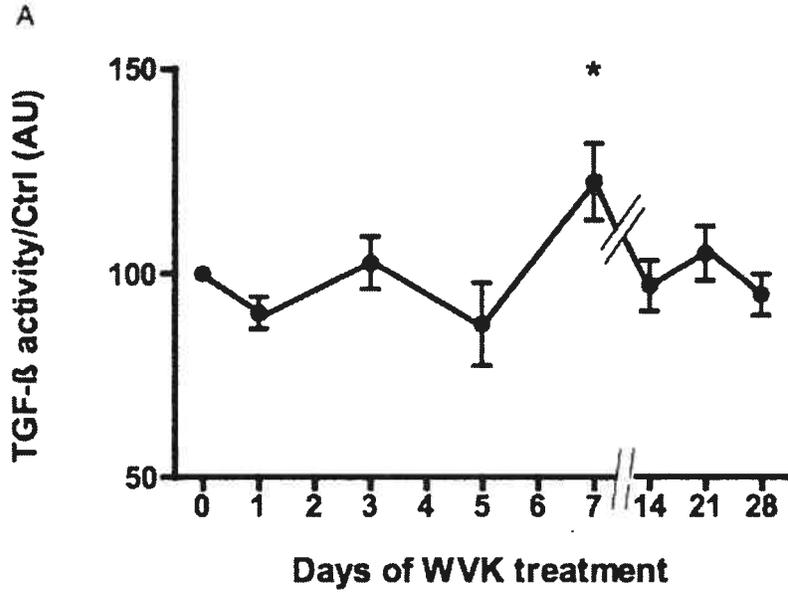


Figure 4



## 4. A new rat model of diabetic macrovascular complication

Cardiovascular research 2007; 73(3) : 504-11.

Céline Bouvet <sup>1</sup>, Wouter Peeters \*<sup>2</sup>, Simon Moreau \*<sup>1</sup>, Denis deBlois <sup>3</sup> & Pierre Moreau <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Québec, Canada

<sup>2</sup> Department of Nephrology, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands

<sup>3</sup> Department of pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Québec, Canada

\* Those authors contributed equally to the project.

*Le premier auteur a contribué majoritairement aux travaux de cette étude (90% du travail).  
Les deuxième et troisième auteurs ont participé à l'étude à hauteur de 10% de l'ensemble du travail.*

**Condensed title:** Bouvet et al.: acceleration of elastocalcinosis by diabetes

## 4.1. Résumé

La calcification artérielle médiale ou élastocalcinose est un processus physiologique associé au vieillissement. En présence de diabète, ce processus est accéléré et apparaît en premier lieu dans les artères distales. Notre but était de créer un modèle animal associant élastocalcinose et diabète afin de vérifier expérimentalement si le diabète accélère l'élastocalcinose.

Des rats wistar mâles ont reçu une diète riche en lipides durant 2 mois suivie d'une injection de streptozotocine (30 mg/kg/jr) pour induire un diabète (D). L'élastocalcinose était facilitée par un traitement de warfarine et de vitamine K (WVK) pendant 3 semaines. Ce traitement était débuté 1 semaine (D4WVK) ou 4 semaines (D7WVK) après l'injection de streptozotocine. Ce même traitement était administré à des rats sains du même âge. Les paramètres hémodynamiques, métaboliques, l'accumulation de calcium au niveau de l'aorte et des artères mésentériques ont été mesurés. En outre, la présence de phosphatase alcaline, d'ostéopontine, de TNF- $\alpha$  et de TGF- $\beta$  dans la paroi artérielle a été évaluée par immunohistochimie.

Les 3 semaines de traitement WVK chez les rats sains n'ont pas permis d'augmenter les niveaux de calcium dans l'aorte ou les artères fémorales. Seule la calcification des artères fémorales étaient significativement augmentées dans le groupe D7WVK. Dans les artères fémorales, on pouvait observer une présence importante de phosphatase alcaline et d'ostéopontine. Les rats du groupe D4WVK ne présentaient aucune augmentation de leur niveau de calcification, ni de l'expression de ces protéines. L'expression de TNF- $\alpha$  et de TGF- $\beta$  étaient accrues au niveau de l'adventice des artères fémorales de tous les rats diabétiques.

Nous avons établi un modèle d'accélération de l'élastocalcinose reliée à la durée du diabète et localisée au niveau des artères distales. Par ailleurs, les modifications locales de l'expression de certaines protéines concordent avec les résultats cliniques présentés dans la

littérature médicale. Donc, notre modèle pourrait être utilisé pour étudier les mécanismes associés à l'accélération de l'élastocalcinose par le diabète.

## 4.2. Abstract

**Objectives :** Age-related medial calcification (elastocalcinosis) of large arteries is accelerated in diabetes and appears mainly in distal arteries. The aim was to devise a rat model of elastocalcinosis in association with diabetes to examine the hypothesis that diabetes accelerates vascular calcification experimentally.

**Methods :** Male Wistar rats received a high fat diet during 2 months followed by a low dose of streptozotocin to induce diabetes (D). Elastocalcinosis was facilitated by 3 weeks of treatment with warfarin and vitamin K (WVK). We started WVK treatment 1 week (D4WVK) and 4 weeks (D7WVK) after the injection of streptozotocin and in age-matched healthy rats. Measurements of hemodynamic and metabolic parameters, aortic and femoral calcium content, and immunohistochemistry for alkaline phosphatase, osteopontin, tumor necrosis factor (TNF)-alpha, and transforming growth factor (TGF)-beta were performed.

**Results :** Three weeks of WVK treatment alone did not increase the calcium content in aorta and femoral arteries. However, in the D7WVK group, femoral calcification, but not aortic calcium content, increased significantly as compared to the WVK group. This response was not observed in the D4WVK group. In femoral arteries, strong immunostaining for alkaline phosphatase and osteopontin was observed in the D7WVK group. TNF-alpha and TGF-beta expressions were mainly localized in the adventitia of arteries from diabetic rats.

**Conclusion :** We have established a model of accelerated elastocalcinosis in diabetes related to its duration and localized in distal arteries. The modification of local protein expression is also in accordance with clinical data, suggesting that this model could be useful to investigate mechanisms related to this important clinical macrovascular complication of diabetes.

### 4.3. Introduction

The prevalence of diabetes is estimated to be 2.8% of the global population, gradually reaching epidemic proportions [1]. Patients with type 2 diabetes present a 2-3 fold increased risk of cardiovascular diseases as compared to the general population [2]. Diabetes induces several complications, including vascular alterations that represent the principal cause of morbidity and mortality. One of the macrovascular complications associated with diabetes is an increase of vascular stiffness, as evidenced by reduced arterial compliance [3], and enhanced pulse wave velocity (PWV), pulse pressure (PP) and systolic blood pressure (SBP) [4, 5]. In fact, the elevation of PP occurs approximately twenty years earlier in diabetic patients as compared to non diabetics [6].

Medial elastocalcinosis (MEC or medial arterial calcification) differs from intimal calcification associated with advanced atherosclerotic lesions. It is characterized by a deposition of calcium-containing minerals on a fragmented elastic network in large arteries [7]. The medial form of ectopic calcification is associated with increased vascular stiffness and is emerging as the most important predictor of cardiovascular mortality in type 2 diabetic patients [8, 9]. Moreover, the extent of MEC is related to the duration and the severity of diabetes [10] and, at least in early stages, it appears to be mainly located in lower limbs [11].

Although vascular calcification was previously believed to be a passive phenomenon, there is mounting evidence suggesting that it is a regulated process involving the expression of mineralization-regulating proteins in the vascular wall [12-14]. For example, osteopontin (OPN), a noncollagenous protein binding calcium and hydroxyapatite in bone and teeth, is present in calcified atherosclerotic lesions, as well as in MEC [15]. Furthermore, Shanahan *et al.* demonstrated that alkaline phosphatase expression, an enzyme responsible for hydroxyapatite formation, was markedly elevated in intimal and

medial forms of calcification [16]. In addition, osteopontin, type I collagen, bone sialoprotein, osteonectin (SPARC), osteocalcin and alkaline phosphatase were reported to be upregulated and strongly associated with medial calcification in diabetes [17, 18].

Matrix Gla protein (MGP) is a noncollagenous protein preventing the deposition of calcium minerals in the vascular wall [19, 20]. Its activity depends on the  $\gamma$ -carboxylation of glutamic acid residues, a vitamin K-dependent process. Warfarin, which inhibits the recycling of vitamin K, has been shown to lead to MEC by inhibiting MGP activation [20]. Phylloquinone (vitamin K1) administration allows the carboxylation of coagulation factors in the liver, but not the carboxylation of MGP in the arterial wall [21]. The relevance of the warfarin-vitamin K1 model (WVK) to diabetic patients comes from the observation that MGP is reduced in arteries from these patients [18]. However, this model does not exhibit the metabolic abnormalities found in diabetes. The aim of the present study was to evaluate the effect of combining experimental diabetes with WVK administration in order to examine the hypothesis that diabetes accelerates vascular calcification.

## 4.4. Methods

### 4.4.1. Treatments

Male Wistar rats (3-4 weeks old) were obtained from Charles River Breeding Laboratories (St-Constant, Qc, Canada). They were fed a high fat diet containing 45 kcal % fat (soybean oil and lard that included 0.95 mg cholesterol by g of lard), 35 kcal % carbohydrates and 20 kcal % protein (Research diets, D12451) *ad libidum* during 8 weeks, followed by a single low dose of streptozotocin (STZ, 30 mg/kg intra-peritoneally). Rats were then allowed to develop diabetes for 4 (D4) and 7 (D7) weeks. **Figure 1** depicts the treatment protocols. Half of these groups were treated with the calcification regimen for the last 3 weeks. Thus, warfarin ( $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$  in drinking water) and vitamin K (phylloquinone,  $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$  sub-cutaneous injection) were administered, starting one (D4WVK) or 4 weeks (D7WVK) after STZ injection. Dosages were adjusted every

second day. At the end of treatments, rats were 16 (D4, D4WVK) and 19 (D7, D7WVK) weeks old. Controls consisted of age-matched untreated rats (because the values for each parameter were not statistically different, they were pooled for presentation clarity). In addition, 13 week-old rats were treated for 3 weeks with a WVK treatment (WVK group).

The Animal Care and Use Committee of Université de Montréal approved all animal experiments that comply with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

#### **4.4.2. Hemodynamic parameters**

Twelve hours before sacrifice, food was removed. Animals were anesthetized with pentobarbital (65 mg/kg) and short catheters (polyethylene-50, approx. 10 cm, Folioplast SA, Sarcelles, France) were inserted into the distal abdominal aorta through the left femoral artery and into the aortic arch through the left carotid. Catheters were connected to a pressure transducer to allow the measurement of systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) at each location. Mean arterial blood pressure (MBP), carotid and femoral pulse pressures (PP) were calculated from these parameters. Pulse wave velocity (PWV) was measured by the foot-to-foot method, as previously described [22]. The femoral catheter was used to collect arterial blood. Finally, the aorta and the femoral arteries were harvested. Portions were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for calcium amount. A section of femoral arteries was fixed in 4% cacodylate-buffered paraformaldehyde and embedded in paraffin blocks for immunohistochemistry.

#### **4.4.3. Metabolic parameters**

Before sacrifice, glycemia was quantified on a sample of arterial blood with a glucometer (AccuSoft Advantage, Roche, Laval, Qc, Canada). A 1 mL blood sample was collected in a tube containing EDTA. Plasma was extracted by a 10 min centrifugation at

3000 rpm. Insulinemia was measured with a radioimmunoassay kit (Rat insulin RIA kit, Linco Research, St-Charles, MO, USA) and cholesterol and triglyceride amounts with a colorimetric kit (Cholesterol and Triglycerides Infinity, ThermoElectron corporation, Melbourne, Australia).

#### **4.4.4. Vascular composition**

To measure calcium content, portions of aorta and femoral arteries were dried at 55°C and calcium was extracted with 10% formic acid (30 µL/mg of dry tissue) overnight at 4°C. The colorimetric quantification was achieved through a reaction with o-cresolphthalein (Teco Diagnostics, Anaheim, CA, USA).

For immunohistochemistry, sections of paraffin-embedded femoral arteries (7µm thickness) were mounted on glass slides and deparaffinized with xylene, followed by hydration in graded concentrations of ethanol. Each tissue section was incubated overnight at room temperature with primary antibodies. In order to assess the phenotypic changes, antibodies against either tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) or osteopontin (OPN, courtesy of Dr Larry W. Fisher, National Institutes of Health, MD, USA) were used. Elastin degradation was evaluated with an antibody against TGF-β (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, Ca, USA) and inflammation was estimated with an antibody against tumor necrosis factor-alpha (TNF-α, US biological, Swampscott, MA, USA). After washing, primary antibodies were incubated with appropriate secondary antibody conjugated to biotin. Biotin was detected with a Vectastain ABC-AP kit (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA) and color development was achieved with Fast Red TR/Naphthol AS-MX phosphate alkaline phosphatase substrate with 1 mM levamisole. Adjacent slices were stained with the von Kossa protocol to localize calcium deposition. Slices from the tibia of untreated rats were used as positive controls for phenotypic changes and TGF-β, while the spleen of rats treated with LPS served as a positive control of inflammation. For negative controls, the primary antibody was omitted.

#### 4.4.5. Drugs and statistical analysis

All drugs were purchased from Sigma Chemical Co. (Oakville, On, Canada) unless specified otherwise. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. An ANOVA followed by Bonferonni's correction was used to compare the groups. Since our aim was to determine the effect of diabetes on calcification, *a priori*-selected comparisons were: WVK group compared to respective control (without WVK group) and diabetes + WVK compared to WVK alone. Since 5 comparisons were selected, *P* had to be smaller than 0.01 (0.05 / 5) in individual comparisons to reach significance.

### 4.5. Results

Two months of high fat diet associated with an injection of a low dose of STZ induced a significant increase of glycemia, which progressed from 4 to 7 weeks after STZ injection (**table 1**). Although insulinemia was mildly reduced after 4 weeks of diabetes, rats that were studied after 7 weeks of diabetes exhibited a marked reduction of plasma insulin levels. In general, the WVK treatment did not modify these metabolic responses (**table 1**). Cholesterol was not elevated in rats receiving the high fat diet (diabetic groups). However, WVK treatment modified the cholesterol profile in an inconsistent manner: cholesterol was reduced by WVK in non-diabetic rats, but elevated in 4-week diabetic rats. Triglycerides were elevated only in rats having diabetes for 7 weeks and this was abrogated by WVK treatment (**table 1**).

Three weeks of WVK treatment resulted in a small but not significant elevation of calcium content in the aorta that reached significance in the D7WVK group (**figure 2A**). Furthermore, femoral elastocalcinosis was not elevated by WVK alone, but it was significantly increased in rats that had diabetes for 4 weeks before starting the WVK treatment (D7WVK group, **figure 2B**). In contrast, one week of diabetes prior to WVK treatment (D4WVK group) did not produce calcification. Von Kossa staining revealed that

femoral calcification in the D7WVK group was localized in the media, with a dotted distribution (**figure 3**). These calcification spots appeared adjacent to elastin filaments.

Immunohistochemistry of TNAP revealed that this enzyme was not detectable in femoral sections from control rats (**figure 4**). Seven weeks of diabetes (D7 group) or 3 weeks of WVK (WVK group) produced a slight but consistent staining for alkaline phosphatase. Femoral arteries from rats of the D7WVK group revealed a marked staining throughout the arterial wall. Osteopontin staining demonstrated a similar pattern: mild staining in WVK or diabetic rats, but more intense staining in the D7WVK group (**figure 5**). Interestingly, OPN staining appeared more intense in the adventitia of femoral arteries during diabetes. TGF- $\beta$  was not detected in control rats but it was strongly expressed in the adventitia of WVK, D7 and D7WVK rats. An occasional and weak coloration was detected in the intima or in the media of D7 and D7WVK rats (data not shown). Finally, TNF- $\alpha$  was not expressed in control and WVK rats, but slightly expressed in D7 and D7WVK rats (data not shown).

Central and peripheral hemodynamic parameters were not modified by any treatment (data no shown). Pulse wave velocity, an index of aortic stiffness, was not elevated at this early time-point following WVK treatment.

## 4.6. Discussion

To our knowledge, the experiments presented in this study represent the first experimental evidence that diabetes accelerates vascular calcification. In addition, the present study suggests that the model has important similarities with the human pathological condition.

### Metabolic parameters

Our first objective was to select a model of diabetes that shares similarities with the human condition of type 2 diabetes, since vascular calcification normally occurs later in

life. Type 2 diabetes is associated with a reduction of insulin sensitivity and a gradual impairment of pancreatic  $\beta$  cell function. By the time fasting hyperglycemia appears and diabetes is diagnosed, insulin resistance and reduction of  $\beta$  cell function have already occurred [23]. The insulin resistance phase is characterized by a normal glycemia and compensatory hyperinsulinemia. In our model, the administration of the high fat diet induced an insulin resistance state (elevated insulinemia and HOMA, data not shown), confirming the results obtained by other groups working with rats [24] and mini swine [25]. The administration of STZ aimed at slightly reducing the  $\beta$  cell function to obtain hyperglycemia, as shown by Zhang et al [24]. It has been demonstrated that a 30 mg/kg dose of STZ has minimal effect on pancreatic function [26] and was used to trigger diabetes in our study. After 4 weeks of diabetes, insulinemia decreased slightly below control values and rats were clearly hypoinsulinemic at 7 weeks. The transition to hypoinsulinemia occurred very rapidly and the relevance of this accelerated  $\beta$  cell dysfunction to the human condition, where this transition is much slower, is not known. More importantly, the duration of hyperinsulinemia was, if any, very limited in time. Thus our model focused exclusively on the effect of hyperglycemia rather than on the combined effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia. In any case, our model recapitulates the sequence of events observed in type 2 diabetes in a very short time frame, although, 7 weeks after STZ administration, diabetes could also be considered of type 1. This is at variance with the study of Zhang, which showed sustained normoinsulinemia [24]. The dose of STZ used in the current study may have been slightly elevated. As suggested by Srinivasan *et al.*, there is a narrow dose window between obtaining hyperglycemia on high fat diet-fed while maintaining hyperinsulinemia (above 25 mg/kg of STZ) and overt insulin deficiency (above 35 mg/kg) [27]. Nonetheless, the elevation of fasting glycemia supports the notion that this model is relevant for the study of diabetes effects on vascular calcification, although it may not be fully relevant to study the physiopathology of diabetes. Along these lines, our rats did not show increased triglycerides and cholesterol levels, contrary to human type 2 diabetic patients and other animal models [24, 27]. This could be explained by a weight

loss after the injection of STZ [28]. This apparent normal lipid metabolism should not influence our results since medial calcification is not associated with lipid deposition.

#### **4.6.1. Vascular calcification and hemodynamic parameters**

In order to induce MEC, rats were treated with warfarin and vitamin K. We previously demonstrated that 4 weeks of WVK treatment induced a 10-fold increase in aortic calcium content, which was associated with an elevation of PWV [22]. However, 2 weeks of WVK treatment was not associated with aortic calcification (unpublished observation). In order to study the acceleration of MEC, rats were treated during 3 weeks, when minimal calcification was expected. Indeed, WVK induced only a 2-fold increase in aortic calcification. Diabetes did not amplify or accelerate the development of MEC in the aorta. The lack of modification of hemodynamic parameters, including normal aortic PWV, is consistent with this modest aortic calcification. Prolongation of the WVK treatment beyond these 3 weeks leads to elevation of PWV (data not shown), as seen in patients with type 1 and type 2 diabetes [6, 29].

Clinical reports on diabetic patients have revealed that MEC is most commonly observed in lower limbs and is associated with a 5.5-fold rate of amputations [10]. Indeed, a five-year follow-up study of patients with newly diagnosed type 2 diabetes demonstrated a higher incidence of lower limbs vascular calcification [11]. Moreover, Edmonds *et al.* observed that diabetic patients with neuropathy present MEC more often in feet [30]. For these reasons, MEC was also evaluated in femoral arteries from our treatment groups, although it is important to note that femoral circulations in human and in rats are different, with greater pressures in man due to the upright position. As in the aorta, 3 weeks of WVK treatment did not produce significant calcification of femoral arteries. However, when the same treatment was initiated after 4 weeks of diabetes, significant medial calcification was observed in femoral arteries. Thus, diabetes seems to accelerate the development of MEC. This was not the case after one week of diabetes, suggesting that the development of MEC is related to the duration of diabetes. This is in line with clinical observations in Pima

Indians, showing an effect of diabetes duration on the incidence of macrovascular complications [10]. Interestingly, calcification occurred in the media closer to the lumen of the arteries, while in the WVK model, calcification normally occurs closer to the adventitia [31]. This suggests that a distinct mechanisms adding to the MGP inhibition could be involved in diabetes.

#### **4.6.2. Expression of osteogenic proteins, TGF- $\beta$ and TNF- $\alpha$**

Arterial calcification in general and MEC in particular have been associated with the expression of bone-related proteins, suggesting that cells are not passive bystanders. In diabetes, the expression of alkaline phosphatase has been shown to be elevated in Mönckeberg's sclerosis, a form of medial calcification [18]. Tissue non-specific alkaline phosphatases are important for the mineralization process. Indeed, for hydroxyapatite generation,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{P}_i$  are required and TNAP generates inorganic phosphate from pyrophosphate [32]. As in human diabetic arteries, TNAP was expressed in diabetic rats presenting vascular calcification and in femoral arteries of rats treated with WVK even if calcium accumulation was not yet significant. This suggests that the enzyme is probably involved in the initiation of the calcification process, which is coherent with the role of alkaline phosphatase in calcification [33]. A similar pattern was observed with OPN, another protein invariably expressed in areas of vascular calcification [34], and more specifically in calcified diabetic arteries [18, 35]. Interestingly, the increase of OPN expression was more marked in the adventitia. Zhang *et al.* showed that streptozotocin-induced diabetes caused an important inflammatory response in the adventitia [24]. Moreover, inflammation stimulates bone-related protein expression [36]. We have previously reported that staining for ED-1, a macrophage marker, was negative in the WVK model, partially ruling out cellular infiltration and overt inflammation [15]. However, since diabetes is associated with inflammation, TNF- $\alpha$  expression was assessed to determine its potential impact on calcification. In contrast to arteries from non-diabetic rats (control and

WVK), TNF- $\alpha$  staining was present in the arterial all from diabetic animals and remained mainly unaffected by the addition of the WVK treatment. In addition to inflammation, TGF- $\beta$ , through Smads signaling molecules, is also a stimulus for bone-related protein expression [37]. Since high glucose conditions enhance TGF- $\beta$  signaling [38], we tested its local expression. Similarly to TNF- $\alpha$  expression, TGF- $\beta$  was detected in the adventitia of diabetic groups or rats (D7 and D7WVK), but also in WVK-treated rats. The weak expression of TGF- $\beta$  in the media of femoral arteries of rats treated with WVK is in line with elastin degradation during calcification [39], but our observation time-point may be too early to observe significant shedding. Taken together, our results seem to highlight a role of the adventitia in medial calcification, especially in diabetes. This conclusion is in line with a recent report by Shao *et al* [40]. TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  expressions could explain why OPN and TNAP were also observed in femoral arteries of diabetic rats without calcification. In general, the observations made in this experimental model in terms of phenotypic changes in femoral arteries mimic the changes observed in vessels of patients with medial calcification.

In conclusion, we have devised a new rat model of accelerated elastocalcinosis induced by diabetes that shares the following similarities with the human condition: 1) calcification is present earlier in the diabetic rats than in normal rats treated with WVK, 2) it occurs first in a distal localization (femoral arteries) and 3) it is positively associated with the duration of diabetes. Finally, calcified vessels present phenotypic changes that are consistent with what can be found in human arteries from diabetic patients. This new model will offer new possibilities to elucidate and understand mechanisms implicated in diabetes-accelerated elastocalcinosis.

## **4.7. Acknowledgments**

The authors acknowledge the skillful technical assistance of Louise Ida Grondin. The Canadian Institutes for Health Research (CIHR) funded the study. CB receives a studentship from the Rx&D/CIHR. DdB and PM are scholars from the Fonds de la recherche en santé du Québec.

## 4.8. References

- [1] Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27:1047-53.
- [2] Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993;16:434-44.
- [3] Salomaa V, Riley W, Kark JD, Nardo C, Folsom AR. Non-insulin-dependent diabetes mellitus and fasting glucose and insulin concentrations are associated with arterial stiffness indexes. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation* 1995;91:1432-43.
- [4] Aoun S, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Diabetes mellitus and renal failure: effects on large artery stiffness. *J Hum Hypertens* 2001;15:693-700.
- [5] Brooks BA, Molyneaux LM, Yue DK. Augmentation of central arterial pressure in Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2001;18:374-80.
- [6] Ronnback M, Fagerudd J, Forsblom C, Pettersson-Fernholm K, Reunanen A, Groop PH. Altered age-related blood pressure pattern in type 1 diabetes. *Circulation* 2004;110:1076-82.
- [7] Dao HH, Essalihi R, Bouvet C, Moreau P. Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc Res* 2005;66:307-17.
- [8] Niskanen L, Siitonen O, Suhonen M, Uusitupa MI. Medial artery calcification predicts cardiovascular mortality in patients with NIDDM. *Diabetes Care* 1994;17:1252-6.

- [9] Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:978-83.
- [10] Everhart JE, Pettitt DJ, Knowler WC, Rose FA, Bennett PH. Medial arterial calcification and its association with mortality and complications of diabetes. *Diabetologia* 1988;31:16-23.
- [11] Niskanen LK, Suhonen M, Siitonen O, Lehtinen JM, Uusitupa MI. Aortic and lower limb artery calcification in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients and non-diabetic control subjects. A five year follow-up study. *Atherosclerosis* 1990;84:61-71.
- [12] Fitzpatrick LA, Severson A, Edwards WD, Ingram RT. Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. *J Clin Invest* 1994;94:1597-604.
- [13] Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;93:2393-402.
- [14] Parhami F, Tintut Y, Patel JK, Mody N, Hemmat A, Demer LL. Regulation of vascular calcification in atherosclerosis. *Z Kardiol* 2001;90:27-30.
- [15] Essalihi R, Ouellette V, Hao Dao H, McKee MD, Moreau P. Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells During Medial Arterial Calcification: a Role for Endothelin? *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44:S147-S50.
- [16] Shanahan CM, Proudfoot D, Tyson KL, Cary NR, Edmonds M, Weissberg PL. Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification. *Z Kardiol* 2000;89 Suppl 2:63-8.

- [17] Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, et al. Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int* 2002;61:638-47.
- [18] Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 1999;100:2168-76.
- [19] Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386:78-81.
- [20] Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1998;18:1400-07.
- [21] Price PA, Kaneda Y. Vitamin K counteracts the effects of warfarin in liver but not in bone. *Thrombosis* 1987;46:121-31.
- [22] Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, Moreau P. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am J Hypertens* 2003;16:103-10.
- [23] Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 2003;46:3-19.
- [24] Zhang F, Ye C, Li G, Ding W, Zhou W, Zhu H, et al. The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters. *Exp Anim* 2003;52:401-7.
- [25] Larsen MO, Rolin B, Wilken M, Carr RD, Svendsen O. High-fat high-energy feeding impairs fasting glucose and increases fasting insulin levels in the Gottingen minipig: results from a pilot study. *Ann N Y Acad Sci* 2002;967:414-23.

- [26] Mythili MD, Vyas R, Akila G, Gunasekaran S. Effect of streptozotocin on the ultrastructure of rat pancreatic islets. *Microsc Res Tech* 2004;63:274-81.
- [27] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res* 2005;52:313-20.
- [28] Lean ME, Han TS, Prvan T, Richmond PR, Avenell A. Weight loss with high and low carbohydrate 1200 kcal diets in free living women. *Eur J Clin Nutr* 1997;51:243-8.
- [29] Cameron JD, Bulpitt CJ, Pinto ES, Rajkumar C. The aging of elastic and muscular arteries: a comparison of diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2003;26:2133-8.
- [30] Edmonds ME, Morrison N, Laws JW, Watkins PJ. Medial arterial calcification and diabetic neuropathy. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982;284:928-30.
- [31] Essalihi R, Dao HH, Gilbert LA, Bouvet C, Semerjian Y, McKee MD, et al. Regression of Medial Elastocalcinosis in the Rat Aorta: A New Vascular Function for Carbonic Anhydrase. *Circulation* 2005;112:1628-35.
- [32] Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, Pikula S, Azzar G, Radisson J, et al. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim Pol* 2003;50:1019-38.
- [33] Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res* 1995:266-80.
- [34] Speer MY, McKee MD, Guldborg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, et al. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med* 2002;196:1047-55.

- [35] Takemoto M, Yokote K, Nishimura M, Shigematsu T, Hasegawa T, Kon S, et al. Enhanced expression of osteopontin in human diabetic artery and analysis of its functional role in accelerated atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:624-8.
- [36] Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and high intravascular pressure. *Circulation* 2005;111:2364-72.
- [37] Sowa H, Kaji H, Yamaguchi T, Sugimoto T, Chihara K. Smad3 promotes alkaline phosphatase activity and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 2002;17:1190-9.
- [38] Li JH, Huang XR, Zhu HJ, Johnson R, Lan HY. Role of TGF-beta signaling in extracellular matrix production under high glucose conditions. *Kidney Int* 2003;63:2010-9.
- [39] Lee JS, Basalyga DM, Simionescu A, Isenburg JC, Simionescu DT, Vyavahare NR. Elastin calcification in the rat subdermal model is accompanied by up-regulation of degradative and osteogenic cellular responses. *Am J Pathol* 2006;168:490-8.
- [40] Shao JS, Cai J, Towler DA. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1423-30.

## 4.9. Figure legends

**Figure 1.** Schematic representation of chronic treatments in rats. Open bars represent a normal diet, gray bars a high fat diet and diagonals represent the warfarin/ vitamin K treatment. The vertical dashed lines represent the injection of streptozotocin.

**Figure 2.** Effect of 3 weeks of warfarin/ vitamin K (WVK) treatment on aortic (A) and femoral calcium content ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  of dry tissue). Open circles: control and WVK groups; Closed circles: D4 and D4WVK groups; Closed squares: D7 and D7WVK. \*:  $P < 0.05$  vs without WVK; †:  $P < 0.05$  vs WVK group (open circle). Figure 1 represents the treatment protocols. The same Y-axis scale was used to allow visual comparisons between the two arteries.

**Figure 3.** Von Kossa staining for calcification in femoral arteries from WVK (A) and D7WVK (B). L: lumen; M: media; A: adventitia. Arrows point to calcification nuclei.

**Figure 4.** Immunostaining in femoral arteries for tissue non specific alkaline phosphatase (TNAP) in control (A), WVK (B), D7 (C) and D7WVK (D) treated rats. Pink color indicates immunostaining. L: lumen; M: media; A: adventitia.

**Figure 5.** Immunostaining in femoral arteries for osteopontin in control (A), WVK (B), D7 (C) and D7WVK (D) treated rats. Pink color indicates immunostaining. L: lumen; M: media; A: adventitia.

### 4.10. Table

**Table 1.** Metabolic parameters in the experimental groups

<b>Groups</b>	<b>n</b>	<b>Weight</b> (g)	<b>Glucose</b> (mmol/L)	<b>Insulin</b> (ng/mL)	<b>Cholesterol</b> (mmol/L)	<b>Triglycerides</b> (mmol/L)
<b>Ctrl</b>	18	476 ± 9	4.45 ± 0.26	1.35 ± 0.10	2.88 ± 0.21	0.38 ± 0.02
<b>WVK</b>	14	470 ± 7	5.14 ± 0.40	1.60 ± 0.17	2.39 ± 0.21	0.41 ± 0.07
<b>D4</b>	10	521 ± 14	7.44 ± 0.88	0.66 ± 0.19	1.62 ± 0.24	0.16 ± 0.06
<b>D4WVK</b>	12	495 ± 26	11.40 ± 1.81 †	0.84 ± 0.27 †	1.89 ± 0.30	0.34 ± 0.03
<b>D7</b>	9	463 ± 29	19.90 ± 1.62	0.10 ± 0.02	2.43 ± 0.64	0.49 ± 0.03
<b>D7WVK</b>	9	440 ± 11	17.25 ± 1.49 †	0.24 ± 0.04 †	0.94 ± 0.11 *†	0.23 ± 0.03 *

Ctrl: control; WVK: 3 week warfarin/vitamin K treatment; D4: rats studied 4 weeks after the administration of STZ; D4WVK: D4 rats also treated with WVK for the last 3 weeks; D7: rats studied 7 weeks after the administration of STZ to induce diabetes; D7WVK: D7 rats also treated with WVK for the last 3 weeks. \*:  $P < 0.05$  vs respective control without WVK; †:  $P < 0.05$  vs WVK group. ANOVA followed by Bonferroni's correction for multiple comparisons.

## 4.11. Figures

Figure 1. Bouvet et al

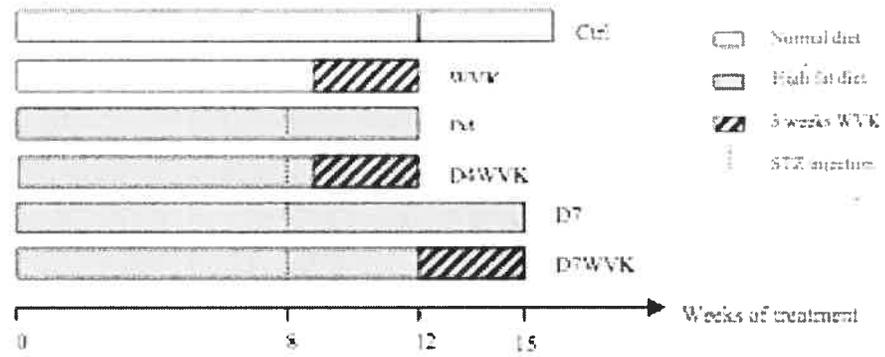


Figure 2. Bouvet et al.

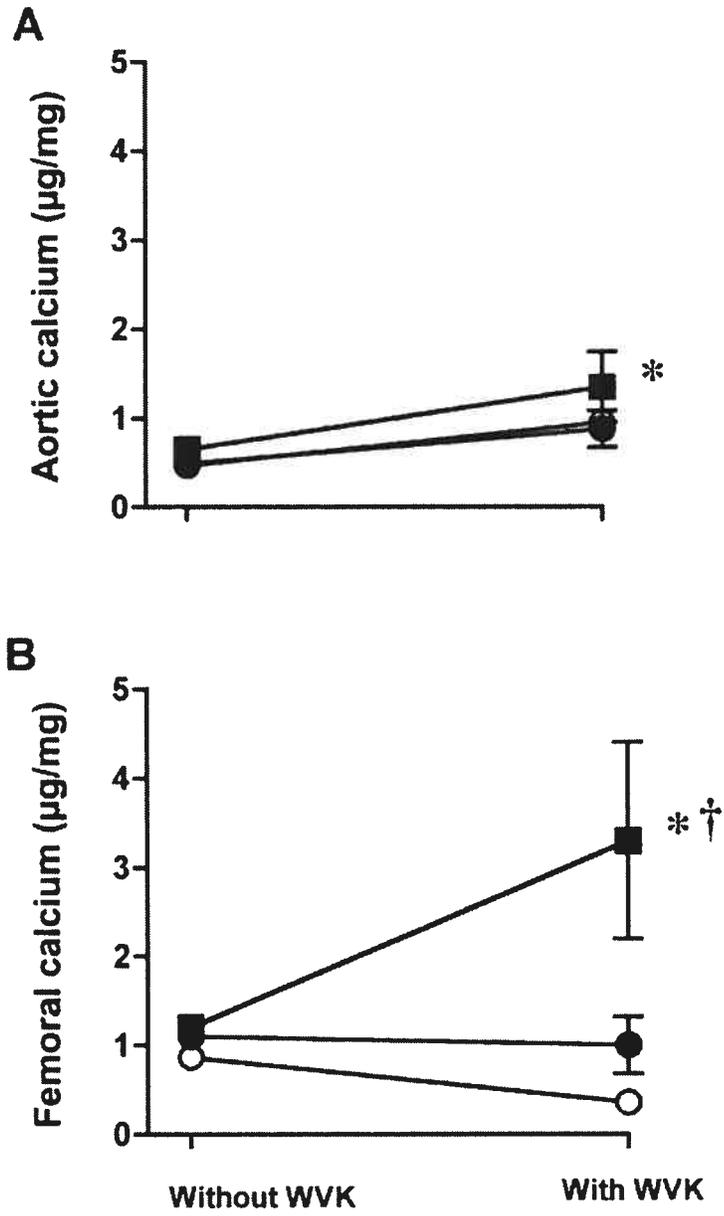


Figure 3 - Bouvet et al.

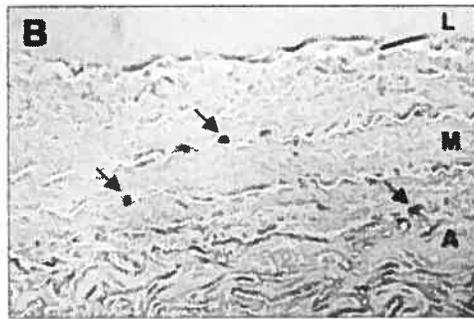
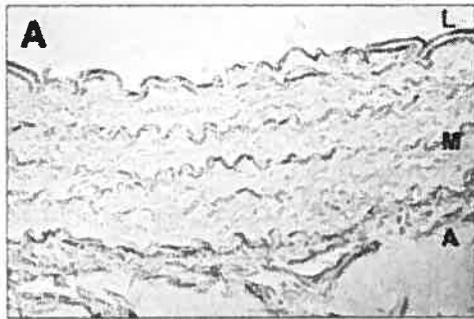


Figure 4 - Bouvet et al.

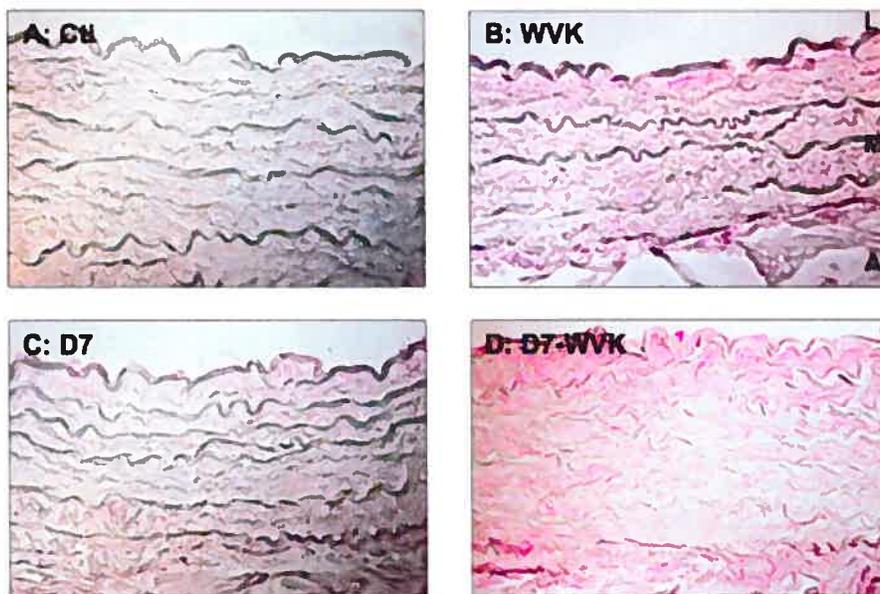
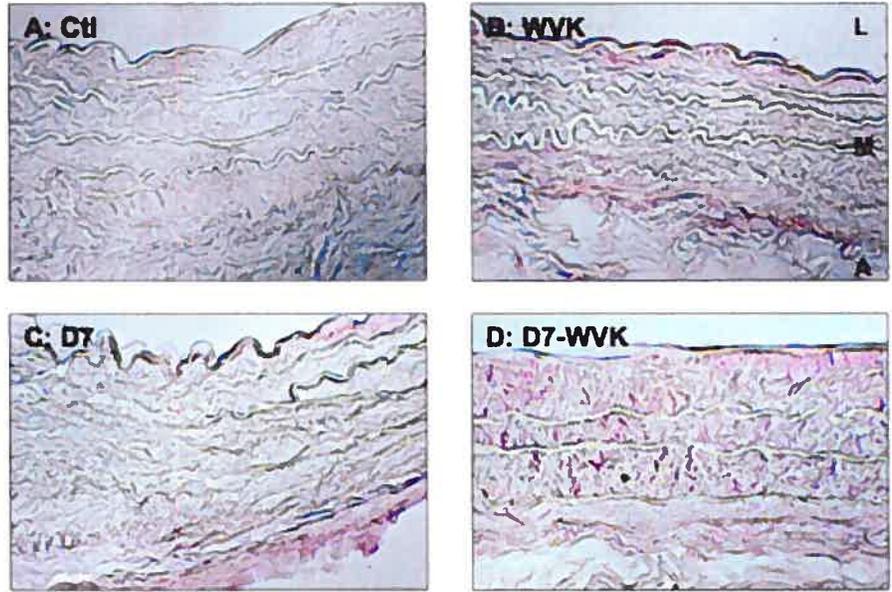


Figure 5 - Bouvet et al.



## **5. Crucial involvement of advanced glycation end-products in experimental diabetes-associated arterial elastocalcinosis.**

Céline Bouvet <sup>1</sup>, Simon Moreau <sup>1</sup>, Jeanne Leblond <sup>1</sup>, Denis deBlois <sup>2</sup> and Pierre Moreau <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Québec, Canada

<sup>2</sup> Department of pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Québec, Canada

*Le premier auteur a contribué majoritairement aux travaux (80% du travail). Les deuxième et troisième auteurs ont participé aux expériences à hauteur de 15% et 5%, respectivement. Les quatrième et cinquième auteurs ont fourni des anticorps utilisés dans l'étude.*

## 5.1. Résumé

Les patients diabétiques présentent une accélération de la calcification artérielle médiale (élastocalcinose), surtout visible au niveau des artères fémorales. Cette calcification entraîne une augmentation de la rigidité vasculaire et contribue au développement d'une hypertension. La durée et la sévérité du diabète sont associées à cette accélération et à une accumulation de produits avancés de glycation (AGEs). Nous avons donc supposé que les AGEs jouaient un rôle crucial dans le développement de l'élastocalcinose, dans un contexte de diabète, et que les récepteurs aux AGEs (RAGE) étaient impliqués dans ce processus.

Des rats Wistar mâles ont reçu une diète riche en lipides durant 2 mois, suivis de l'injection d'une faible dose de streptozotocine (STZ, 30 mg/kg) afin d'induire un diabète. L'élastocalcinose a été produite grâce à un traitement de warfarine et de vitamine K pendant 3 et 7 semaines, en présence ou non de diabète. La pyridoxamine a été administrée suite à l'injection de streptozotocine chez certains rats. D'autres rats ont reçu de l'ALT711, un bloqueur des AGEs, trois semaines après le début du traitement WVK et ce pendant 4 semaines. *Ex vivo*, des artères fémorales de rats témoins et de rats diabétiques (diabète induit par 60 mg/kg de STZ) ont été incubées dans un milieu normal (MN) ou dans un milieu calcifiant (MC), en présence de N-méthylpyridinium, un agoniste de RAGE. Cette expérience a été répétée en présence d'inhibiteur de différentes voies de signalisation associée à l'activation de RAGE.

*In vivo*, dans les artères fémorales, une accumulation progressive de AGEs a été observée. Ces accumulations ont été prévenues par la pyridoxamine et limitées par l'ALT711. *Ex vivo*, le N-méthylpyridinium a induit une augmentation significative de la calcification induite par le MC uniquement dans un contexte de diabète. Cette augmentation a été prévenue par AG490, l'atorvastatine et U120.

La calcification médiale, dans un modèle d'élastocalcinose accélérée par le diabète, a été prévenue par la pyridoxamine et sa progression a été limitée par l'ALT711. En outre, la stimulation de RAGE a permis d'accroître cette calcification, *ex vivo*. Il semble que la cascade de signalisation impliquée dans ce processus comprend JAK2, inhibé par AG490, la prénylation de petites GTPases, inhibée par l'atorvastatine et ERK1/2, inhibé par U120. Ces résultats suggèrent que, dans le diabète, l'élastocalcinose dépend de la formation des AGEs et de leur interaction avec RAGE.

## 5.2. Abstract

We tested the hypothesis that AGEs are crucial to the development of elastocalcinosis in the context of diabetes, and that AGEs receptor (RAGE) are involved in this pathological process.

**Methods:** Males Wistar rats received a high fat diet during 2 months and then a low dose of streptozotocin to induce diabetes (D). Elastocalcinosis was produced by warfarin and vitamin K (WVK) for 3 or 7 weeks (DWVK3 or DWVK7). Pyridoxamine was administrated at the beginning of WVK treatment (DWVK3+pyr). Other rats received ALT711, an AGEs breaker, for 4 weeks, beginning 3 weeks after WVK treatment (DWVK7+ALT711). Ex vivo, femoral arteries from normal rats or streptozotocin-induced diabetic rats, were incubated in a normal media (NC) or in a calcifying media (CM).

**Results:** In femoral arteries, progressive accumulations of AGEs and calcium were observed. Both were prevented by pyridoxamine treatment and limited by ALT711. In aortas, no significant accumulation of AGEs was measured but calcium content was significantly augmented in the DWVK7 group, accompanied by a slight increase of pulse wave velocity. Ex vivo, N-methylpyridinium enhanced significantly the calcification induced by CM only in diabetic rats. This increase was prevented by AG490 (JAK2 pathway), atorvastatin (prenylation of small GTPases) and U120 (ERK1/2).

**Conclusion:** Medial calcification, in a model of diabetes-accelerated elastocalcinosis, was prevented by pyridoxamine and its progression was limited by ALT 711. Moreover, the stimulation of RAGE enhanced calcification, ex vivo. Signaling pathways implicated in this process were small GTPases, ERK1/2 and JAK2. These results suggest that, in diabetes, elastocalcinosis is dependent on AGEs formation and to their interaction with RAGE.

### 5.3. Introduction

Vascular aging is related with vascular stiffening, illustrated by elastin fragmentation, collagen deposition, cross-links formation and calcification. This calcification is medial in location, different from the calcification associated with atherosclerosis. It is localized on elastin lamellae in large arteries and it does not implicate lipids and inflammation cells infiltration. This medial calcification or elastocalcinosis is associated with an osteogenic phenotypic change of vascular smooth muscle cell <sup>1</sup>. As previously mentioned, vascular aging is associated with modification of extracellular matrix cross-linking. Cross-links can be classified in enzymatic and non-enzymatic ones. Among these, non-enzymatic glycation of proteins, forming advanced-glycation endproducts (AGEs), plays an important role <sup>2</sup>. AGEs result from a reaction between a lysine or an hydroxylysine of a protein and a sugar (the Maillard reaction). The Schiff base formed is rearranged in a more stable Amadori product. Then, the formation of advanced glycation end-products (AGEs) occurs as fluorescent or non-fluorescent components, creating cross-links or not <sup>3</sup>. Some AGEs can interact with receptors. The most characterized is a multiligand receptor, receptor of AGE (RAGE). Following RAGE-ligand interaction, oxidants are generated and several pathways are activated including Janus kinases/Signal Transducers and Activators of Transcription (Jak/Stat), Rho GTPase and and mitogen-activated protein (MAP) kinase family through p21<sup>ras</sup> <sup>4</sup>. Because AGEs cross-links disappear only with the turn-over of the proteins, an accumulation of AGEs was observed with aging particularly in proteins with a long biological half-life such as collagen or elastin <sup>2, 5</sup>. Bruël et al demonstrated that fluorescence on elastin and collagen, a marker of AGEs, was correlated with age-related stiffness in rat aorta <sup>2</sup>. Furthermore, elastin stiffness induced by AGEs cross-links appeared concomitantly with an increase of calcium ion uptake by elastin <sup>6</sup>. Finally, several treatments targeting AGEs have demonstrated improvement in arterial stiffening. Inhibitors of AGE formation, such as aminoguanidine, prevent age-related arterial stiffening <sup>7</sup> and ALT 711, a breaker of AGEs, improves arterial compliance in aged patients with vascular stiffening <sup>8</sup>.

Because diabetes is associated with increased levels of AGEs, it would be logic that vascular aging is expected to be accelerated in diabetic patients. Actually, Lehto et al. observed an acceleration of arterial stiffness and medial calcification in diabetic patients <sup>9</sup>. This phenomena is related to the duration and the severity of diabetes <sup>10</sup>.

We know that AGEs are implicated in arterial stiffness through cross-links formation. Our working hypothesis was that AGEs are essential to the development of arterial elastocalcinosis in an experimental model of diabetes-associated elastocalcinosis. Moreover, we wanted to determine if RAGE are implicated in this calcification.

In order to study the mechanisms implicated in the acceleration of elastocalcinosis in diabetes, we used the rat model developed in our laboratory. In this model, diabetes is induced by a high fat diet and a low dose of streptozotocine and elastocalcinosis is produced by a warfarin/vitamine K treatment. In this model, the acceleration of medial calcification was associated with the duration of the diabetes and observed especially in femoral arteries <sup>11</sup>.

## **5.4. Methods**

### **5.4.1. In vivo experiments**

#### **a. Treatments**

Male Wistar rats (initial weight of 50-75 g) were obtained from Charles River Breeding Laboratories (St-Constant, Qc, Canada). They were fed a high fat diet containing 45 kcal % fat, 35 kcal % carbohydrates and 20 kcal % protein (Research diets, D12451) ad libitum during 8 weeks, followed by a single dose of streptozotocin (STZ, 30 mg/kg intra-peritoneally). Four weeks after the injection of STZ, rats received warfarin (20 mg. kg<sup>-1</sup>. day<sup>-1</sup> in drinking water) and vitamin K (phylloquinone, 15 mg. kg<sup>-1</sup>. day<sup>-1</sup> sub-cutaneous injection, Spectrum chemical, Gardena, CA and New Brunswick, NJ USA) (WVK) during 3 (DWVK<sub>3</sub>) and 7 (DWVK<sub>7</sub>) weeks. In order to determine the implication of AGEs in

elastocalcinosis, rats received pyridoxamine (200 mg. kg<sup>-1</sup>. day<sup>-1</sup> in food) to prevent AGEs formation or ALT 711 (10 mg. kg<sup>-1</sup>. day<sup>-1</sup> in food) to break AGEs already formed. Pyridoxamine was started the same day of the STZ injection (DWVK<sub>3</sub>+pyr), whereas ALT711 was introduced in the food 7 weeks after the STZ injection (after 3 weeks of WVK treatment) (DWVK<sub>7</sub>+ALT). Dosages were adjusted every second day. Controls consisted of age-matched untreated rats (Ctrl). All animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of Université de Montréal.

### **b. Hemodynamic and metabolic parameters**

Animals were anesthetized with pentobarbital (65 mg/kg) and short catheters (polyethylene-50, approx. 10 cm, Folioplast SA, Sarcelles, France) were inserted into the distal abdominal aorta through the left femoral artery and into the aortic arch through the left carotid. Catheters were connected to a pressure transducer to allow the measurement of systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) at each location. Mean arterial blood pressure (MBP), carotid and femoral pulse pressures (PP) were calculated from these parameters. Pulse wave velocity (PWV) was measured by the foot-to-foot method from the two pressure waveforms, as previously described<sup>12</sup>. Finally, the aorta and femoral arteries were harvested. Portions were frozen at - 80 °C for calcium amount, and AGEs quantification.

Before sacrifice, glycemia was quantified on an arterial blood sample with a glucometer (AccuSoft Advantage, Roche, Laval, Qc, Canada).

### **c. Vascular wall composition**

#### *i Calcium content*

To measure calcium content, sections of arteries were dried at 55°C and calcium was extracted with 10% formic acid (30 µL/mg of dry tissue) overnight at 4°C. The

colorimetric quantification was achieved through a reaction with o-cresolphthalein (Teco Diagnostics, Anaheim, CA, USA).

*ii Advanced glycation end products quantification*

In order to evaluate the formation of AGEs in the vascular wall, glycation of collagen was measured. This method is based on the fluorescence of some AGEs. After their pulverisation at -80 °C, tissues were suspended in PBS and rinsed in distilled water (centrifugation at 10000 rpm during 15 minutes). The extraction of lipids was performed with chloroform-methanol (2:1) overnight at room temperature. Then, the samples were rinsed successively in methanol, distilled water and HEPES buffer 0.02 M. The pellets were resuspended in 0.5 mL of HEPES buffer. Blanks were prepared with determined amounts of collagen. One hundred units of bacterial type VII collagenase was added to each sample. The digestion was allowed to proceed during 24 hours at 37 °C with shaking. The supernatants, obtained after centrifugation at 3000rpm for 3 minutes, were used for determination of hydroxyproline content and fluorescence of AGEs.

A standard curve with hydroxyproline was prepared. Then, samples and standards were mixed in 2 N sodium hydroxide. They were hydrolyzed by autoclaving at 120 °C for 20 minutes. Chloramine-T reagent was added to the hydrolyzates for 25 minutes at room temperature for oxidation. Ehrlich's reagent was added to each sample and the chromophore was developed by an incubation at 65 °C during 20 min. The absorbance was read at 550 nm. This allowed to determine the hydroxyproline content of the samples and, with the help of the blanks, their collagen content.

The fluorescence of the supernatants was measured by excitation at 370 nm and emission at 440 nm. It was expressed as arbitrary units by mg of collagen.

## 5.4.2. Ex vivo experiments

### a. Treatments

Male Wistar rats (initial weight 125-150 g) were obtained from Charles River Breeding Laboratories (St-Constant, Qc, Canada). They received STZ (60 mg/kg, intraperitoneally injection) to destroy pancreatic cells. Once  $\beta$  cells destruction verified (with measurement of glycemia two days after the injection of STZ), insulin implant were inserted under skin to maintain a glycemia of 15-20 mmol/L. This controlled hyperglycemia is expected to allow the formation of advanced glycation end products, while improving the survival of the rats. Glycemia and body weight were managed twice a week. Eight weeks after the injection of STZ, the sacrifice was performed with a high dose of pentobarbital (S group). Controls consisted of age-matched untreated rats (Ctrl). The femoral arteries were harvested and placed in culture (see next section). All animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of Université de Montréal.

### b. Vessels culture

Femoral arteries of Ctrl and S rats were placed into DMEM (Hyclone) containing 1.8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and 0.9 mM  $\text{PO}_4^{3-}$  with penicillin and streptomycin, referred to as the normal condition (NC). Medium was maintained at 37°C in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere with changes every 2 days. In order to induce calcification, 10  $\mu\text{M}$  of warfarin was added to the medium, and the concentration of  $\text{PO}_4^{3-}$  was increased to 3.8 mM two days after the addition of warfarin and during 4 days (calcification medium, CM). In order to determine the implication of RAGE in elastocalcinosis, some femoral arteries were incubated with N-methylpyridinium (18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). N-methylpyridinium is a ligand of RAGE but not an advanced-glycation end product<sup>13</sup>. Its synthesis was realized according to the protocol of Zill et al.<sup>13</sup>. The product was analyzed by  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 4.35 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 8.13 (2H, t,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}_{\text{meta}}$ ), 8.58 (1H, t,  $J=8.1$  Hz,  $\text{CH}_{\text{para}}$ ), 8.99 (2H, d,  $J=5.7$  Hz,

CH<sub>ortho</sub>) and <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 49.25 (CH<sub>3</sub>), 128.99 (C<sub>meta</sub>), 146.37 (C<sub>ortho</sub>), 146.92 (C<sub>para</sub>). NMR Spectra were recorded on a Bruker Avance 300 MHz (QNP probe).

Furthermore, some inhibitors of the different signaling pathways of RAGE were used with N-methylpyridinium : AG490 (5 μM) an inhibitor of JAK-2 protein kinase, atorvastatin (10 μM) that prevent prenylation of small GTP binding proteins, SB203580 an inhibitor of p38 MAPK, U120 (50 μM) an inhibitor of extracellular-signal-regulated protein kinase ERK1/2, I3159 (10 μM) an inhibitor of IKK-2 implicated in activation of NF-κB and 4-hydroxy-tempol (3mM) an anti-oxidant. At the end of each treatment, vascular segments were cleaned in PBS and frozen at -80°C. Calcium content was determined as previously described. Viability of arteries incubated in those conditions was evaluated with methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT).

### 5.4.3. Drugs and statistical analysis

All drugs were purchased from Sigma Chemical Co. (Oakville, On, Canada) unless specified. Values are expressed as mean ± SEM. An analysis of variance followed by Bonferonni's correction was used to compare the groups. *P* had to be smaller than 0.05/number of comparisons to reach statistical significance.

## 5.5. Results

### 5.5.1. In vivo experiments

All groups of rats receiving a high fat diet and a low dose of streptozotocin demonstrated a significant hyperglycemia, confirming the induction of diabetes, that was not associated with an alteration of body weight (**Table**). Moreover, we observed a progressive accumulation of fluorescent advanced glycation end-products (AGEs) in the femoral vascular wall (**Figure 1B**) but not in the aorta (**Figure 1A**). Aortic calcium content accumulated with the duration of WVK treatment and diabetes, reaching statistical

significance in the DWVK<sub>7</sub> group (**Figure 1A**). The calcification was more important in the femoral arteries and was also progressively augmented with the duration of WVK treatment and diabetes. In this case, it was significantly increased in the DWVK<sub>3</sub> and DWVK<sub>7</sub> groups (**Figure 1B**). The WVK treatment was also associated with a slight, not significant increase of pulse wave velocity (**Table**). No significant changes of hemodynamic parameters were observed with the development of vascular calcification in the diabetic rats (**Table**).

Treatments of AGEs accumulation had a significant impact on the vascular wall. Treatment with pyridoxamine prevented AGEs accumulation on collagen (**Figure 2A**),. Moreover, pyridoxamine prevented calcium accumulation in femoral arteries (**Figure 2B**). The reduction of calcium content was not significant in aorta (DWVK<sub>3</sub>:  $1.18 \pm 0.32$  vs DWVK<sub>3</sub>+pyrid:  $0.41 \pm 0.21$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  of dry tissue). Surprisingly, pyridoxamine was associated with augmented systolic, diastolic and mean blood pressures (**Table**). Furthermore, pyridoxamine tended to increase the pulse wave velocity (DWVK<sub>3</sub>:  $5.7 \pm 0.3$  vs DWVK<sub>3</sub>+pyrid:  $6.6 \pm 0.2$   $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ). ALT711, an AGEs breaker, regressed significantly fluorescence of AGEs and calcium accumulation in femoral arteries (**Figure 2A**). In contrast, it induced an augmentation of calcium content in aorta (DWVK<sub>7</sub>:  $2.24 \pm 0.40$  vs DWVK<sub>7</sub>+ALT:  $3.55 \pm 0.50$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  of dry tissue,  $P < 0.05$ ). These changes were not associated with modification of hemodynamic parameters (**Table**) and no reduction of pulse wave velocity was observed with ALT711 (DWVK<sub>7</sub>:  $6.4 \pm 0.1$  vs DWVK<sub>7</sub>+ALT:  $6.2 \pm 0.2$   $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

### 5.5.2. Ex vivo experiments

Rats treated with streptozotocin (S) presented a significant hyperglycemia compared to control rats used in the ex vivo experiments (S:  $19.03 \pm 2.69$   $\text{mmol}/\text{L}$  vs Ctrl:  $5.24 \pm 0.17$   $\text{mmol}/\text{L}$ ,  $P < 0.05$ ). Calcification medium (CM) induced a significant calcification of femoral arteries, not different in Ctrl and S rats. However, N-methylpyridinium enhanced significantly the calcium deposition only in the femoral arteries of S rats (**Figure 3A**). This

increase of calcification was significantly prevented by the use of AG 490, atorvastatin and U120. A slight decrease of calcium amount was observed with SB 203580 and hydroxy-tempol. Finally, I3159 did not modify this parameter (**Figure 3B**).

## 5.6. Discussion

For the first time, we demonstrated the decisive involvement of advanced glycation end-products in the development of vascular calcification in experimental diabetes. Moreover, we observed that the enhanced elastocalcinosis could be triggered through RAGE activation.

Our model, consisting of a two-month period of insulin resistance and four weeks of progressive decrease of insulinemia, demonstrated fasting hyperglycemia. Moreover, we previously confirmed that calcification was related to the duration of diabetes in this model<sup>11</sup>. In the present study, we also measured the accumulation of AGEs in the femoral arteries, and found that AGEs and calcium followed the same pattern of accumulation. Moreover, they were both more present in femoral arteries than in aorta. We also observed a slight progressive increase of vascular stiffness, assessed by the measurement PWV, in this model. Since PWV evaluates the aortic stiffness, the limited accumulation of calcium in this artery is consistent with the small changes of stiffness. Previous studies in patients or on human tissues also demonstrated an association between AGEs and calcification. In aortic valves, carboxymethyllysine (CML) staining, a non-fluorescent and non-cross-linking AGE, appeared at calcification sites<sup>14</sup>. Furthermore, plasma pentosidine levels, a fluorescent and cross-linking AGE, correlated with coronary artery calcification in patients undergoing hemodialysis<sup>15</sup>. Evidences also highlighted association between AGEs and elastocalcinosis. Sakata et al. observed colocalization of pentosidine and CML with calcified deposits and elastin<sup>16, 17</sup>. Thus, the association between AGEs and several forms of calcification was expected, but the causal link remained to be determined.

Our results with pyridoxamine and ALT711 established a direct link between AGEs accumulation and elastocalcinosis development. Indeed, pyridoxamine and ALT711 modified AGEs and calcium deposits. These two anti-AGEs therapies have different mechanisms of action. Like aminoguanidine, pyridoxamine inhibits AGE formation from Amadori products. However, pyridoxamine, in contrast to aminoguanidine, does not interact directly with Amadori intermediates, the reactive dicarbonyl intermediates<sup>18</sup>, but interferes with post-Amadori oxidative reactions by binding catalytic redox metal ions<sup>19</sup>. Moreover, pyridoxamine is not an inhibitor of nitric oxide synthase, in contrast to aminoguanidine<sup>20</sup>. ALT711 (alagebrium) appears to break existing AGEs-derived cross-links in vitro and in vivo in STZ rats<sup>21</sup>. Thus, pyridoxamine avoids AGEs accumulation whereas ALT711 disrupts AGEs accumulated. In our study, pyridoxamine prevented AGEs accumulation and calcium deposition, whereas ALT711 regressed AGEs cross-links but did not regress completely calcium deposit. However, ALT711 induced an increase of calcification in aorta. This could suggest that not only AGEs-derived cross-links are important in elastocalcinosis development but also non-cross-linking AGEs.

In addition to reducing calcium content, previous experiments suggested that anti-AGEs therapies could also reduce arterial stiffness. Aminoguanidine was able to increase the elasticity of large arteries in diabetic rats<sup>22</sup> and limited pulse wave velocity augmentation when administrated to old rats (20 or 24 month old) during 6 to 10 months<sup>7, 23</sup>. However, no clinical trials have confirmed these effects. Studies using pyridoxamine as anti-AGE treatment did not present results about arterial stiffness. Pyridoxamine, administrated 25 weeks, prevented the increase in systolic blood pressure in the Zucker obese rats occurring with aging<sup>24</sup>, although arterial stiffness was not evaluated. In contrast, its administration during 12 weeks to type 2 diabetic mice did not modify hemodynamic parameters<sup>25</sup>. Studies with ALT711 present the most compelling results. Wolffenbuttel et al. demonstrated a restoration of arterial compliance with ALT711 in STZ-induced diabetes<sup>26</sup>. Furthermore, ALT-711 improved arterial compliance in aged patients with isolated systolic hypertension<sup>8</sup>. This could be explained by a reduction of cross-links, an augmentation of endothelial function and, to a lesser extent, by a reduction of fibrosis<sup>27</sup>. In

our study, we did not observed changes in arterial stiffness with the anti-AGEs treatments probably because no significant increase of arterial stiffness or of systolic hypertension occurred prior to the beginning of the treatments. Indeed, our study intended to look at early events of arterial stiffness.

Calcium deposits have been shown to increase in association with the accumulation of AGEs on elastin and collagen in aorta of patients <sup>16, 17</sup> and in femoral arteries in our animal model. One of our aims was to elucidate the mechanism responsible for that relationship. In vitro, glycation of elastin enhances its binding to metal ions such as copper, iron <sup>28</sup> and calcium <sup>6</sup>. The calcium-binding activity was also increased on collagen exposed to glucose <sup>17</sup>. This could explain the correlation between calcification and AGEs. However, incubation of cells with glycated bovine albumin (AGE-BSA), which is not implicated in glycation of collagen or elastin, induced calcium accumulation <sup>29</sup>. AGE-BSA also increased alkaline phosphatase and osteopontin mRNAs levels, two proteins implicated in vascular calcification <sup>11, 30</sup>. In the Yamagishi study, AGE demonstrated the ability to induce a phenotypic change of pericyte to osteoblast <sup>29</sup>. Thus, AGEs do not only enhance affinity of extracellular matrix components for calcium but also induce signaling pathways resulting in phenotypic changes. This could be the result of receptor stimulation, since non-crosslinking AGEs can interact with receptors. The most studied AGE receptor is RAGE. As suggested by the results obtained with ALT711, non-crosslinking AGEs could play an important role in elastocalcinosis development. We demonstrated, in an ex vivo model of elastocalcinosis, that stimulation of RAGE with N-methylpyridinium enhanced calcification in femoral arteries of diabetic rats but not in arteries of control rats. The different response could be due to increased expression of RAGE in diabetic rats compared to control rats. Indeed, Sun et al. demonstrated an augmentation of RAGE immunoreactivity in vascular smooth muscle cells of aorta until twelve weeks after STZ injection <sup>31</sup>.

AGE-RAGE interactions trigger several transduction pathways and enhance intracellular oxidative stress. AGEs that bind to RAGE stimulate JAK, small GTPases : p21<sup>ras</sup> and Cdc42, mitogen-activated protein (MAP) kinases (activated by p21<sup>ras</sup>): p38,

ERK1/2 and finally, transcription factor NF- $\kappa$ B<sup>32-35</sup>. Interestingly, MAPkinases<sup>36</sup> and NF- $\kappa$ B<sup>37</sup> have been implicated in calcification. In our ex vivo experiments, we have demonstrated that RAGE stimulation enhances vascular calcification through small GTPases, ERK1/2 and Jak2. However, p38 and the oxidative stress were not convincingly implicated. Interestingly, blocking NF- $\kappa$ B did not modify the response, suggesting that another transcription factor is implicated in transducing the signal to promote calcification.

In conclusion, we demonstrated a crucial role of AGEs in elastocalcinosis that seems to implicate, at least, in part AGE-RAGE interaction. This could reinforce the use of ALT711 in the treatment of arterial stiffness in diabetic patients, especially in the early phase of the disease process, where calcification occurs. Moreover, our results suggest that RAGE inhibition could be a new target to investigate in this pathological paradigm.

## **5.7. Acknowledgements**

The authors acknowledge the skilled technical assistance of Louise Ida Grondin. CB receives a studentship from the Rx and D/Canadian Institutes for Health Research and SM from the Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament. DdB and PM are scholars from the Fonds de la recherche en santé du Québec.

## 5.8. References

1. Dao HH, Essalihi R, Bouvet C, Moreau P. Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovascular research*. 2005;66(2):307-317.
2. Bruel A, Oxlund H. Changes in biomechanical properties, composition of collagen and elastin, and advanced glycation endproducts of the rat aorta in relation to age. *Atherosclerosis*. 1996;127(2):155-165.
3. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:1-21.
4. Stern DM, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing research reviews*. 2002;1(1):1-15.
5. Konova E, Baydanoff S, Atanasova M, Velkova A. Age-related changes in the glycation of human aortic elastin. *Exp Gerontol*. 2004;39(2):249-254.
6. Winlove CP, Parker KH, Avery NC, Bailey AJ. Interactions of elastin and aorta with sugars in vitro and their effects on biochemical and physical properties. *Diabetologia*. 1996;39(10):1131-1139.
7. Corman B, Duriez M, Poitevin P, Heudes D, Bruneval P, Tedgui A, Levy BI. Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(3):1301-1306.
8. Kass DA, Shapiro EP, Kawaguchi M, Capriotti AR, Scuteri A, deGroof RC, Lakatta EG. Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation*. 2001;104(13):1464-1470.

9. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(8):978-983.
10. Everhart JE, Pettitt DJ, Knowler WC, Rose FA, Bennett PH. Medial arterial calcification and its association with mortality and complications of diabetes. *Diabetologia.* 1988;31(1):16-23.
11. Bouvet C, Peeters W, Moreau S, DeBlois D, Moreau P. A new rat model of diabetic macrovascular complication. *Cardiovascular research.* 2007;73(3):504-511.
12. Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, Moreau P. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am J Hypertens.* 2003;16(2):103-110.
13. Zill H, Bek S, Hofmann T, Huber J, Frank O, Lindenmeier M, Weigle B, Erbersdobler HF, Scheidler S, Busch AE, Faist V. RAGE-mediated MAPK activation by food-derived AGE and non-AGE products. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;300(2):311-315.
14. Baidoshvili A, Niessen HW, Stoker W, Huybregts RA, Hack CE, Rauwerda JA, Meijer CJ, Eijnsman L, van Hinsbergh VW, Schalkwijk CG. N(omega)-(carboxymethyl)lysine depositions in human aortic heart valves: similarities with atherosclerotic blood vessels. *Atherosclerosis.* 2004;174(2):287-292.
15. Taki K, Takayama F, Tsuruta Y, Niwa T. Oxidative stress, advanced glycation end product, and coronary artery calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2006;70(1):218-224.
16. Sakata N, Noma A, Yamamoto Y, Okamoto K, Meng J, Takebayashi S, Nagai R, Horiuchi S. Modification of elastin by pentosidine is associated with the calcification of

aortic media in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(8):1601-1609.

17. Sakata N, Takeuchi K, Noda K, Saku K, Tachikawa Y, Tashiro T, Nagai R, Horiuchi S. Calcification of the medial layer of the internal thoracic artery in diabetic patients: relevance of glycoxidation. *Journal of vascular research*. 2003;40(6):567-574.

18. Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys*. 2003;419(1):31-40.

19. Voziyan PA, Khalifah RG, Thibaudeau C, Yildiz A, Jacob J, Serianni AS, Hudson BG. Modification of proteins in vitro by physiological levels of glucose: pyridoxamine inhibits conversion of Amadori intermediate to advanced glycation end-products through binding of redox metal ions. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(47):46616-46624.

20. Corbett JA, Tilton RG, Chang K, Hasan KS, Ido Y, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster JR, Jr., Williamson JR, McDaniel ML. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes*. 1992;41(4):552-556.

21. Vasani S, Foiles P, Founds H. Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product-protein crosslinks. *Arch Biochem Biophys*. 2003;419(1):89-96.

22. Huijberts MS, Wolffenbuttel BH, Boudier HA, Crijns FR, Kruseman AC, Poitevin P, Levy BI. Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. *J Clin Invest*. 1993;92(3):1407-1411.

23. Cantini C, Kieffer P, Corman B, Liminana P, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene I. Aminoguanidine and aortic wall mechanics, structure, and composition in aged rats. *Hypertension*. 2001;38(4):943-948.

24. Alderson NL, Chachich ME, Youssef NN, Beattie RJ, Nachtigal M, Thorpe SR, Baynes JW. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney Int.* 2003;63(6):2123-2133.
25. Tanimoto M, Gohda T, Kaneko S, Hagiwara S, Murakoshi M, Aoki T, Yamada K, Ito T, Matsumoto M, Horikoshi S, Tomino Y. Effect of pyridoxamine (K-163), an inhibitor of advanced glycation end products, on type 2 diabetic nephropathy in KK-A(y)/Ta mice. *Metabolism: clinical and experimental.* 2007;56(2):160-167.
26. Wolffenbuttel BH, Boulanger CM, Crijns FR, Huijberts MS, Poitevin P, Swennen GN, Vasan S, Egan JJ, Ulrich P, Cerami A, Levy BI. Breakers of advanced glycation end products restore large artery properties in experimental diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(8):4630-4634.
27. Zieman SJ, Melenovsky V, Clattenburg L, Corretti MC, Capriotti A, Gerstenblith G, Kass DA. Advanced glycation endproduct crosslink breaker (alagebrium) improves endothelial function in patients with isolated systolic hypertension. *J Hypertens.* 2007;25(3):577-583.
28. Qian M, Liu M, Eaton JW. Transition metals bind to glycated proteins forming redox active "glycochelates": implications for the pathogenesis of certain diabetic complications. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250(2):385-389.
29. Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Tanaka N, Yamamoto H. Advanced glycation endproducts accelerate calcification in microvascular pericytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;258(2):353-357.
30. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation.* 1999;100(21):2168-2176.

31. Sun M, Yokoyama M, Ishiwata T, Asano G. Deposition of advanced glycation end products (AGE) and expression of the receptor for AGE in cardiovascular tissue of the diabetic rat. *International journal of experimental pathology*. 1998;79(4):207-222.
32. Ishihara K, Tsutsumi K, Kawane S, Nakajima M, Kasaoka T. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS letters*. 2003;550(1-3):107-113.
33. Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Kloting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Haring HU, Schleicher E, Nawroth PP. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes*. 2001;50(12):2792-2808.
34. Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, Hofmann M, Yan SF, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(44):31740-31749.
35. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114(6):597-605.
36. Simmons CA, Nikolovski J, Thornton AJ, Matlis S, Mooney DJ. Mechanical stimulation and mitogen-activated protein kinase signaling independently regulate osteogenic differentiation and mineralization by calcifying vascular cells. *Journal of biomechanics*. 2004;37(10):1531-1541.
37. Kiechl S, Werner P, Knoflach M, Furtner M, Willeit J, Schett G. The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *Expert review of cardiovascular therapy*. 2006;4(6):801-811.

## 5.9. Figure legends

**Figure 1.** Quantification of fluorescent advanced glycation end-products (open circles) and calcium (closed circles) accumulated in aortic (A) and femoral (B) vascular wall. \*:  $P < 0.05$  vs Ctrl (0 week of WVK treatment). ANOVA followed by Bonferroni's correction for multiple comparisons.

**Figure 2.** Effect of pyridoxamine and ALT711 (anti-AGEs treatments) on AGEs (B) and calcium (A) accumulation in femoral arteries. triangle: DWVK<sub>3</sub>+pyridoxamine; square: DWVK<sub>7</sub>+ALT; dashed line represents mean value of Ctrl group; #:  $P < 0.05$  vs respective DWVK group without anti-AGEs treatment. ANOVA followed by Bonferroni's correction for multiple comparisons.

**Figure 3.** (A) Ex vivo calcification of femoral arteries harvested from control or diabetic rats and influence of AGEs receptor stimulation with N-methylpyridinium. (B) Effect of different pathways inhibitors on calcification stimulated with N-methylpyridinium, in femoral arteries of diabetic rats.

Ctrl: control rats; S: streptozotocin-induced diabetic Wistar rats; NC: normal conditions with unchanged DMEM; CM: calcification medium; N-m: calcification medium with N-methylpyridinium; SB: SB 203580; statin: atorvastatin. \*:  $P < 0.05$  vs NC; #:  $P < 0.05$  vs CM. ∞:  $P < 0.05$  vs N-m in femoral arteries of diabetic rats. ANOVA followed by Bonferroni's correction for multiple comparisons.

### 5.10. Table

**Table.** Metabolic and hemodynamic parameters.

Parameters	Ctrl	DWVK <sub>3</sub>	DWVK <sub>7</sub>	DWVK <sub>3</sub> +pyrid	DWVK <sub>7</sub> +ALT
n=	10	8	9	8	7
Body weight (g)	476 ± 9	492 ± 28	550 ± 25 *	527 ± 20	627 ± 36
Glycemia (mmol/L)	4.4 ± 0.3	14.2 ± 1.9 *	13.3 ± 1.9 *	18.6 ± 2.3	12.2 ± 1.9
SBP <sub>C</sub> (mmHg)	142.0 ± 6.3	148.2 ± 6.0	151.8 ± 3.7	174.5 ± 5.2 #	157.4 ± 7.5
DBP <sub>C</sub> (mmHg)	109.4 ± 5.2	113.4 ± 5.5	117.8 ± 4.0	133.5 ± 4.6 #	120.3 ± 5.5
MBP <sub>C</sub> (mmHg)	120.3 ± 5.5	125.0 ± 5.6	129.2 ± 3.8	147.2 ± 4.8 #	132.7 ± 6.1
PP <sub>C</sub> (mmHg)	32.5 ± 2.0	34.9 ± 1.3	35.9 ± 0.8	40.7 ± 1.8	37.1 ± 2.5
PP <sub>F</sub> (mmHg)	46.4 ± 2.2	51.6 ± 2.8	44.3 ± 1.6	43.1 ± 1.9	49.6 ± 5.2
PWV (m/s)	5.6 ± 0.2	5.7 ± 0.3	6.4 ± 0.1	6.6 ± 0.2	6.2 ± 0.2

SBP<sub>C</sub>: carotid systolic blood pressure; DBP<sub>C</sub>: carotid diastolic blood pressure; MBP<sub>C</sub>: carotid mean blood pressure, PP<sub>C</sub>: carotid pulse pressure; PP<sub>F</sub>: femoral pulse pressure; PWV: pulse wave velocity; Ctrl: control; DWVK<sub>3 or 7</sub>: diabetic rats treated with WVK for 3 or 7 weeks; DWVK<sub>3</sub>+pyrid: diabetic rats treated with 3 weeks of WVK associated with pyridoxamine; DWVK<sub>7</sub>+ALT: diabetic rats treated with 7 weeks of WVK associated with ALT711 for the last 4 weeks. \*:  $P < 0.05$  vs Ctrl; #:  $P < 0.05$  vs respective DWVK group without anti-AGEs treatment. ANOVA followed by Bonferroni's correction for multiple comparisons.

## 5.11. Figures

Figure 1.

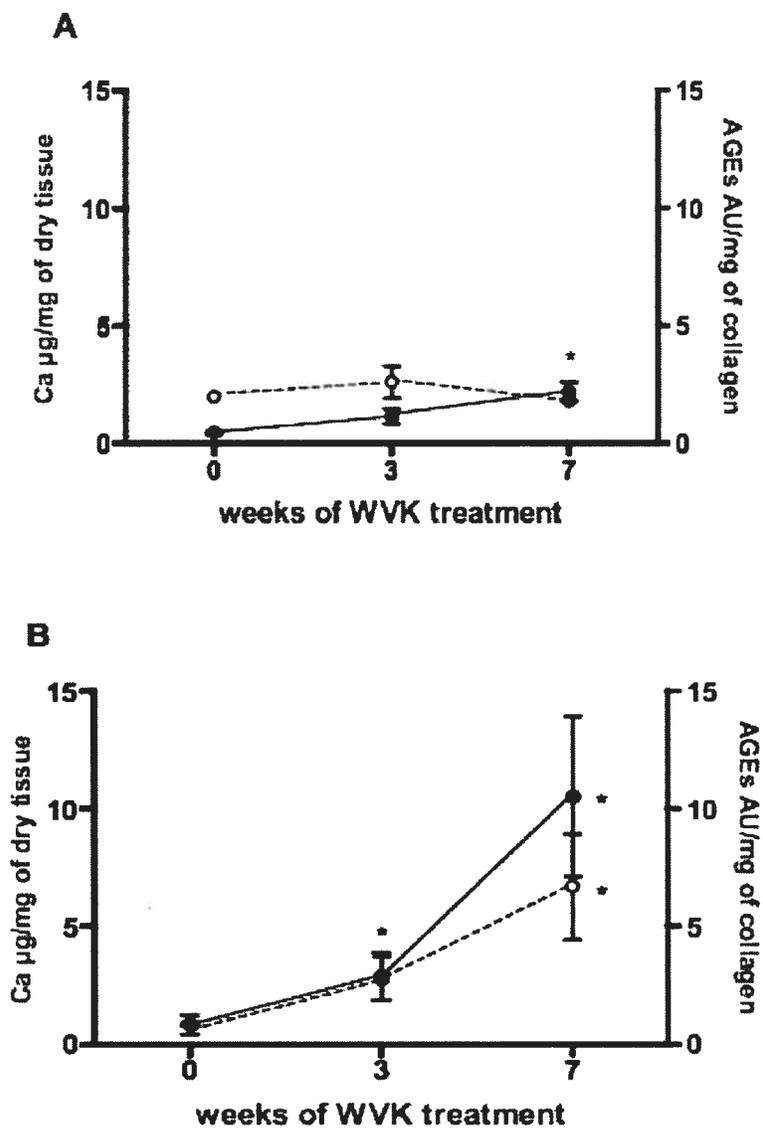


Figure 2.

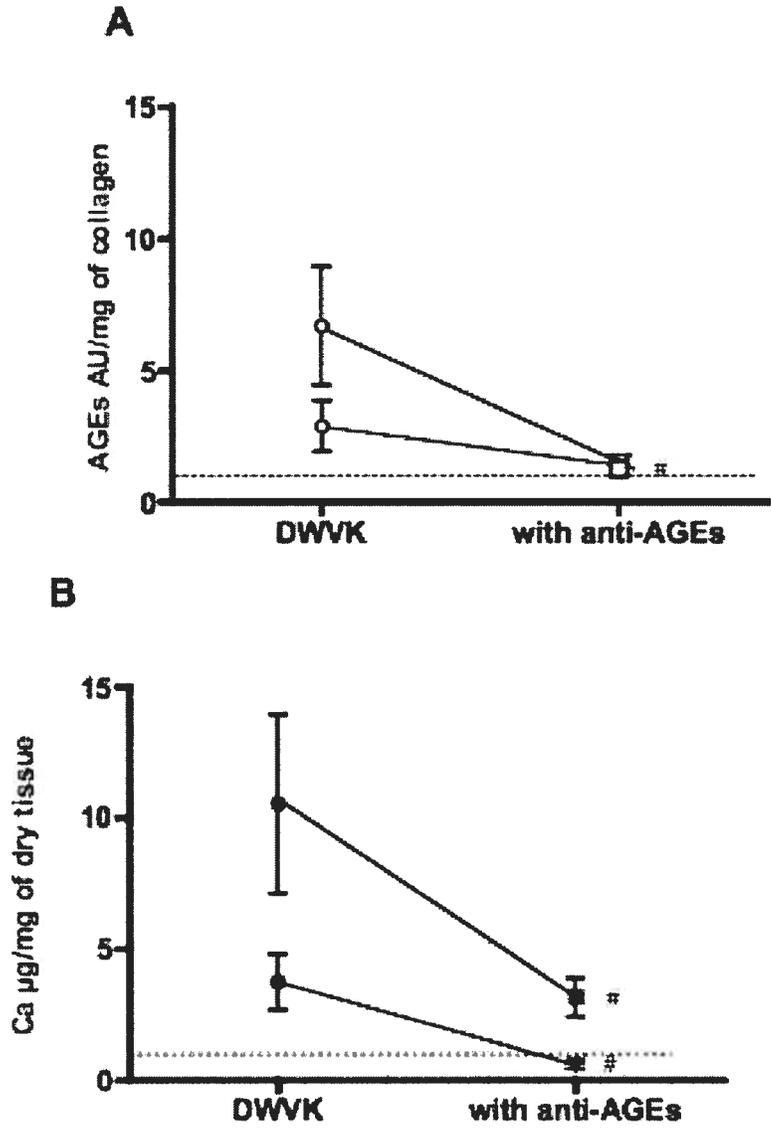
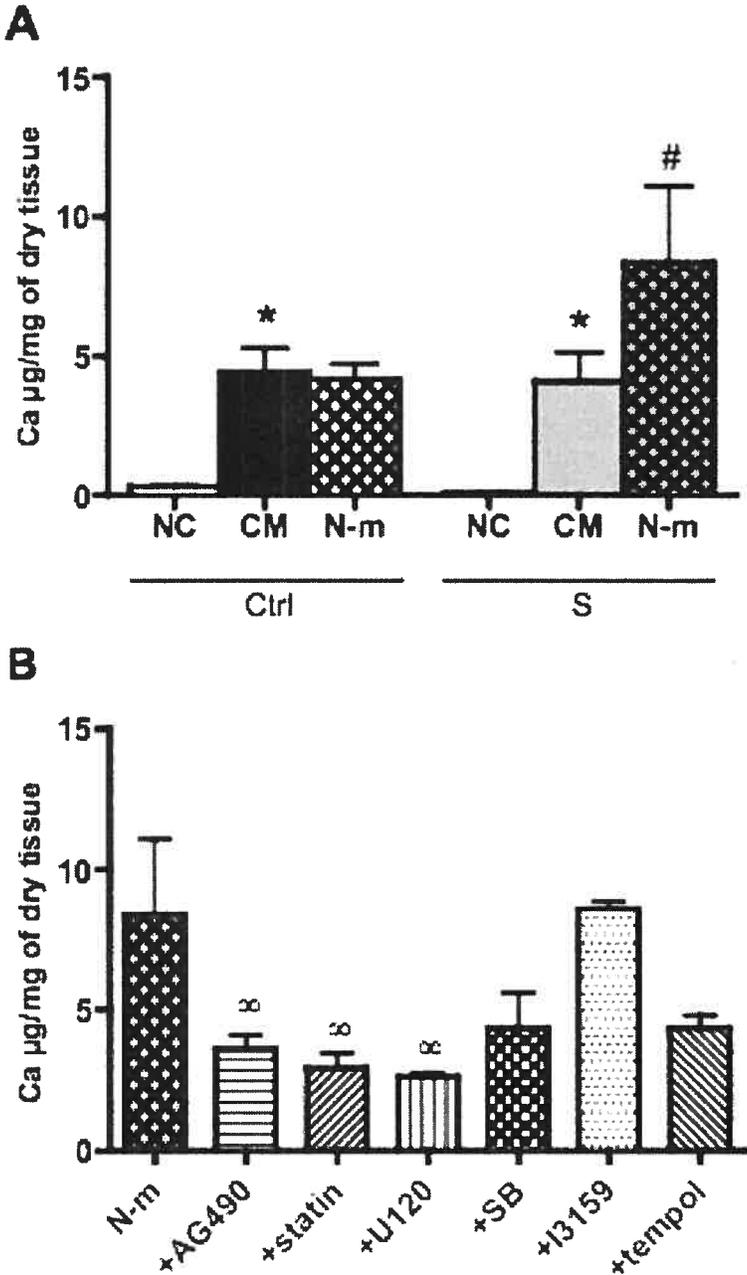


Figure 3.



## 6. Discussion et perspectives

L'hypertension systolo-diastolique et l'HSI exercent une influence négative sur différents organes. Les patients atteints d'hypertension systolo-diastolique risquent plus de développer une maladie cardiovasculaire que les patients non-hypertendus. Chez les hommes, 37% des maladies cardiovasculaires sont attribuables à l'hypertension artérielle<sup>363</sup>. En outre, si un diabète (type 1 ou type 2) complique ces pathologies, les risques de développer des maladies cardiovasculaires sont multipliés. Dans le cas de l'accident vasculaire cérébral, le risque d'apparition est multiplié par deux et de mortalité par trois, si un diabète de type 2 est associé à l'hypertension systolo-diastolique<sup>364</sup>.

L'effet délétère de l'hypertension systolo-diastolique serait dû, au moins en partie, au remodelage vasculaire eutrophique. En effet, Rizzoni et al. ont démontré que le rapport média/lumière d'artères de résistance cutanées était significativement associé avec l'apparition de maladies cardiovasculaires<sup>365</sup>. De plus, on observe une raréfaction des artérioles et des capillaires. Ceci provoque une diminution de la perfusion des organes cibles, favorisant l'apparition de maladies cardiovasculaires et rénales. D'ailleurs, une corrélation négative entre la densité capillaire au niveau cutané et le risque d'apparition de maladies cardiovasculaires a été démontrée<sup>366</sup>. Mais l'HSI, qui ne présente pas de remodelage eutrophique mais une rigidité vasculaire, est aussi associée à une augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires. Il semble que la pression systolique et la pression pulsée, augmentée de façon plus importante dans l'HSI que dans l'hypertension systolo-diastolique, sont de bons prédicteurs de l'apparition de maladies cardiovasculaires. Franklin et al. ont établi une association positive entre la pression pulsée, la pression systolique et le risque de coronaropathies. Cette association était négative avec la pression diastolique<sup>367</sup>. L'étude Brisighella Heart a également permis de démontrer que la pression systolique était un meilleur prédicteur des coronaropathies et des maladies cérébrovasculaires que la pression diastolique<sup>368</sup>. En outre, chez les patients âgés, la

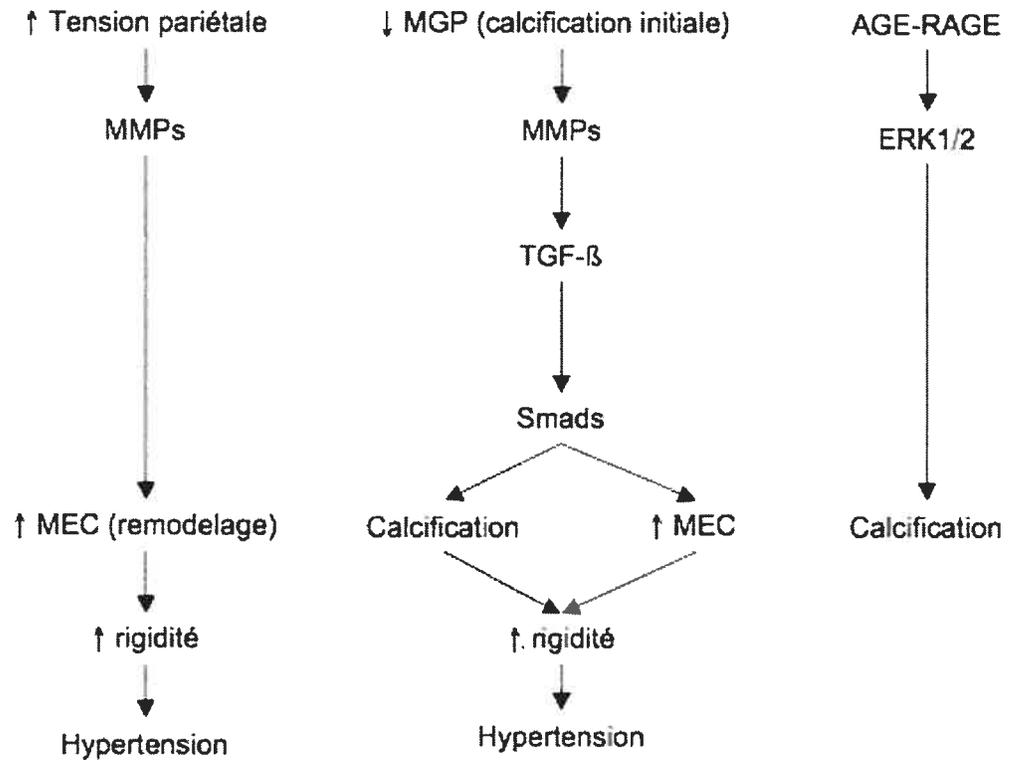
pression pulsée permet une meilleure évaluation du risque cardiovasculaire que la pression artérielle moyenne<sup>369</sup>. Enfin, l'accélération de la vitesse de l'onde de pouls, indice de rigidité vasculaire, est un prédicteur indépendant de la mortalité chez les patients atteints d'hypertension systolique isolée<sup>370</sup> ou d'hypertension systolo-diastolique<sup>231</sup>. Donc, il semble que la rigidité vasculaire joue un rôle important dans les dommages faits aux organes cibles par l'hypertension artérielle.

Toutes les études évaluant l'impact de traitements antihypertenseurs sur la mortalité et la morbidité ont montré que la baisse de la pression artérielle permettait de réduire la mortalité générale de 20 % et la mortalité d'origine cardiovasculaire de 33 %<sup>371</sup>. Cependant, beaucoup d'études montrent aussi que la normalisation de la pression systolique est difficile à atteindre contrairement à celle de la pression diastolique. En moyenne, les traitements antihypertenseurs permettent de réduire la pression diastolique jusqu'à la valeur cible chez 90% des patients tandis qu'ils ne sont efficaces que dans 50% des cas pour la pression systolique<sup>372-374</sup>. Mais le contrôle de la pression systolique n'est-il pas important ? Benetos et al. ont montré que les patients hypertendus traités, mais avec une pression systolique non-contrôlée, présentaient un risque de mortalité suite à une maladie cardiovasculaire beaucoup plus élevé que les patients présentant une pression diastolique non-contrôlée<sup>375</sup>. Donc, un contrôle efficace de la pression systolique est très important. La pression systolique dépend de l'éjection ventriculaire gauche, de la rigidité des artères de conductance et de la résistance périphérique (accrue par le remodelage eutrophique et la raréfaction des artérioles et capillaires). Les traitements antihypertenseurs permettent actuellement de réduire l'éjection ventriculaire et la résistance périphérique, mais leur efficacité sur la pression systolique est mitigée. Pour améliorer ces résultats peut-être faudrait-il choisir la troisième voie, celle de diminuer la rigidité artérielle pour améliorer la pression systolique ou au moins limiter sa progression afin de ralentir les conséquences cardiovasculaires. Pour cela, il est indispensable de connaître et comprendre les causes de l'augmentation de la rigidité vasculaire : la fragmentation de l'élastine, l'élastocalcinoïse, l'augmentation des liaisons covalentes au niveau du collagène et l'accumulation de collagène et de fibronectine. Cette dernière est présente aussi bien dans les artères soumises

à une calcification artérielle médiale menant à l'HSI (résultats non-publiés) que dans les remodelages associés à l'hypertension systolo-diastolique<sup>376</sup>.

Mes travaux de doctorat ont porté sur le développement des remodelages vasculaires associés à l'hypertension systolo-diastolique, de la calcification artérielle médiale associée à l'hypertension systolique isolée et son accélération par le diabète. En résumé, nous avons montré, dans des modèles animaux, que les métalloprotéinases étaient impliquées dans les remodelages liés à l'hypertension systolo-diastolique et dans la calcification artérielle médiale (parties 2 et 3). Les métalloprotéinases semblent indispensables à l'évolution de la calcification et du remodelage hypertrophique survenant dans l'aorte, comme l'a démontré leur inhibition par la doxycycline. En outre, nous avons observés que, suite à l'activation transitoire de MMP-9, l'activité de TGF- $\beta$  augmentait durant le processus de calcification. Des expériences sur un modèle ex vivo de calcification artérielle médiale ont démontré le rôle crucial de TGF- $\beta$  dans ce processus (partie 3). Enfin, dans un modèle de calcification accélérée par le diabète (partie 4), nous avons observé que la formation de produits avancés de glycation occupait une place importante dans le développement de la calcification artérielle médiale. En outre, l'effet des produits avancés de glycation pourrait être dû en partie à l'activation de leur récepteur : RAGE (partie 5). Nous pouvons présenter ces différents résultats sous la formes des trois schémas (Figure 24).

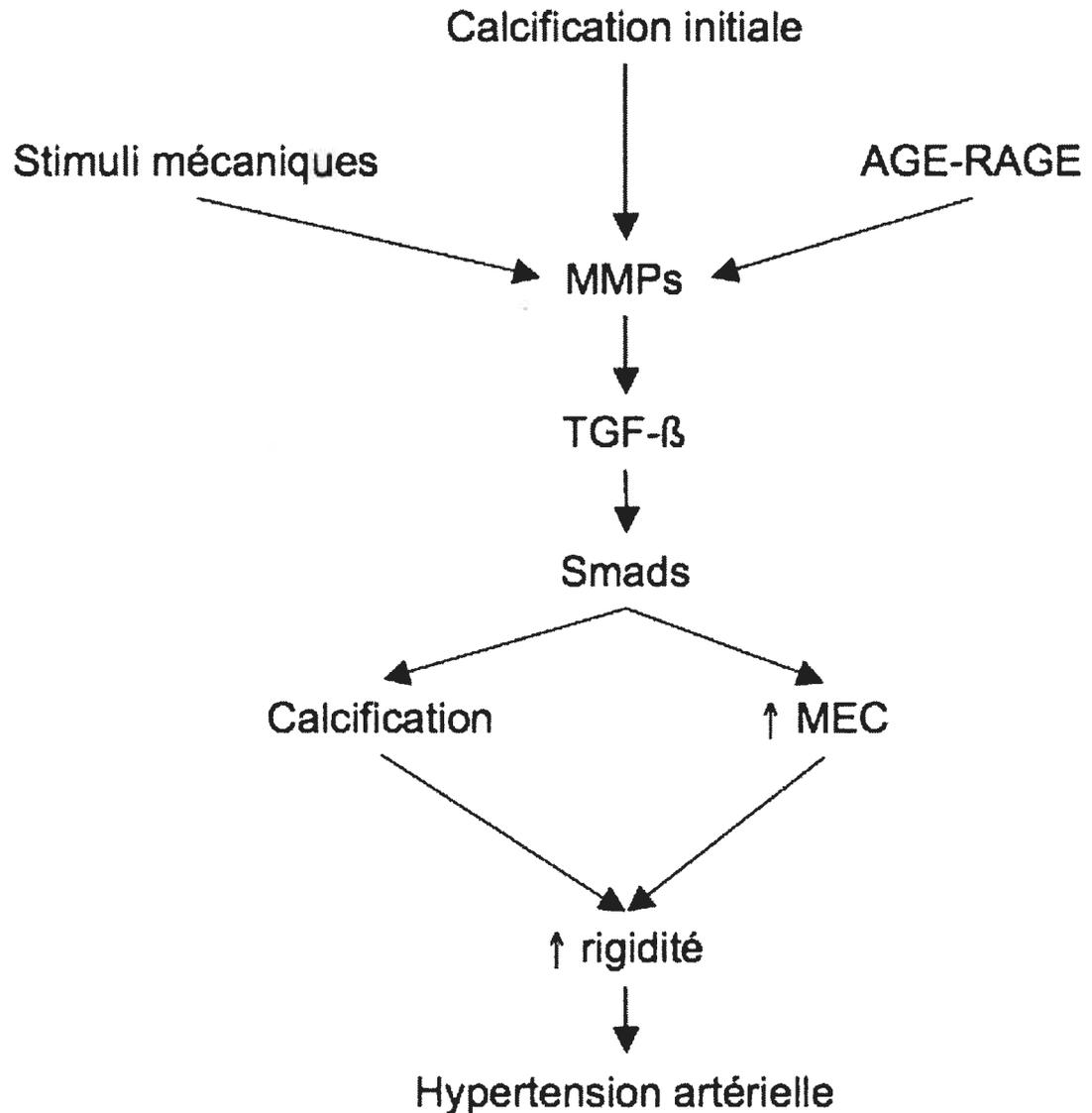
Figure 24. Synthèse schématique des résultats présentés dans la thèse.



AGE : produits avancés de glycation, RAGE : récepteur des produits avancés de glycation, ERK1/2 : extracellular signal regulated protein kinase, MEC : matrice extracellulaire, MGP : matrix Gla protein, MMPs : métalloprotéinases matricielles, TGF- $\beta$  : tissue growth-factor beta.

Ces trois processus distincts présentent des similitudes. Ils pourraient en fait former un seul processus impliqué dans la rigidité vasculaire et l'hypertension artérielle. Nous avons représenté ce schéma commun dans la figure suivante :

Figure 25. Schéma du développement de remodelages vasculaires avec accumulation de matrice extracellulaire.



AGE : produits avancés de glycation, RAGE : récepteur des produits avancés de glycation, MEC : matrice extracellulaire, MMPs : métalloprotéinases matricielles, TGF-β : tissu growth-factor beta.

Dans les travaux composant cette thèse, nous avons montré l'implication cruciale des métalloprotéinases (excepté pour le remodelage eutrophique). En outre, TGF-β peut

être libéré de la matrice extra-cellulaire, où il est stocké sous sa forme latente, par des MMPs (voir introduction p19). L'étude de la littérature scientifique permet d'amasser d'autres preuves confirmant ce schéma. Pour cela il faut répondre à quelques questions. 1) L'interaction AGE-RAGE peut-elle stimuler la synthèse et l'activité des MMPs ? 2) Cette interaction est-elle impliquée dans l'activation de TGF- $\beta$  et des Smads ? 3) TGF- $\beta$  est-il impliqué dans le remodelage associé à l'hypertension systolo-diastolique ? 4) Les éléments constituant le schéma jouent-ils un rôle au sein d'autres remodelages cardiovasculaires ?

Une accumulation de AGEs est associée à l'augmentation de la rigidité du cartilage avec le vieillissement comme au niveau vasculaire <sup>377</sup>. In vitro, la stimulation des chondrocytes par les AGEs provoquait une augmentation de la production de MMPs de façon dose-dépendante. Cette augmentation semblait dépendre des RAGEs, de p38 et JNK <sup>378</sup>. Ces résultats vont dans le même sens que des observations préliminaires, montrant que la stimulation des chondrocytes par S100A, un ligand de RAGE, augmentait la phosphorylation de MAPkinases et l'activation de NF- $\kappa$ B suivies par une production accrue de MMP-13 <sup>379</sup>. Donc, l'interaction ligand-RAGE peut stimuler la production de MMPs grâce à l'activation des MAPkinases. Rappelons que, dans le modèle ex vivo de calcification, la calcification artérielle médiale était stimulée par une interaction ligand-RAGE et que cette stimulation était bloquée par un inhibiteur de ERK1/2 (partie 5). Donc, il pourrait aussi y avoir une production accrue de MMPs dans le contexte de la calcification induite par le diabète. Notons d'ailleurs que les niveaux plasmatiques de MMP-2 et MMP-9 chez les patients diabétiques, présentant des taux élevés de AGEs, sont beaucoup plus élevés que chez les sujets sains <sup>380</sup>. Dans le même sens, les AGEs semblent stimuler la production de TGF- $\beta$ . L'administration de AGEs à des souris produit une augmentation de l'expression du gène du collagène IV s'accompagnant d'un accroissement de TGF- $\beta$  <sup>291</sup>. En outre, Rumble et al. ont montré que le remodelage hypertrophique des artères de résistance associé au diabète pouvait être prévenu par l'aminoguanidine (qui prévient la formation des AGEs). En plus de réduire l'expression du gène de la sous-unité  $\alpha$  du collagène IV, l'aminoguanidine prévient l'expression du gène de TGF- $\beta$  <sup>381</sup>. D'après les travaux de Li et al, il semble que les AGEs activent les Smads grâce à TGF- $\beta$  et

indépendamment de TGF- $\beta$ . La stimulation directe des Smads par les AGEs était régulée par RAGE et un mécanisme dépendant des MAP kinases ERK et p38<sup>289</sup>.

Par ailleurs, plusieurs indices indiquent une implication de TGF- $\beta$  dans le remodelage vasculaire lié à l'hypertension systolo-diastolique. D'une part, TGF- $\beta$  est fortement exprimé dans l'aorte des rats spontanément hypertendus SHR<sup>382</sup>. D'autre part, les expériences de O'Callaghan et al. ont montré que les CMLVs, soumises à une contrainte mécanique, synthétisaient du collagène et de la fibronectine. En outre, une activation de la MMP-2 se produisait, comme dans notre modèle d'hypertension induite par le L-NAME (partie 2). Ces expériences ont surtout mis en évidence le rôle de TGF- $\beta$  dans la production des composés de la MEC. En plus d'observer une augmentation de l'expression de l'ARNmessenger de TGF- $\beta$ , l'utilisation d'un anticorps anti-TGF- $\beta$  a permis d'inhiber la synthèse de collagène. Donc, ces résultats suggèrent que TGF- $\beta$  joue un rôle clé dans la synthèse de MEC par les CMLVs soumises à des contraintes similaires à celles imposées par les variations de pression<sup>383</sup>. De plus, TGF- $\beta$  est exprimé dans la fibrose cardiaque liée à l'hypertension. Son inhibition permet là-aussi de prévenir la synthèse de collagène et ainsi d'empêcher la fibrose<sup>384</sup>. Notons que l'expression de TGF- $\beta$  est également augmentée dans le remodelage vasculaire induit par une augmentation de flux sanguin<sup>385, 386</sup>. D'ailleurs, ce remodelage fait aussi intervenir des MMPs. Leur inhibition par la doxycycline prévient aussi dans ce cas le remodelage vasculaire<sup>387</sup>.

Comme les traitements actuels sont moyennement efficaces pour diminuer la pression systolique, il serait préférable de sélectionner une cible particulière associée au processus de rigidification de la paroi vasculaire. Les mécanismes que j'ai étudié au cours de ma thèse sont reliés à la fibrose de la paroi et à la formation de liaisons covalentes au niveau des fibres de collagène. La fibrose de la paroi vasculaire peut être contrôlée par les inhibiteurs du système rénine-angiotensine. En effet, *in vitro*, l'angiotensine II stimule l'activation du promoteur de TGF- $\beta$  via l'activation de p38 MAPkinase<sup>388</sup> et la synthèse de collagène dans les CMLVs<sup>389</sup>. *In vivo*, un antagoniste des récepteur AT<sub>1</sub> prévient le remodelage hypertrophique de l'aorte chez des rats hypertendus SHR<sup>390</sup>. Enfin, plusieurs

études ont montré que l'utilisation d'antagoniste des récepteurs AT<sub>1</sub> ou d'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine permettait une diminution de la rigidité et une amélioration de la structure des artères de résistance de patients hypertendus<sup>391-393</sup>. Le tonus musculaire lisse intervient aussi dans le processus de rigidité vasculaire. La relaxation des CMLVs s'obtient grâce à l'utilisation de vasodilatateurs. Toutefois, seuls quelques médicaments démontrent une efficacité sur la paroi des artères de conductance en plus de leur effet sur les artères de résistance. Ce sont les dérivés nitrés<sup>394</sup> et l'omapatrilat<sup>395</sup>. Notons que l'omapatrilat combine une inhibition de l'endopeptidase neutre et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Cette molécule pourrait agir sur la fibrose, en plus d'agir sur le tonus des CMLVs. D'ailleurs, l'étude OCTAVE a montré que l'omapatrilat réduisait la pression systolique de façon plus importante que l'enalapril<sup>396</sup>. Enfin, l'utilisation de l'ALT711 (alagebrium), en diminuant les liaisons covalentes entre les fibres de collagène formées par la glycation non-enzymatique, permet d'améliorer la compliance des artères de conductance chez les patients âgés<sup>346,347</sup>.

Mon projet de doctorat a permis un avancement dans la compréhension des interactions cellule-matrice dans le remodelage vasculaire. L'émergence des MMPs, de TGF- $\beta$  et des produits avancés de glycation dans plusieurs processus de remodelage vasculaire pourrait permettre d'orienter une thérapie anti-hypertensive sur ces cibles. Même si certains traitements disponibles ou en cours d'évaluation visent indirectement ces cibles, de nouvelles molécules pourraient agir plus directement et ainsi améliorer le contrôle de la pression artérielle. D'autres études seront nécessaires pour évaluer l'exactitude de la succession d'évènements impliqués dans l'augmentation de la rigidité des artères que nous suggérons à la figure 23 et déterminer quel facteur serait le plus intéressant à contrôler et à quel moment dans le processus de remodelage ou de vieillissement vasculaires.

## Bibliographie

1. Levick JR. An introduction to cardiovascular physiology. 4th ed. London: Arnold; 2003.
2. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cmlv/index.htm>.
3. Kitazawa T, Takizawa N, Ikebe M, Eto M. Reconstitution of protein kinase C-induced contractile Ca<sup>2+</sup> sensitization in triton X-100-demembrated rabbit arterial smooth muscle. *The Journal of physiology*. 1999;520 Pt 1:139-152.
4. Eto M, Ohmori T, Suzuki M, Furuya K, Morita F. A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *Journal of biochemistry*. 1995;118:1104-1107.
5. Feng J, Ito M, Ichikawa K, Isaka N, Nishikawa M, Hartshorne DJ, Nakano T. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*. 1999;274:37385-37390.
6. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*. 1996;271:20246-20249.
7. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 1996;273:245-248.
8. Brophy CM, Dickinson M, Woodrum D. Phosphorylation of the small heat shock-related protein, HSP20, in vascular smooth muscles is associated with changes in the macromolecular associations of HSP20. *J Biol Chem*. 1999;274:6324-6329.
9. Beall A, Bagwell D, Woodrum D, Stoming TA, Kato K, Suzuki A, Rasmussen H, Brophy CM. The small heat shock-related protein, HSP20, is phosphorylated on serine 16 during cyclic nucleotide-dependent relaxation. *J Biol Chem*. 1999;274:11344-11351.
10. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews*. 2002;3:349-363.

11. Birk DE, Bruckner P. Collagen suprastructures. *Collagen*. Vol 247. Heidelberg: Springer Berlin; 2005:185-205.
12. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci*. 2005;118:1341-1353.
13. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *Faseb J*. 1991;5:2814-2823.
14. Tasab M, Batten MR, Bulleid NJ. Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. *The EMBO journal*. 2000;19:2204-2211.
15. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci*. 1990;95 ( Pt 4):649-657.
16. Eyre DR, Wu JJ, Fernandes RJ, Pietka TA, Weis MA. Recent developments in cartilage research: matrix biology of the collagen II/IX/XI heterofibril network. *Biochemical Society transactions*. 2002;30:893-899.
17. Ricard-Blum S, Ruggiero F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol (Paris)*. 2005;53:430-442.
18. Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:2146-2154.
19. Zhang G, Ezura Y, Chervoneva I, Robinson PS, Beason DP, Carine ET, Soslowsky LJ, Iozzo RV, Birk DE. Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development. *J Cell Biochem*. 2006;98:1436-1449.
20. Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol*. 1998;17:1-19.
21. Scott JE. Structure and function in extracellular matrices depend on interactions between anionic glycosaminoglycans. *Pathol Biol (Paris)*. 2001;49:284-289.

22. Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev.* 2005;85:979-1000.
23. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci.* 2002;115:2817-2828.
24. Hinek A. Biological roles of the non-integrin elastin/laminin receptor. *Biological chemistry.* 1996;377:471-480.
25. Arribas SM, Hinek A, Gonzalez MC. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacology & therapeutics.* 2006;111:771-791.
26. Zhang H, Hu W, Ramirez F. Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *The Journal of cell biology.* 1995;129:1165-1176.
27. Lemaire R, Bayle J, Mecham RP, Lafyatis R. Microfibril-associated MAGP-2 stimulates elastic fiber assembly. *J Biol Chem.* 2007;282:800-808.
28. Colombatti A, Doliana R, Bot S, Canton A, Mongiat M, Mungiguerra G, Paron-Cilli S, Spessotto P. The EMILIN protein family. *Matrix Biol.* 2000;19:289-301.
29. Bressan GM, Daga-Gordini D, Colombatti A, Castellani I, Marigo V, Volpin D. Emilin, a component of elastic fibers preferentially located at the elastin-microfibrils interface. *The Journal of cell biology.* 1993;121:201-212.
30. Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC, Ouchi T, Yanagisawa M, Richardson JA, Olson EN. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature.* 2002;415:168-171.
31. Jacob MP. [Fibulin-5 is essential for elastic fiber development]. *Med Sci (Paris).* 2003;19:395-397.
32. Orend G, Chiquet-Ehrismann R. Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. *Experimental cell research.* 2000;261:104-110.
33. Sage EH, Bornstein P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J Biol Chem.* 1991;266:14831-14834.

34. Ghosh J, Murphy MO, Turner N, Khwaja N, Halka A, Kielty CM, Walker MG. The role of transforming growth factor beta1 in the vascular system. *Cardiovasc Pathol.* 2005;14:28-36.
35. Sheppard D. Roles of alphav integrins in vascular biology and pulmonary pathology. *Current opinion in cell biology.* 2004;16:552-557.
36. Verrecchia F, Mauviel A. Control of connective tissue gene expression by TGF beta: role of Smad proteins in fibrosis. *Current rheumatology reports.* 2002;4:143-149.
37. Smith-Mungo LI, Kagan HM. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol.* 1998;16:387-398.
38. Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem.* 2003;88:660-672.
39. Kagan HM, Williams MA, Williamson PR, Anderson JM. Influence of sequence and charge on the specificity of lysyl oxidase toward protein and synthetic peptide substrates. *J Biol Chem.* 1984;259:11203-11207.
40. Molnar J, Fong KS, He QP, Hayashi K, Kim Y, Fong SF, Fogelgren B, Szauter KM, Mink M, Csiszar K. Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochimica et biophysica acta.* 2003;1647:220-224.
41. Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nature reviews.* 2003;4:140-156.
42. Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *Faseb J.* 1991;5:3071-3077.
43. Bakker EN, Pisteia A, Spaan JA, Rolf T, de Vries CJ, van Rooijen N, Candi E, VanBavel E. Flow-dependent remodeling of small arteries in mice deficient for tissue-type transglutaminase: possible compensation by macrophage-derived factor XIII. *Circ Res.* 2006;99:86-92.
44. Thomazy V, Fesus L. Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study. *Cell and tissue research.* 1989;255:215-224.

45. Martinez-Lemus LA, Wu X, Wilson E, Hill MA, Davis GE, Davis MJ, Meininger GA. Integrins as unique receptors for vascular control. *Journal of vascular research*. 2003;40:211-233.
46. Arribas J, Bech-Serra JJ, Santiago-Josefat B. ADAMs, cell migration and cancer. *Cancer metastasis reviews*. 2006;25:57-68.
47. Loftus JC, Liddington RC. Cell adhesion in vascular biology. New insights into integrin-ligand interaction. *J Clin Invest*. 1997;99:2302-2306.
48. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*. 1984;309:30-33.
49. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual review of cell and developmental biology*. 1996;12:697-715.
50. Underwood PA, Bennett FA, Kirkpatrick A, Bean PA, Moss BA. Evidence for the location of a binding sequence for the alpha 2 beta 1 integrin of endothelial cells, in the beta 1 subunit of laminin. *Biochem J*. 1995;309 ( Pt 3):765-771.
51. Eble JA, Golbik R, Mann K, Kuhn K. The alpha 1 beta 1 integrin recognition site of the basement membrane collagen molecule [alpha 1(IV)]2 alpha 2(IV). *The EMBO journal*. 1993;12:4795-4802.
52. Shattil SJ, Ginsberg MH. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest*. 1997;100:1-5.
53. Sheppard D. In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice. *Matrix Biol*. 2000;19:203-209.
54. de Melker AA, Sterk LM, Delwel GO, Fles DL, Daams H, Weening JJ, Sonnenberg A. The A and B variants of the alpha 3 integrin subunit: tissue distribution and functional characterization. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1997;76:547-563.
55. Rodgers UR, Weiss AS. Integrin alpha v beta 3 binds a unique non-RGD site near the C-terminus of human tropoelastin. *Biochimie*. 2004;86:173-178.
56. Fulop T, Jr., Jacob MP, Khalil A, Wallach J, Robert L. Biological effects of elastin peptides. *Pathol Biol (Paris)*. 1998;46:497-506.

57. Hinek A, Wrenn DS, Mecham RP, Barondes SH. The elastin receptor: a galactoside-binding protein. *Science*. 1988;239:1539-1541.
58. Fulop T, Jr., Douziech N, Jacob MP, Hauck M, Wallach J, Robert L. Age-related alterations in the signal transduction pathways of the elastin-laminin receptor. *Pathol Biol (Paris)*. 2001;49:339-348.
59. Rodgers UR, Weiss AS. Cellular interactions with elastin. *Pathol Biol (Paris)*. 2005;53:390-398.
60. Hou G, Vogel WF, Bendeck MP. Tyrosine kinase activity of discoidin domain receptor 1 is necessary for smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression. *Circ Res*. 2002;90:1147-1149.
61. Shyu KG, Chao YM, Wang BW, Kuan P. Regulation of discoidin domain receptor 2 by cyclic mechanical stretch in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2005;46:614-621.
62. Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Molecular cell*. 1997;1:13-23.
63. Hou G, Vogel W, Bendeck MP. The discoidin domain receptor tyrosine kinase DDR1 in arterial wound repair. *J Clin Invest*. 2001;107:727-735.
64. Olaso E, Labrador JP, Wang L, Ikeda K, Eng FJ, Klein R, Lovett DH, Lin HC, Friedman SL. Discoidin domain receptor 2 regulates fibroblast proliferation and migration through the extracellular matrix in association with transcriptional activation of matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem*. 2002;277:3606-3613.
65. Barrett AJ. *Proteolytic enzymes : serine and cysteine peptidases*. San Diego ; Toronto: Academic Press; 1994.
66. Barrett AJ. *Proteolytic enzymes : aspartic and metallo peptidases*. San Diego ;; Toronto : Academic Press; 1995.
67. Hooper NM. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett*. 1994;354:1-6.
68. Stocker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Ruth FX, McKay DB, Bode W. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins,

- adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* 1995;4:823-840.
69. Boldt HB, Overgaard MT, Laursen LS, Weyer K, Sottrup-Jensen L, Oxvig C. Mutational analysis of the proteolytic domain of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): classification as a metzincin. *Biochem J.* 2001;358:359-367.
  70. Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT, Bailey KR, Christiansen M, Holmes DR, Jr., Virmani R, Oxvig C, Schwartz RS. Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2001;345:1022-1029.
  71. Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Gleich GJ, Hays LG, Yates JR, 3rd, Conover CA. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:3149-3153.
  72. Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis. *Circ Res.* 2000;86:125-130.
  73. Bond JS, Matters GL, Banerjee S, Dusheck RE. Meprin metalloprotease expression and regulation in kidney, intestine, urinary tract infections and cancer. *FEBS Lett.* 2005;579:3317-3322.
  74. Ge G, Greenspan DS. Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2006;78:47-68.
  75. Ge G, Greenspan DS. BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein. *The Journal of cell biology.* 2006;175:111-120.
  76. [http://people.virginia.edu/~jw7g/Table\\_of\\_the\\_ADAMs.html](http://people.virginia.edu/~jw7g/Table_of_the_ADAMs.html).
  77. Gendron C, Kashiwagi M, Lim NH, Enghild JJ, Thogersen IB, Hughes C, Caterson B, Nagase H. Proteolytic activities of human ADAMTS-5: Comparative studies with human ADAMTS-4. *J Biol Chem.* 2007.
  78. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology.* 2001;17:463-516.
  79. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem.* 2003;253:269-285.

80. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274:21491-21494.
81. Warshel A, Naray-Szabo G, Sussman F, Hwang JK. How do serine proteases really work? *Biochemistry.* 1989;28:3629-3637.
82. Bonnefoy A, Legrand C. Proteolysis of subendothelial adhesive glycoproteins (fibronectin, thrombospondin, and von Willebrand factor) by plasmin, leukocyte cathepsin G, and elastase. *Thromb Res.* 2000;98:323-332.
83. Liotta LA, Goldfarb RH, Terranova VP. Cleavage of laminin by thrombin and plasmin: alpha thrombin selectively cleaves the beta chain of laminin. *Thromb Res.* 1981;21:663-673.
84. Lijnen HR. Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:226-236.
85. Lijnen HR, Silence J, Lemmens G, Frederix L, Collen D. Regulation of gelatinase activity in mice with targeted inactivation of components of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost.* 1998;79:1171-1176.
86. Gelb BD, Shi GP, Chapman HA, Desnick RJ. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science.* 1996;273:1236-1238.
87. Chapman HA, Riese RJ, Shi GP. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:63-88.
88. Maciewicz RA, Etherington DJ. A comparison of four cathepsins (B, L, N and S) with collagenolytic activity from rabbit spleen. *Biochem J.* 1988;256:433-440.
89. Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA, Libby P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1998;102:576-583.
90. Cheng XW, Obata K, Kuzuya M, Izawa H, Nakamura K, Asai E, Nagasaka T, Saka M, Kimata T, Noda A, Nagata K, Jin H, Shi GP, Iguchi A, Murohara T, Yokota M. Elastolytic cathepsin induction/activation system exists in myocardium and is upregulated in hypertensive heart failure. *Hypertension.* 2006;48:979-987.

91. Maquart FX, Bellon G, Pasco S, Monboisse JC. Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie*. 2005;87:353-360.
92. Bou-Gharios G, Ponticos M, Rajkumar V, Abraham D. Extra-cellular matrix in vascular networks. *Cell proliferation*. 2004;37:207-220.
93. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical physiology : a cellular and molecular approach*. Philadelphia, PA ; Toronto: W.B. Saunders; 2003.
94. Schmitt M, Blackman DJ, Middleton GW, Cockcroft JR, Frenneaux MP. Assessment of venous capacitance. *Radionuclide plethysmography: methodology and research applications*. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;54:565-576.
95. Glagov S, Vito R, Giddens DP, Zarins CK. Micro-architecture and composition of artery walls: relationship to location, diameter and the distribution of mechanical stress. *J Hypertens Suppl*. 1992;10:S101-104.
96. Short DS, Thomson AD. The arteries of the small intestine in systemic hypertension. *The Journal of pathology and bacteriology*. 1959;78:321-334.
97. Korsgaard N, Aalkjaer C, Heagerty AM, Izzard AS, Mulvany MJ. Histology of subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension. *Hypertension*. 1993;22:523-526.
98. Mulvany MJ. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci*. 2002;17:105-109.
99. Girerd X, Mourad JJ, Copie X, Moulin C, Acar C, Safar M, Laurent S. Noninvasive detection of an increased vascular mass in untreated hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 1994;7:1076-1084.
100. Ferrara LA, Mancini M, Celentano A, Galderisi M, Iannuzzi R, Marotta T, Gaeta I. Early changes of the arterial carotid wall in uncomplicated primary hypertensive patients. Study by ultrasound high-resolution B-mode imaging. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:1290-1296.
101. Kato H, Hou J, Chobanian AV, Brecher P. Effects of angiotensin II infusion and inhibition of nitric oxide synthase on the rat aorta. *Hypertension*. 1996;28:153-158.

102. Owens GK. Influence of blood pressure on development of aortic medial smooth muscle hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1987;9:178-187.
103. Fridez P, Zulliger M, Bobard F, Montorzi G, Miyazaki H, Hayashi K, Stergiopoulos N. Geometrical, functional, and histomorphometric adaptation of rat carotid artery in induced hypertension. *Journal of biomechanics*. 2003;36:671-680.
104. Rizzoni D, Porteri E, Castellano M, Bettoni G, Muiesan ML, Muiesan P, Giulini SM, Agabiti-Rosei E. Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension*. 1996;28:785-790.
105. Deng LY, Schiffrin EL. Effects of endothelin on resistance arteries of DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1992;262:H1782-1787.
106. Korsgaard N, Mulvany MJ. Cellular hypertrophy in mesenteric resistance vessels from renal hypertensive rats. *Hypertension*. 1988;12:162-167.
107. Bakker EN, van der Meulen ET, van den Berg BM, Everts V, Spaan JA, VanBavel E. Inward remodeling follows chronic vasoconstriction in isolated resistance arteries. *Journal of vascular research*. 2002;39:12-20.
108. Bayliss WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *The Journal of physiology*. 1902;28:220-231.
109. Osol G, Halpern W. Myogenic properties of cerebral blood vessels from normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1985;249:H914-921.
110. Harder DR. Pressure-dependent membrane depolarization in cat middle cerebral artery. *Circ Res*. 1984;55:197-202.
111. Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev*. 1999;79:387-423.
112. Yeon DS, Kim JS, Ahn DS, Kwon SC, Kang BS, Morgan KG, Lee YH. Role of protein kinase C- or RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization in stretch-induced myogenic tone. *Cardiovasc Res*. 2002;53:431-438.

113. Massett MP, Ungvari Z, Csiszar A, Kaley G, Koller A. Different roles of PKC and MAP kinases in arteriolar constrictions to pressure and agonists. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H2282-2287.
114. Ahn DS, Choi SK, Kim YH, Cho YE, Shin HM, Morgan KG, Lee YH. Enhanced stretch-induced myogenic tone in the basilar artery of spontaneously hypertensive rats. *Journal of vascular research.* 2007;44:182-191.
115. Deng LY, Li JS, Schiffrin EL. Endothelium-dependent relaxation of small arteries from essential hypertensive patients: mechanisms and comparison with normotensive subjects and with responses of vessels from spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond).* 1995;88:611-622.
116. Girardot D, Demeilliers B, deBlois D, Moreau P. ERK1/2-mediated vasoconstriction normalizes wall stress in small mesenteric arteries during NOS inhibition in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;42:339-347.
117. Kuo L, Davis MJ, Chilian WM. Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol.* 1990;259:H1063-1070.
118. Jalali S, del Pozo MA, Chen K, Miao H, Li Y, Schwartz MA, Shyy JY, Chien S. Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:1042-1046.
119. Muller JM, Chilian WM, Davis MJ. Integrin signaling transduces shear stress--dependent vasodilation of coronary arterioles. *Circ Res.* 1997;80:320-326.
120. Wu X, Mogford JE, Platts SH, Davis GE, Meininger GA, Davis MJ. Modulation of calcium current in arteriolar smooth muscle by alpha5 beta3 and alpha5 beta1 integrin ligands. *The Journal of cell biology.* 1998;143:241-252.
121. Waitkus-Edwards KR, Martinez-Lemus LA, Wu X, Trzeciakowski JP, Davis MJ, Davis GE, Meininger GA. alpha(4)beta(1) Integrin activation of L-type calcium channels in vascular smooth muscle causes arteriole vasoconstriction. *Circ Res.* 2002;90:473-480.

122. Martinez-Lemus LA, Sun Z, Trache A, Trzciakowski JP, Meininger GA. Integrins and regulation of the microcirculation: from arterioles to molecular studies using atomic force microscopy. *Microcirculation*. 2005;12:99-112.
123. Intengan HD, Thibault G, Li JS, Schiffrin EL. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats : effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. *Circulation*. 1999;100:2267-2275.
124. Heerkens EH, Shaw L, Ryding A, Brooker G, Mullins JJ, Austin C, Ohanian V, Heagerty AM.  $\alpha$ V integrins are necessary for eutrophic inward remodeling of small arteries in hypertension. *Hypertension*. 2006;47:281-287.
125. Jones PL, Jones FS, Zhou B, Rabinovitch M. Induction of vascular smooth muscle cell tenascin-C gene expression by denatured type I collagen is dependent upon a  $\beta$ 3 integrin-mediated mitogen-activated protein kinase pathway and a 122-base pair promoter element. *J Cell Sci*. 1999;112 ( Pt 4):435-445.
126. Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn*. 2000;218:235-259.
127. Chesler NC, Ku DN, Galis ZS. Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo. *Am J Physiol*. 1999;277:H2002-2009.
128. Asanuma K, Magid R, Johnson C, Nerem RM, Galis ZS. Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H1778-1784.
129. Intengan HD, Deng LY, Li JS, Schiffrin EL. Mechanics and composition of human subcutaneous resistance arteries in essential hypertension. *Hypertension*. 1999;33:569-574.
130. Sharifi AM, Schiffrin EL. Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: effect of endothelin receptor antagonism. *J Hypertens*. 1997;15:1441-1448.

131. Diep QN, Li JS, Schiffrin EL. In vivo study of AT(1) and AT(2) angiotensin receptors in apoptosis in rat blood vessels. *Hypertension*. 1999;34:617-624.
132. Diez J, Panizo A, Hernandez M, Pardo J. Is the regulation of apoptosis altered in smooth muscle cells of adult spontaneously hypertensive rats? *Hypertension*. 1997;29:776-780.
133. Dickhout JG, Lee RM. Apoptosis in the muscular arteries from young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1999;17:1413-1419.
134. Allen SP, Wade SS, Prewitt RL. Myogenic tone attenuates pressure-induced gene expression in isolated small arteries. *Hypertension*. 1997;30:203-208.
135. Martens FM, Demeilliers B, Girardot D, Daigle C, Dao HH, deBlois D, Moreau P. Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition: role of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Hypertension*. 2002;39:16-21.
136. Bardy N, Karillon GJ, Merval R, Samuel JL, Tedgui A. Differential effects of pressure and flow on DNA and protein synthesis and on fibronectin expression by arteries in a novel organ culture system. *Circ Res*. 1995;77:684-694.
137. Linder L, Kiowski W, Buhler FR, Luscher TF. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. *Circulation*. 1990;81:1762-1767.
138. Treasure CB, Manoukian SV, Klein JL, Vita JA, Nabel EG, Renwick GH, Selwyn AP, Alexander RW, Ganz P. Epicardial coronary artery responses to acetylcholine are impaired in hypertensive patients. *Circ Res*. 1992;71:776-781.
139. Negoro N, Kanayama Y, Haraguchi M, Umetani N, Nishimura M, Konishi Y, Iwai J, Okamura M, Inoue T, Takeda T. Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells in vivo. An autocrine mechanism promoting hypertensive vascular hypertrophy. *J Clin Invest*. 1995;95:1140-1150.
140. Dobrian A, Wade SS, Prewitt RL. PDGF-A expression correlates with blood pressure and remodeling in 1K1C hypertensive rat arteries. *Am J Physiol*. 1999;276:H2159-2167.

141. Sarzani R, Brecher P, Chobanian AV. Growth factor expression in aorta of normotensive and hypertensive rats. *J Clin Invest*. 1989;83:1404-1408.
142. Tremblay J, Hadrava V, Kruppa U, Hashimoto T, Hamet P. Enhanced growth-dependent expression of TGF beta 1 and hsp70 genes in aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1992;70:565-572.
143. Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Yukimura T, Miura K, Inada Y, Ishimura Y, Chatani F, Iwao H. Angiotensin II type I receptor antagonist inhibits the gene expression of transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;273:509-515.
144. Hadrava V, Tremblay J, Sekaly RP, Hamet P. Accelerated entry of aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats into the S phase of the cell cycle. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 1992;70:599-604.
145. Bezie Y, Lamaziere JM, Laurent S, Challande P, Cunha RS, Bonnet J, Lacolley P. Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1027-1034.
146. Hahn AW, Kern F, Jonas U, John M, Buhler FR, Resink TJ. Functional aspects of vascular tenascin-C expression. *Journal of vascular research*. 1995;32:162-174.
147. Intengan HD, Schiffrin EL. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*. 2000;36:312-318.
148. Olsen MH, Christensen MK, Wachtell K, Tuxen C, Fossum E, Bang LE, Wiinberg N, Devereux RB, Kjeldsen SE, Hildebrandt P, Dige-Petersen H, Rokkedal J, Ibsen H. Markers of collagen synthesis is related to blood pressure and vascular hypertrophy: a LIFE substudy. *J Hum Hypertens*. 2005;19:301-307.
149. Diez J, Laviades C, Mayor G, Gil MJ, Monreal I. Increased serum concentrations of procollagen peptides in essential hypertension. Relation to cardiac alterations. *Circulation*. 1995;91:1450-1456.

150. Laviades C, Varo N, Fernandez J, Mayor G, Gil MJ, Monreal I, Diez J. Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation*. 1998;98:535-540.
151. Hadjiisky P, Peyri N, Grosogeat Y. Tunica media changes in the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Atherosclerosis*. 1987;65:125-137.
152. Boumaza S, Arribas SM, Osborne-Pellegrin M, McGrath JC, Laurent S, Lacolley P, Challande P. Fenestrations of the carotid internal elastic lamina and structural adaptation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2001;37:1101-1107.
153. Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev*. 1982;62:347-504.
154. Park JB, Schiffrin EL. Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *J Hypertens*. 2001;19:921-930.
155. Rizzoni D, Muiesan ML, Porteri E, Castellano M, Zulli R, Bettoni G, Salvetti M, Monteduro C, Agabiti-Rosei E. Effects of long-term antihypertensive treatment with lisinopril on resistance arteries in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *J Hypertens*. 1997;15:197-204.
156. Li JS, Sharifi AM, Schiffrin EL. Effect of AT1 angiotensin-receptor blockade on structure and function of small arteries in SHR. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997;30:75-83.
157. Smith RD, Yokoyama H, Averill DB, Cooke L, Brosnihan KB, Schiffrin EL, Ferrario CM. The protective effects of angiotensin II blockade with olmesartan medoxomil on resistance vessel remodeling (The VIOS study): rationale and baseline characteristics. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2006;6:335-342.
158. Ono Z, Prewitt RL, Stacy DL. Arteriolar changes in developing and chronic stages of two-kidney, one clip hypertension. *Hypertension*. 1989;14:36-43.
159. Hashimoto H, Prewitt RL, Efaw CW. Alterations in the microvasculature of one-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1987;253:H933-940.

160. Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res.* 1998;39:77-88.
161. Bachmann S, Peters J, Engler E, Ganten D, Mullins J. Transgenic rats carrying the mouse renin gene--morphological characterization of a low-renin hypertension model. *Kidney Int.* 1992;41:24-36.
162. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension.* 1992;20:298-303.
163. Deng LY, Thibault G, Schiffrin EL. Effect of hypertension induced by nitric oxide synthase inhibition on structure and function of resistance arteries in the rat. *Clin Exp Hypertens.* 1993;15:527-537.
164. Jacob MP. [Extracellular matrix and vascular ageing]. *Med Sci (Paris).* 2006;22:273-278.
165. Benetos A, Laurent S, Hoeks AP, Boutouyrie PH, Safar ME. Arterial alterations with aging and high blood pressure. A noninvasive study of carotid and femoral arteries. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:90-97.
166. van der Heijden-Spek JJ, Staessen JA, Fagard RH, Hoeks AP, Boudier HA, van Bortel LM. Effect of age on brachial artery wall properties differs from the aorta and is gender dependent: a population study. *Hypertension.* 2000;35:637-642.
167. Nejjar I, Pieraggi MT, Thiers JC, Bouissou H. Age-related changes in the elastic tissue of the human thoracic aorta. *Atherosclerosis.* 1990;80:199-208.
168. Jiang CF, Avolio AP. Characterisation of structural changes in the arterial elastic matrix by a new fractal feature: directional fractal curve. *Medical & biological engineering & computing.* 1997;35:246-252.
169. Spina M, Garbin G. Age-related chemical changes in human elastins from non-atherosclerotic areas of thoracic aorta. *Atherosclerosis.* 1976;24:267-279.
170. Avolio A, Jones D, Tafazzoli-Shadpour M. Quantification of alterations in structure and function of elastin in the arterial media. *Hypertension.* 1998;32:170-175.

171. Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, Moreau P. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am J Hypertens*. 2003;16:103-110.
172. Gaillard V, Casellas D, Seguin-Devaux C, Schohn H, Dauca M, Atkinson J, Lartaud I. Pioglitazone improves aortic wall elasticity in a rat model of elastocalcinotic arteriosclerosis. *Hypertension*. 2005;46:372-379.
173. Hornebeck W, Derouette JC, Roland J, Chatelet F, Bouissou H, Robert L. [Correlation between age, arteriosclerosis and elastolytic activity of human aorta wall]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 1976;282:2003-2006.
174. Liu PY, Tsai WC, Lin CC, Hsu CH, Haung YY, Chen JH. Invasive measurements of pulse wave velocity correlate with the degree of aortic valve calcification and severity associated with matrix metalloproteinases in elderly patients with aortic valve stenosis. *Clin Sci (Lond)*. 2004;107:415-422.
175. Medley TL, Kingwell BA, Gatzka CD, Pillay P, Cole TJ. Matrix metalloproteinase-3 genotype contributes to age-related aortic stiffening through modulation of gene and protein expression. *Circ Res*. 2003;92:1254-1261.
176. Gnasso A, Motti C, Irace C, Carallo C, Liberatoscioli L, Bernardini S, Massoud R, Mattioli PL, Federici G, Cortese C. Genetic variation in human stromelysin gene promoter and common carotid geometry in healthy male subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1600-1605.
177. Medley TL, Cole TJ, Dart AM, Gatzka CD, Kingwell BA. Matrix metalloproteinase-9 genotype influences large artery stiffness through effects on aortic gene and protein expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1479-1484.
178. Yasmin, McEniery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Maki-Petaja K, Ashby MJ, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:372.

179. Klotz O. Studies upon calcareous degeneration: I. The process of pathological calcification. *J Exp Medecine*. 1905;7:633-675.
180. Blumenthal H, Lansing A, Wheeler P. Calcification of the media of the human aorta and its relation to intimal arteriosclerosis, ageing and disease. *American Journal of Pathology*. 1944;20:665-679.
181. Seligman M, Eilberg RF, Fishman L. Mineralization of elastin extracted from human aortic tissues. *Calcified tissue research*. 1975;17:229-234.
182. Vyavahare N, Jones PL, Tallapragada S, Levy RJ. Inhibition of matrix metalloproteinase activity attenuates tenascin-C production and calcification of implanted purified elastin in rats. *Am J Pathol*. 2000;157:885-893.
183. Bailey M, Pillarisetti S, Jones P, Xiao H, Simionescu D, Vyavahare N. Involvement of matrix metalloproteinases and tenascin-C in elastin calcification. *Cardiovasc Pathol*. 2004;13:146-155.
184. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, Baxter BT, Starcher BC, Vyavahare NR. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation*. 2004;110:3480-3487.
185. Qin X, Corriere MA, Matrisian LM, Guzman RJ. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1510-1516.
186. Niederhoffer N, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Duvivier C, Peslin R, Atkinson J. Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity. *Hypertension*. 1997;29:999-1006.
187. Guerin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F. Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15:1014-1021.
188. Spina M, Garbisa S, Hinnie J, Hunter JC, Serafini-Fracassini A. Age-related changes in composition and mechanical properties of the tunica media of the upper thoracic human aorta. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)*. 1983;3:64-76.

189. Michel JB, Heudes D, Michel O, Poitevin P, Philippe M, Scalbert E, Corman B, Levy BI. Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes. II. Large arteries. *Am J Physiol.* 1994;267:R124-135.
190. Bruel A, Oxlund H. Changes in biomechanical properties, composition of collagen and elastin, and advanced glycation endproducts of the rat aorta in relation to age. *Atherosclerosis.* 1996;127:155-165.
191. Paul RG, Bailey AJ. The effect of advanced glycation end-product formation upon cell-matrix interactions. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 1999;31:653-660.
192. Singh NN, Ramji DP. The role of transforming growth factor-beta in atherosclerosis. *Cytokine & growth factor reviews.* 2006;17:487-499.
193. Goto Y, Uchio-Yamada K, Anan S, Yamamoto Y, Ogura A, Manabe N. Transforming growth factor-beta1 mediated up-regulation of lysyl oxidase in the kidneys of hereditary nephrotic mouse with chronic renal fibrosis. *Virchows Arch.* 2005;447:859-868.
194. Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging. *Cardiovasc Res.* 2005;66:286-294.
195. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24:471-476.
196. Cernadas MR, Sanchez de Miguel L, Garcia-Duran M, Gonzalez-Fernandez F, Millas I, Monton M, Rodrigo J, Rico L, Fernandez P, de Frutos T, Rodriguez-Feo JA, Guerra J, Caramelo C, Casado S, Lopez F. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res.* 1998;83:279-286.
197. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998;78:547-581.

198. Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension*. 2001;37:529-534.
199. Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, Kaley G. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res*. 2002;90:1159-1166.
200. Bank AJ, Kaiser DR, Rajala S, Cheng A. In vivo human brachial artery elastic mechanics: effects of smooth muscle relaxation. *Circulation*. 1999;100:41-47.
201. Kinlay S, Creager MA, Fukumoto M, Hikita H, Fang JC, Selwyn AP, Ganz P. Endothelium-derived nitric oxide regulates arterial elasticity in human arteries in vivo. *Hypertension*. 2001;38:1049-1053.
202. Long DA, Newaz MA, Prabhakar SS, Price KL, Truong LD, Feng L, Mu W, Oyekan AO, Johnson RJ. Loss of nitric oxide and endothelial-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in aging. *Kidney Int*. 2005;68:2154-2163.
203. Woodman CR, Price EM, Laughlin MH. Selected Contribution: Aging impairs nitric oxide and prostacyclin mediation of endothelium-dependent dilation in soleus feed arteries. *J Appl Physiol*. 2003;95:2164-2170.
204. Yildiz O. Vascular smooth muscle and endothelial functions in aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1100:353-360.
205. Matz RL, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2000;49:11-18.
206. Koga T, Takata Y, Kobayashi K, Takishita S, Yamashita Y, Fujishima M. Ageing suppresses endothelium-dependent relaxation and generates contraction mediated by the muscarinic receptors in vascular smooth muscle of normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl*. 1988;6:S243-245.

207. de Sotomayor MA, Perez-Guerrero C, Herrera MD, Jimenez L, Marin R, Marhuenda E, Andriantsitohaina R. Improvement of age-related endothelial dysfunction by simvastatin: effect on NO and COX pathways. *Br J Pharmacol.* 2005;146:1130-1138.
208. Maki-Petaja KM, Booth AD, Hall FC, Wallace SM, Brown J, McEniery CM, Wilkinson IB. Ezetimibe and simvastatin reduce inflammation, disease activity, and aortic stiffness and improve endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:852-858.
209. Knothe C, Boldt J, Zickmann B, Ballesteros M, Dapper F, Hempelmann G. Endothelin plasma levels in old and young patients during open heart surgery: correlations to cardiopulmonary and endocrinology parameters. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;20:664-670.
210. McEniery CM, Qasem A, Schmitt M, Avolio AP, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Endothelin-1 regulates arterial pulse wave velocity in vivo. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:1975-1981.
211. Korzick DH, Muller-Delp JM, Dougherty P, Heaps CL, Bowles DK, Krick KK. Exaggerated coronary vasoreactivity to endothelin-1 in aged rats: role of protein kinase C. *Cardiovasc Res.* 2005;66:384-392.
212. Dupuis M, Soubrier F, Brocheriou I, Raoux S, Haloui M, Louedec L, Michel JB, Nadaud S. Profiling of aortic smooth muscle cell gene expression in response to chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Circulation.* 2004;110:867-873.
213. Essalihi R, Dao HH, Gilbert LA, Bouvet C, Semerjian Y, McKee MD, Moreau P. Regression of medial elastocalcinosis in rat aorta: a new vascular function for carbonic anhydrase. *Circulation.* 2005;112:1628-1635.
214. Boffa JJ, Lu Y, Placier S, Stefanski A, Dussaule JC, Chatziantoniou C. Regression of renal vascular and glomerular fibrosis: role of angiotensin II receptor antagonism and matrix metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:1132-1144.

215. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997;386:78-81.
216. Mori K, Shioi A, Jono S, Nishizawa Y, Morii H. Expression of matrix Gla protein (MGP) in an in vitro model of vascular calcification. *FEBS Lett*. 1998;433:19-22.
217. Boskey AL, Spevak L, Paschalis E, Doty SB, McKee MD. Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif Tissue Int*. 2002;71:145-154.
218. Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res*. 1999;84:166-178.
219. Essalihi R, Ouellette V, Hao Dao H, McKee MD, Moreau P. Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells During Medial Arterial Calcification: a Role for Endothelin? *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44:S147-S150.
220. Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, Weissberg PL. Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:379-388.
221. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res*. 2001;89:1147-1154.
222. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation*. 1999;100:2168-2176.
223. Simionescu A, Philips K, Vyavahare N. Elastin-derived peptides and TGF-beta1 induce osteogenic responses in smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;334:524-532.

224. Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest.* 1994;93:2106-2113.
225. Hajjar I, Kotchen TA. Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the United States, 1988-2000. *Jama.* 2003;290:199-206.
226. Franklin SS, Gustin Wt, Wong ND, Larson MG, Weber MA, Kannel WB, Levy D. Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study. *Circulation.* 1997;96:308-315.
227. O'Rourke MF, Hashimoto J. Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:1-13.
228. Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, Guize L, Ducimetiere P, Benetos A. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension.* 2001;37:1236-1241.
229. O'Rourke MF, Safar ME. Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertension.* 2005;46:200-204.
230. Byrom FB. The calibre of the cerebral arteries in experimental hypertension. *Proceedings of the Royal Society of Medicine.* 1968;61:605-606.
231. Laurent S, Katsahian S, Fassot C, Tropeano AI, Gautier I, Laloux B, Boutouyrie P. Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 2003;34:1203-1206.
232. Scuteri A, Tesauro M, Appolloni S, Preziosi F, Brancati AM, Volpe M. Arterial stiffness as an independent predictor of longitudinal changes in cognitive function in the older individual. *J Hypertens.* 2007;25:1035-1040.
233. Cirillo M, Stellato D, Laurenzi M, Panarelli W, Zanchetti A, De Santo NG. Pulse pressure and isolated systolic hypertension: association with microalbuminuria. The GUBBIO Study Collaborative Research Group. *Kidney Int.* 2000;58:1211-1218.

234. Verhave JC, Fesler P, du Cailar G, Ribstein J, Safar ME, Mimran A. Elevated pulse pressure is associated with low renal function in elderly patients with isolated systolic hypertension. *Hypertension*. 2005;45:586-591.
235. Curb JD, Pressel SL, Cutler JA, Savage PJ, Applegate WB, Black H, Camel G, Davis BR, Frost PH, Gonzalez N, Guthrie G, Oberman A, Rutan GH, Stamler J. Effect of diuretic-based antihypertensive treatment on cardiovascular disease risk in older diabetic patients with isolated systolic hypertension. Systolic Hypertension in the Elderly Program Cooperative Research Group. *Jama*. 1996;276:1886-1892.
236. Staessen JA, Fagard R, Thijs L, Celis H, Arabidze GG, Birkenhager WH, Bulpitt CJ, de Leeuw PW, Dollery CT, Fletcher AE, Forette F, Leonetti G, Nachev C, O'Brien ET, Rosenfeld J, Rodicio JL, Tuomilehto J, Zanchetti A. Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet*. 1997;350:757-764.
237. Honda T, Hamada M, Shigematsu Y, Matsumoto Y, Matsuoka H, Hiwada K. Effect of antihypertensive therapy on aortic distensibility in patients with essential hypertension: comparison with trichlormethiazide, nifedipine and alacepril. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1999;13:339-346.
238. Dao HH, Essalihi R, Graillon JF, Lariviere R, De Champlain J, Moreau P. Pharmacological prevention and regression of arterial remodeling in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens*. 2002;20:1597-1606.
239. Duchier J, Iannascoli F, Safar M. Antihypertensive effect of sustained-release isosorbide dinitrate for isolated systolic systemic hypertension in the elderly. *Am J Cardiol*. 1987;60:99-102.
240. Stokes GS, Ryan M, Brnabic A, Nyberg G. A controlled study of the effects of isosorbide mononitrate on arterial blood pressure and pulse wave form in systolic hypertension. *J Hypertens*. 1999;17:1767-1773.

241. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:817-824.
242. Ariyoshi T, Eishi K, Sakamoto I, Matsukuma S, Odate T. Effect of etidronic acid on arterial calcification in dialysis patients. *Clin Drug Investig.* 2006;26:215-222.
243. Izzo JL, Jr. Arterial stiffness and the systolic hypertension syndrome. *Current opinion in cardiology.* 2004;19:341-352.
244. Pannier BM, Avolio AP, Hoeks A, Mancia G, Takazawa K. Methods and devices for measuring arterial compliance in humans. *Am J Hypertens.* 2002;15:743-753.
245. Izzo JL, Jr., Shykoff BE. Arterial stiffness: clinical relevance, measurement, and treatment. *Rev Cardiovasc Med.* 2001;2:29-34, 37-40.
246. Kieffer P, Robert A, Capdeville-Atkinson C, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene I. Age-related arterial calcification in rats. *Life Sci.* 2000;66:2371-2381.
247. Proudfoot D, Shanahan CM. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein. *Nephrology (Carlton, Vic.)* 2006;11:455-461.
248. Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, Karsenty G, Giachelli CM. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *The Journal of experimental medicine.* 2002;196:1047-1055.
249. Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Atkinson J. Aortic calcification produced by vitamin D3 plus nicotine. *Journal of vascular research.* 1997;34:386-398.
250. Yu SY, Blumenthal HT. The Calcification of Elastic Fiber. 4. Epinephrine and Beta-Aminopropionitrile-Induced Calcification in Animal Aortas. *Journal of atherosclerosis research.* 1965;5:159-173.

251. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation*. 1998;98:1302-1306.
252. Shanahan CM, Proudfoot D, Farzaneh-Far A, Weissberg PL. The role of Gla proteins in vascular calcification. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. 1998;8:357-375.
253. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1400-1407.
254. Wallin R, Cain D, Sane DC. Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells--a cell system which resembles the system in bone cells. *Thromb Haemost*. 1999;82:1764-1767.
255. Brancaccio D, Biondi ML, Gallieni M, Turri O, Galassi A, Cecchini F, Russo D, Andreucci V, Cozzolino M. Matrix GLA protein gene polymorphisms: clinical correlates and cardiovascular mortality in chronic kidney disease patients. *American journal of nephrology*. 2005;25:548-552.
256. Herrmann SM, Whatling C, Brand E, Nicaud V, Gariépy J, Simon A, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L, Henney A, Cambien F. Polymorphisms of the human matrix gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2386-2393.
257. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res*. 2000;87:E10-17.
258. Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H. Beta-glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:2003-2009.
259. Lehmann ED, Gosling RG, Sonksen PH. Arterial wall compliance in diabetes. *Diabet Med*. 1992;9:114-119.

260. Salomaa V, Riley W, Kark JD, Nardo C, Folsom AR. Non-insulin-dependent diabetes mellitus and fasting glucose and insulin concentrations are associated with arterial stiffness indexes. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation*. 1995;91:1432-1443.
261. Brooks BA, Molyneaux LM, Yue DK. Augmentation of central arterial pressure in Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2001;18:374-380.
262. Ahlgren AR, Sundkvist G, Wollmer P, Sonesson B, Lanne T. Increased aortic stiffness in women with type 1 diabetes mellitus is associated with diabetes duration and autonomic nerve function. *Diabet Med*. 1999;16:291-297.
263. Wahlqvist ML, Lo CS, Myers KA, Simpson RW, Simpson JM. Putative determinants of arterial wall compliance in NIDDM. *Diabetes care*. 1988;11:787-790.
264. Cameron JD, Bulpitt CJ, Pinto ES, Rajkumar C. The aging of elastic and muscular arteries: a comparison of diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes care*. 2003;26:2133-2138.
265. Edmonds ME. Medial arterial calcification and diabetes mellitus. *Z Kardiol*. 2000;89 Suppl 2:101-104.
266. Edmonds ME, Morrison N, Laws JW, Watkins PJ. Medial arterial calcification and diabetic neuropathy. *British medical journal (Clinical research ed)*. 1982;284:928-930.
267. Everhart JE, Pettitt DJ, Knowler WC, Rose FA, Bennett PH. Medial arterial calcification and its association with mortality and complications of diabetes. *Diabetologia*. 1988;31:16-23.
268. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:978-983.
269. Niskanen L, Siitonen O, Suhonen M, Uusitupa MI. Medial artery calcification predicts cardiovascular mortality in patients with NIDDM. *Diabetes care*. 1994;17:1252-1256.

270. Sipila K, Koivistoinen T, Moilanen L, Nieminen T, Reunanen A, Jula A, Salomaa V, Kaaja R, Koobi T, Kukkonen-Harjula K, Majahalme S, Kahonen M. Metabolic syndrome and arterial stiffness: the Health 2000 Survey. *Metabolism: clinical and experimental*. 2007;56:320-326.
271. Studer RK, Craven PA, DeRubertis FR. Role for protein kinase C in the mediation of increased fibronectin accumulation by mesangial cells grown in high-glucose medium. *Diabetes*. 1993;42:118-126.
272. Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL. Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest*. 1997;100:115-126.
273. Rasmussen LM, Heickendorff L. Accumulation of fibronectin in aortas from diabetic patients. A quantitative immunohistochemical and biochemical study. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1989;61:440-446.
274. Feener EP, Xia P, Inoguchi T, Shiba T, Kunisaki M, King GL. Role of protein kinase C in glucose- and angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor expression. *Contributions to nephrology*. 1996;118:180-187.
275. Buse MG. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290:E1-E8.
276. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:12222-12226.
277. Singh LP, Green K, Alexander M, Bassly S, Crook ED. Hexosamines and TGF-beta1 use similar signaling pathways to mediate matrix protein synthesis in mesangial cells. *American journal of physiology*. 2004;286:F409-416.
278. Gaidarova S, Jimenez SA. Inhibition of basal and transforming growth factor-beta-induced stimulation of COL1A1 transcription by the DNA intercalators,

- mitoxantrone and WP631, in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem.* 2002;277:38737-38745.
279. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent progress in hormone research.* 2001;56:1-21.
280. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia.* 2001;44:129-146.
281. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 2006;114:597-605.
282. Sims TJ, Rasmussen LM, Oxlund H, Bailey AJ. The role of glycation cross-links in diabetic vascular stiffening. *Diabetologia.* 1996;39:946-951.
283. Tanaka S, Avigad G, Brodsky B, Eikenberry EF. Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *Journal of molecular biology.* 1988;203:495-505.
284. Charonis AS, Reger LA, Dege JE, Kouzi-Koliakos K, Furcht LT, Wohlhueter RM, Tsilibary EC. Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. *Diabetes.* 1990;39:807-814.
285. Haitoglou CS, Tsilibary EC, Brownlee M, Charonis AS. Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glucosylated laminin/type IV collagen. *J Biol Chem.* 1992;267:12404-12407.
286. Mott JD, Khalifah RG, Nagase H, Shield CF, 3rd, Hudson JK, Hudson BG. Nonenzymatic glycation of type IV collagen and matrix metalloproteinase susceptibility. *Kidney Int.* 1997;52:1302-1312.
287. Sun M, Yokoyama M, Ishiwata T, Asano G. Deposition of advanced glycation end products (AGE) and expression of the receptor for AGE in cardiovascular tissue of the diabetic rat. *International journal of experimental pathology.* 1998;79:207-222.
288. Stern DM, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing Res Rev.* 2002;1:1-15.

289. Li JH, Huang XR, Zhu HJ, Oldfield M, Cooper M, Truong LD, Johnson RJ, Lan HY. Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease. *Faseb J.* 2004;18:176-178.
290. Throckmorton DC, Brogden AP, Min B, Rasmussen H, Kashgarian M. PDGF and TGF-beta mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products. *Kidney Int.* 1995;48:111-117.
291. Striker LJ, Striker GE. Administration of AGEs in vivo induces extracellular matrix gene expression. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11 Suppl 5:62-65.
292. Watson KE, Parhami F, Shin V, Demer LL. Fibronectin and collagen I matrixes promote calcification of vascular cells in vitro, whereas collagen IV matrix is inhibitory. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1964-1971.
293. Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Bottger BA. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 1990;10:966-990.
294. Winlove CP, Parker KH, Avery NC, Bailey AJ. Interactions of elastin and aorta with sugars in vitro and their effects on biochemical and physical properties. *Diabetologia.* 1996;39:1131-1139.
295. Tomizawa H, Yamazaki M, Kunika K, Itakura M, Yamashita K. Association of elastin glycation and calcium deposit in diabetic rat aorta. *Diabetes research and clinical practice.* 1993;19:1-8.
296. Wang CC, Sorribas V, Sharma G, Levi M, Draznin B. Insulin attenuates vascular smooth muscle calcification but increases vascular smooth muscle cell phosphate transport. *Atherosclerosis.* 2007.
297. Olesen P, Nguyen K, Wogensen L, Ledet T, Rasmussen LM. 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:H1058-1064.

298. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:146-154.
299. Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, Creager MA. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation.* 1998;97:1695-1701.
300. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000;404:787-790.
301. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1996;97:22-28.
302. Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol.* 1992;263:H321-326.
303. Giugliano D, Marfella R, Coppola L, Verrazzo G, Acampora R, Giunta R, Nappo F, Lucarelli C, D'Onofrio F. Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation.* 1997;95:1783-1790.
304. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414:813-820.
305. Gonzalez RG, Barnett P, Aguayo J, Cheng HM, Chylack LT, Jr. Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. *Diabetes.* 1984;33:196-199.
306. Cameron NE, Cotter MA. Impaired contraction and relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: role of polyol pathway. *Diabetologia.* 1992;35:1011-1019.

307. Oyama T, Miyasita Y, Watanabe H, Shirai K. The role of polyol pathway in high glucose-induced endothelial cell damages. *Diabetes research and clinical practice*. 2006;73:227-234.
308. Kashiwagi A, Asahina T, Ikebuchi M, Tanaka Y, Takagi Y, Nishio Y, Kikkawa R, Shigeta Y. Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. *Diabetologia*. 1994;37:264-269.
309. Tan KC, Chow WS, Ai VH, Metz C, Bucala R, Lam KS. Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2002;25:1055-1059.
310. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest*. 1991;87:432-438.
311. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280:E685-694.
312. Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, Stier G, Sattler M, Schleicher E, Speiser W, Nawroth PP. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes*. 2000;49:1561-1570.
313. Ishii H, Koya D, King GL. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 1998;76:21-31.
314. Nitti M, d'Abramo C, Traverso N, Verzola D, Garibotto G, Poggi A, Odetti P, Cottalasso D, Marinari UM, Pronzato MA, Domenicotti C. Central role of PKCdelta in glycooxidation-dependent apoptosis of human neurons. *Free radical biology & medicine*. 2005;38:846-856.

315. Keogh RJ, Dunlop ME, Larkins RG. Effect of inhibition of aldose reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinase C, and phospholipase A2 activation. *Metabolism: clinical and experimental*. 1997;46:41-47.
316. Ramana KV, Friedrich B, Tammali R, West MB, Bhatnagar A, Srivastava SK. Requirement of aldose reductase for the hyperglycemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*. 2005;54:818-829.
317. Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. *J Clin Invest*. 1991;87:1643-1648.
318. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*. 2001;88:E14-22.
319. Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L, Taboga C. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia*. 2001;44:834-838.
320. Zou MH, Shi C, Cohen RA. High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H(2) receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. *Diabetes*. 2002;51:198-203.
321. Ohshiro Y, Ma RC, Yasuda Y, Hiraoka-Yamamoto J, Clermont AC, Isshiki K, Yagi K, Arikawa E, Kern TS, King GL. Reduction of diabetes-induced oxidative stress, fibrotic cytokine expression, and renal dysfunction in protein kinase Cbeta-null mice. *Diabetes*. 2006;55:3112-3120.
322. Yokota T, Ma RC, Park JY, Isshiki K, Sotiropoulos KB, Rauniyar RK, Bornfeldt KE, King GL. Role of protein kinase C on the expression of platelet-derived growth

- factor and endothelin-1 in the retina of diabetic rats and cultured retinal capillary pericytes. *Diabetes*. 2003;52:838-845.
323. Ceriello A, Kumar S, Piconi L, Esposito K, Giugliano D. Simultaneous control of hyperglycemia and oxidative stress normalizes endothelial function in type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2007;30:649-654.
324. Tomiyama H, Kimura Y, Okazaki R, Kushiro T, Abe M, Kuwabara Y, Yoshida H, Kuwata S, Kinouchi T, Doba N. Close relationship of abnormal glucose tolerance with endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertension*. 2000;36:245-249.
325. Enderle MD, Benda N, Schmuelling RM, Haering HU, Pfohl M. Preserved endothelial function in IDDM patients, but not in NIDDM patients, compared with healthy subjects. *Diabetes care*. 1998;21:271-277.
326. Watts GF, O'Brien SF, Silvester W, Millar JA. Impaired endothelium-dependent and independent dilatation of forearm resistance arteries in men with diet-treated non-insulin-dependent diabetes: role of dyslipidaemia. *Clin Sci (Lond)*. 1996;91:567-573.
327. Steinberg HO, Paradisi G, Hook G, Crowder K, Cronin J, Baron AD. Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production. *Diabetes*. 2000;49:1231-1238.
328. Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berliner JA, Demer LL. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:680-687.
329. Takemoto M, Yokote K, Yamazaki M, Ridall AL, Butler WT, Matsumoto T, Tamura K, Saito Y, Mori S. Enhanced expression of osteopontin by high glucose in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;258:722-726.

330. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free radical biology & medicine*. 2001;31:509-519.
331. Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Tanaka N, Yamamoto H. Advanced glycation endproducts accelerate calcification in microvascular pericytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;258:353-357.
332. Skyrme-Jones RA, O'Brien RC, Berry KL, Meredith IT. Vitamin E supplementation improves endothelial function in type I diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled study. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:94-102.
333. Mullan BA, Young IS, Fee H, McCance DR. Ascorbic acid reduces blood pressure and arterial stiffness in type 2 diabetes. *Hypertension*. 2002;40:804-809.
334. Wilkinson IB, Megson IL, MacCallum H, Sogo N, Cockcroft JR, Webb DJ. Oral vitamin C reduces arterial stiffness and platelet aggregation in humans. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;34:690-693.
335. Zureik M, Galan P, Bertrais S, Mennen L, Czernichow S, Blacher J, Ducimetiere P, Hercberg S. Effects of long-term daily low-dose supplementation with antioxidant vitamins and minerals on structure and function of large arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1485-1491.
336. Peyroux J, Sternberg M. Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol Biol (Paris)*. 2006;54:405-419.
337. Cantini C, Kieffer P, Corman B, Liminana P, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene I. Aminoguanidine and aortic wall mechanics, structure, and composition in aged rats. *Hypertension*. 2001;38:943-948.
338. Corman B, Duriez M, Poitevin P, Heudes D, Bruneval P, Tedgui A, Levy BI. Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:1301-1306.
339. Bolton WK, Cattran DC, Williams ME, Adler SG, Appel GB, Cartwright K, Foiles PG, Freedman BI, Raskin P, Ratner RE, Spinowitz BS, Whittier FC, Wuerth JP.

- Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *American journal of nephrology*. 2004;24:32-40.
340. Freedman BI, Wuerth JP, Cartwright K, Bain RP, Dippe S, Hershon K, Mooradian AD, Spinowitz BS. Design and baseline characteristics for the aminoguanidine Clinical Trial in Overt Type 2 Diabetic Nephropathy (ACTION II). *Controlled clinical trials*. 1999;20:493-510.
341. Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, Thorpe SR, Baynes JW. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int*. 2002;61:939-950.
342. Voziyan PA, Khalifah RG, Thibaudeau C, Yildiz A, Jacob J, Serianni AS, Hudson BG. Modification of proteins in vitro by physiological levels of glucose: pyridoxamine inhibits conversion of Amadori intermediate to advanced glycation end-products through binding of redox metal ions. *J Biol Chem*. 2003;278:46616-46624.
343. Alderson NL, Chachich ME, Youssef NN, Beattie RJ, Nachtigal M, Thorpe SR, Baynes JW. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney Int*. 2003;63:2123-2133.
344. Vasan S, Zhang X, Zhang X, Kapurniotu A, Bernhagen J, Teichberg S, Basgen J, Wagle D, Shih D, Terlecky I, Bucala R, Cerami A, Egan J, Ulrich P. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature*. 1996;382:275-278.
345. Wolffenbuttel BH, Boulanger CM, Crijns FR, Huijberts MS, Poitevin P, Swennen GN, Vasan S, Egan JJ, Ulrich P, Cerami A, Levy BI. Breakers of advanced glycation end products restore large artery properties in experimental diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:4630-4634.
346. Kass DA, Shapiro EP, Kawaguchi M, Capriotti AR, Scuteri A, deGroof RC, Lakatta EG. Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation*. 2001;104:1464-1470.

347. Ziemann SJ, Melenovsky V, Clattenburg L, Corretti MC, Capriotti A, Gerstenblith G, Kass DA. Advanced glycation endproduct crosslink breaker (alagebrium) improves endothelial function in patients with isolated systolic hypertension. *J Hypertens*. 2007;25:577-583.
348. Kislinger T, Tanji N, Wendt T, Qu W, Lu Y, Ferran LJ, Jr., Taguchi A, Olson K, Bucciarelli L, Goova M, Hofmann MA, Cataldegirmen G, D'Agati V, Pischetsrieder M, Stern DM, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation end products mediates inflammation and enhanced expression of tissue factor in vasculature of diabetic apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:905-910.
349. Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Jr., Chow WS, Stern D, Schmidt AM. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nature medicine*. 1998;4:1025-1031.
350. Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, Goova MT, Moser B, Kislinger T, Lee DC, Kashyap Y, Stern DM, Schmidt AM. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation*. 2002;106:2827-2835.
351. Lenzen S, Munday R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochemical pharmacology*. 1991;42:1385-1391.
352. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2001;50:537-546.
353. Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. *The Journal of endocrinology*. 1990;127:161-165.
354. Park BH, Rho HW, Park JW, Cho CG, Kim JS, Chung HT, Kim HR. Protective mechanism of glucose against alloxan-induced pancreatic beta-cell damage. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;210:1-6.

355. Kliber A, Szkudelski T, Chichlowska J. Alloxan stimulation and subsequent inhibition of insulin release from in situ perfused rat pancreas. *J Physiol Pharmacol.* 1996;47:321-328.
356. Szkudelski T, Kandulska K, Okulicz M. Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca.* 1998;47:343-346.
357. Portha B, Picon L, Rosselin G. Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia.* 1979;17:371-377.
358. Giroix MH, Portha B, Kergoat M, Bailbe D, Picon L. Glucose insensitivity and amino-acid hypersensitivity of insulin release in rats with non-insulin-dependent diabetes. A study with the perfused pancreas. *Diabetes.* 1983;32:445-451.
359. Zhang F, Ye C, Li G, Ding W, Zhou W, Zhu H, Chen G, Luo T, Guang M, Liu Y, Zhang D, Zheng S, Yang J, Gu Y, Xie X, Luo M. The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science.* 2003;52:401-407.
360. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.* 2005;52:313-320.
361. Sugano M, Yamato H, Hayashi T, Ochiai H, Kakuchi J, Goto S, Nishijima F, Iino N, Kazama JJ, Takeuchi T, Mokuda O, Ishikawa T, Okazaki R. High-fat diet in low-dose-streptozotocin-treated heminephrectomized rats induces all features of human type 2 diabetic nephropathy: a new rat model of diabetic nephropathy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006;16:477-484.
362. Katsumata K, Katsumata K, Jr., Katsumata Y. Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan- or streptozotocin-induced diabetes in rats. *Hormone and metabolic research. Hormon- und Stoffwechselforschung.* 1992;24:508-510.
363. Kannel WB. Prevalence and implications of uncontrolled systolic hypertension. *Drugs & aging.* 2003;20:277-286.

364. Hu G, Sarti C, Jousilahti P, Peltonen M, Qiao Q, Antikainen R, Tuomilehto J. The impact of history of hypertension and type 2 diabetes at baseline on the incidence of stroke and stroke mortality. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2005;36:2538-2543.
365. Rizzoni D, Porteri E, Boari GE, De Ciuceis C, Sleiman I, Muiesan ML, Castellano M, Miclini M, Agabiti-Rosei E. Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation*. 2003;108:2230-2235.
366. Debbabi H, Uzan L, Mourad JJ, Safar M, Levy BI, Tibirica E. Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2006;19:477-483.
367. Franklin SS, Khan SA, Wong ND, Larson MG, Levy D. Is pulse pressure useful in predicting risk for coronary heart Disease? The Framingham heart study. *Circulation*. 1999;100:354-360.
368. Borghi C, Dormi A, L'Italien G, Lapuerta P, Franklin SS, Collatina S, Gaddi A. The relationship between systolic blood pressure and cardiovascular risk--results of the Brisighella Heart Study. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn)*. 2003;5:47-52.
369. Blacher J, Staessen JA, Girerd X, Gasowski J, Thijs L, Liu L, Wang JG, Fagard RH, Safar ME. Pulse pressure not mean pressure determines cardiovascular risk in older hypertensive patients. *Arch Intern Med*. 2000;160:1085-1089.
370. Blacher J, Asmar R, Djane S, London GM, Safar ME. Aortic pulse wave velocity as a marker of cardiovascular risk in hypertensive patients. *Hypertension*. 1999;33:1111-1117.
371. Plante GE. Les objectifs du traitement de l'hypertension artérielle. In: *artérielle Sqdh*, ed. Hypertension Guide thérapeutique. troisième ed. Montréal; 2007.
372. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The

- Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Jama*. 2002;288:2981-2997.
373. Lloyd-Jones DM, Evans JC, Larson MG, O'Donnell CJ, Roccella EJ, Levy D. Differential control of systolic and diastolic blood pressure : factors associated with lack of blood pressure control in the community. *Hypertension*. 2000;36:594-599.
374. Hansson L, Zanchetti A, Carruthers SG, Dahlof B, Elmfeldt D, Julius S, Menard J, Rahn KH, Wedel H, Westerling S. Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT Study Group. *Lancet*. 1998;351:1755-1762.
375. Benetos A, Thomas F, Bean K, Gautier S, Smulyan H, Guize L. Prognostic value of systolic and diastolic blood pressure in treated hypertensive men. *Arch Intern Med*. 2002;162:577-581.
376. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*. 2001;38:581-587.
377. DeGroot J, Verzijl N, Wenting-van Wijk MJ, Jacobs KM, Van El B, Van Roermund PM, Bank RA, Bijlsma JW, TeKoppele JM, Lafeber FP. Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50:1207-1215.
378. Nah SS, Choi IY, Yoo B, Kim YG, Moon HB, Lee CK. Advanced glycation end products increases matrix metalloproteinase-1, -3, and -13, and TNF-alpha in human osteoarthritic chondrocytes. *FEBS Lett*. 2007;581:1928-1932.
379. Yammani RR, Carlson CS, Bresnick AR, Loeser RF. Increase in production of matrix metalloproteinase 13 by human articular chondrocytes due to stimulation with S100A4: Role of the receptor for advanced glycation end products. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54:2901-2911.
380. Derosa G, D'Angelo A, Tinelli C, Devangelio E, Consoli A, Miccoli R, Penno G, Del Prato S, Paniga S, Cicero AF. Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels

- and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. *Diabetes & metabolism*. 2007;33:129-134.
381. Rumble JR, Cooper ME, Soulis T, Cox A, Wu L, Youssef S, Jasik M, Jerums G, Gilbert RE. Vascular hypertrophy in experimental diabetes. Role of advanced glycation end products. *J Clin Invest*. 1997;99:1016-1027.
  382. Jing L, Zhang JZ, Zhao L, Wang YL, Guo FY. High-expression of transforming growth factor beta1 and phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase in vascular smooth muscle cells from aorta and renal arterioles of spontaneous hypertension rats. *Clin Exp Hypertens*. 2007;29:107-117.
  383. O'Callaghan CJ, Williams B. Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta(1). *Hypertension*. 2000;36:319-324.
  384. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation*. 2002;106:130-135.
  385. Ohno M, Cooke JP, Dzau VJ, Gibbons GH. Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production. Modulation by potassium channel blockade. *J Clin Invest*. 1995;95:1363-1369.
  386. Xu C, Lee S, Shu C, Masuda H, Zarins CK. Expression of TGF-beta1 and beta3 but not apoptosis factors relates to flow-induced aortic enlargement. *BMC cardiovascular disorders*. 2002;2:11.
  387. Dumont O, Loufrani L, Henrion D. Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:317-324.
  388. Weigert C, Brodbeck K, Klopfer K, Haring HU, Schleicher ED. Angiotensin II induces human TGF-beta 1 promoter activation: similarity to hyperglycaemia. *Diabetologia*. 2002;45:890-898.

389. Kato H, Suzuki H, Tajima S, Ogata Y, Tominaga T, Sato A, Saruta T. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. 1991;9:17-22.
390. Benetos A, Levy BI, Lacolley P, Taillard F, Duriez M, Safar ME. Role of angiotensin II and bradykinin on aortic collagen following converting enzyme inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:3196-3201.
391. Thybo NK, Stephens N, Cooper A, Aalkjaer C, Heagerty AM, Mulvany MJ. Effect of antihypertensive treatment on small arteries of patients with previously untreated essential hypertension. *Hypertension*. 1995;25:474-481.
392. Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation*. 2000;101:1653-1659.
393. Park JB, Intengan HD, Schiffrin EL. Reduction of resistance artery stiffness by treatment with the AT(1)-receptor antagonist losartan in essential hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2000;1:40-45.
394. Laurent S, Arcaro G, Benetos A, Lafleche A, Hoeks A, Safar M. Mechanism of nitrate-induced improvement on arterial compliance depends on vascular territory. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;19:641-649.
395. Mitchell GF, Izzo JL, Jr., Lacourciere Y, Ouellet JP, Neutel J, Qian C, Kerwin LJ, Block AJ, Pfeffer MA. Omapatrilat reduces pulse pressure and proximal aortic stiffness in patients with systolic hypertension: results of the conduit hemodynamics of omapatrilat international research study. *Circulation*. 2002;105:2955-2961.
396. Kostis JB, Packer M, Black HR, Schmieder R, Henry D, Levy E. Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial. *Am J Hypertens*. 2004;17:103-111.

## Liste des publications

Fromy B, Abraham P, **Bouvet C**, Bouhanick B, Fressinaud P, Saumet JL. *Early decrease of skin blood flow in response to locally applied pressure in diabetic subjects*. Diabetes. 2002 Apr;51(4):1214-7.

**Bouvet C**, Gilbert L-A, Girardot D, deBlois D, Moreau P. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NOS inhibition. Hypertension. 2005 Mar; 45(3):432-7.

Dao HH, Essalihi R, **Bouvet C**, Moreau P. Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis : impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. Cardiovascular Research. 2005 May 1 ; 66 (2) : 307-317. Review.

Essalihi R, Dao HH, Gilbert LA, **Bouvet C**, Semerjian Y, McKee MD, Moreau P. *Regression of media elastocalcinosis in rat aorta : a new vascular function for carbonic anhydrase*. Circulation. 2005 Sep 13 ; 112 (11) : 1628-1635.

Dao HH, **Bouvet C**, Moreau S, Beaucage P, Larivière R, Servant M, de Champlain J et Moreau P. *Endothelin-1 produces hyperplasia in small mesenteric arteries in vivo : role of Akt, p27<sup>kip1</sup> and CDK2*. Cardiovascular Research. 2006 Jul 1 ; 71 (1) : 61-8.

**Bouvet C**, Peters W, Moreau S, deBlois D, Moreau P. *A new rat model of diabetic macrovascular complication*. Cardiovascular Research. 2007 Feb 1 ; 73(3) : 504-11.

**Bouvet C**, de Chantemele EB, Guihot AL, Vessieres E, Bocquet A, Dumont O, Jardel A, Loufrani L, Moreau P, Henrion D. *Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese zucker rats is associated with endothelial dysfunction*. Hypertension. 2007 May 21.

Essalihi R, Zandvliet ML, Moreau S, Gilbert LA, **Bouvet C**, Lenoel C, Nekka K, McKee MD, Moreau P. *Distinct effects of amlodipine treatment on vascular*

II

*elastocalcinosis and stiffness in a rat model of isolated systolic hypertension.* Journal of Hypertension. 2007 Sep ; 25(9) : 1879-86.

**Bouvet C**, Moreau S, Blanchette J, deBlois D, Moreau P. *Sequential activation of MMP-9 and TGF- $\beta$  in arterial elastocalcinosis.* En révision pour Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.

**Travail réalisé dans le laboratoire de Daniel Henrion  
INSR U771, CNRS UMR 6214.**

# Flow-Induced Remodeling in Resistance Arteries From Obese Zucker Rats Is Associated With Endothelial Dysfunction

Céline Bouvet, Eric Belin de Chantemèle, Anne-Laure Guihot, Emilie Vessières, Arnaud Bocquet, Odile Dumont, Alain Jardel, Laurent Loufrani, Pierre Moreau, Daniel Henrion

**Abstract**—Chronic increases in blood flow increase arterial diameter and NO-dependent dilation in resistance arteries. Because endothelial dysfunction accompanies metabolic syndrome, we hypothesized that flow-mediated remodeling might be impaired in obese rat resistance arteries. Obese and lean Zucker rat mesenteric resistance arteries were exposed to chronic flow increases through arterial ligation in vivo: arteries exposed to high flow were compared with normal flow arteries. Diameter was measured in vitro in cannulated arteries using pressure arteriography. After 7 days, outward remodeling (diameter increased from  $346 \pm 9$  to  $412 \pm 11$   $\mu\text{m}$  at 100 mm Hg) occurred in lean high-flow arteries. Endothelium-dependent tone was reduced in high-flow arteries from obese rats by contrast with lean animals. On the other hand, diameter enlargement occurred similarly in the 2 strains. The involvement of NO in endothelium-dependent dilation (evidenced by NO blockade) and endothelial NO synthase phosphorylation was smaller in obese than in lean rats. Superoxide anion and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase subunit expression (p67phox and gp91phox) increased in obese rats and were higher in high-flow than in control arteries. Acute Tempol (a catalase mimetic), catalase plus superoxide dismutase, and L-arginine plus tetrahydrobiopterin restored endothelium-dependent dilation in obese rat normal and high-flow arteries to the level found in lean control arteries. Thus, flow-induced remodeling in obese resistance arteries was associated with a reduced endothelium-mediated dilation because of a decreased NO bioavailability and an excessive superoxide production. This dysfunction might have negative consequences in ischemic diseases in patients with obesity or metabolic syndrome. (*Hypertension*. 2007;50:248-254.)

**Key Words:** resistance arteries ■ shear stress ■ NO ■ reactive oxygen species ■ mechanotransduction ■ obesity ■ metabolic syndrome

The metabolic syndrome is a common health problem. Its incidence and prevalence are increasing in parallel with the enhanced prevalence and incidence of obesity and type 2 diabetes.<sup>1,2</sup> This syndrome is not only a metabolic disorder; it is also associated with endothelial dysfunction<sup>3</sup> and vascular remodeling leading to a reduction in arterial diameter.<sup>4</sup> Patients with metabolic syndrome demonstrate an increasing risk of overall mortality, as well as cardiovascular morbidity and mortality.<sup>5</sup>

Basically, an increase in blood pressure or a decrease in blood flow induces a transient adjustment in vessel diameter mediated by changes in myogenic tone and by the release of vasoactive substances. On the other hand, increasing blood flow induces a vasodilation mediated by endothelium-derived NO. A long-term exposition to altered mechanical forces induces vascular remodeling to restore tensile and shear stresses.<sup>6,7</sup> Long-term increase in shear stress enhances NO

production by endothelial cells, and we have shown previously that NO has a key role in vascular remodeling of large<sup>8</sup> and resistance arteries in response to an increased blood flow.<sup>9</sup>

Vascular disorders associated with the metabolic syndrome involve alterations in local blood flow supply.<sup>5</sup> Restoring blood flow can be achieved using vasodilator treatments<sup>10</sup> or exercise training, which has been shown to induce outward remodeling in resistance arteries, thus improving blood flow.<sup>11</sup> Studies in Zucker obese rats, a model of metabolic syndrome, have demonstrated an endothelial dysfunction in several vascular beds<sup>12</sup> associated with a reduced NO concentration<sup>13</sup> and an increased vascular oxidative stress.<sup>12</sup> We used this model to test the hypothesis that the adaptation, or remodeling, of resistance arteries in response to a chronic rise in blood flow would be reduced in obesity. This adaptation involves an increase in diameter and an enhanced endothelium

Received February 9, 2007; first decision February 27, 2007; revision accepted April 26, 2007.

From the Institut National de la Santé et de la Recherche U771 (C.B., E.B.d.C., A.-L.G., E.V., A.B., O.D., A.J., L.L., D.H.), Centre National de la Recherche Scientifique UMR 6214, Université d'Angers, Angers, France; and the Faculté de Pharmacie (C.B., P.M.), Université de Montréal, Montréal Quebec, Canada.

C.B. and E.B.d.C. contributed equally to this article.

Correspondence to Daniel Henrion, Department of Integrated Neurovascular Biology, UMR Centre National de la Recherche Scientifique 6214, Institut National de la Santé et de la Recherche 771, Faculté de Médecine, 49045 Angers, France.

© 2007 American Heart Association, Inc.

*Hypertension* is available at <http://www.hypertensionaha.org>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.088716

(NO)-dependent dilation as shown in our previous studies.<sup>9,14</sup> Thus the questions were whether resistance arteries in obese rat are able to increase their diameter and whether they are able to increase NO-dependent dilation in response to a chronic increase in blood flow. To show this, we used a model described previously in rats<sup>6,9,15</sup> and mice.<sup>14,16</sup> It is based on ligation of mesenteric arteries, allowing increasing blood flow in one mesenteric artery in vivo. In this model, blood flow increases by 60% in this "high-flow" (HF) artery, which is compared with control ("normal flow" [NF]) arteries located at distance.<sup>14,16</sup>

## Methods

### Animals

Twelve adult male obese Zucker rats and their littermate controls (lean Zucker rats), at 10 weeks old, were purchased from Charles River (L'Arbresles, France). Rats were anesthetized (sodium pentobarbital, 50 mg/kg, IP) and submitted to surgery to modify blood flow as described previously.<sup>9</sup> Briefly, 3 consecutive first-order arteries were used. Ligatures were applied to second-order branches (Figure 1A). The artery located between the 2 ligated arteries was designed as an HF artery. Arteries located at distance of the ligated arteries were used as control (NF).

Seven days after surgery, rats were anesthetized (sodium pentobarbital, 50 mg/kg, IP) for blood pressure measurement. They were then euthanized by CO<sub>2</sub> inhalation, the gut excised, and mesenteric arteries dissected. From each rat, HF and NF arteries were isolated and divided in several segments used, respectively (from the proximal to the distal part of the artery), for diameter measurement and pharmacological, biochemical, and immunohistological analyses.

The university ethical committee approved the present protocol. The procedure followed in the care and euthanasia of the study animals was in accordance with the European Community Standards on the Care and Use of Laboratory Animals (Ministère de l'Agriculture, France, authorization No. 6422).

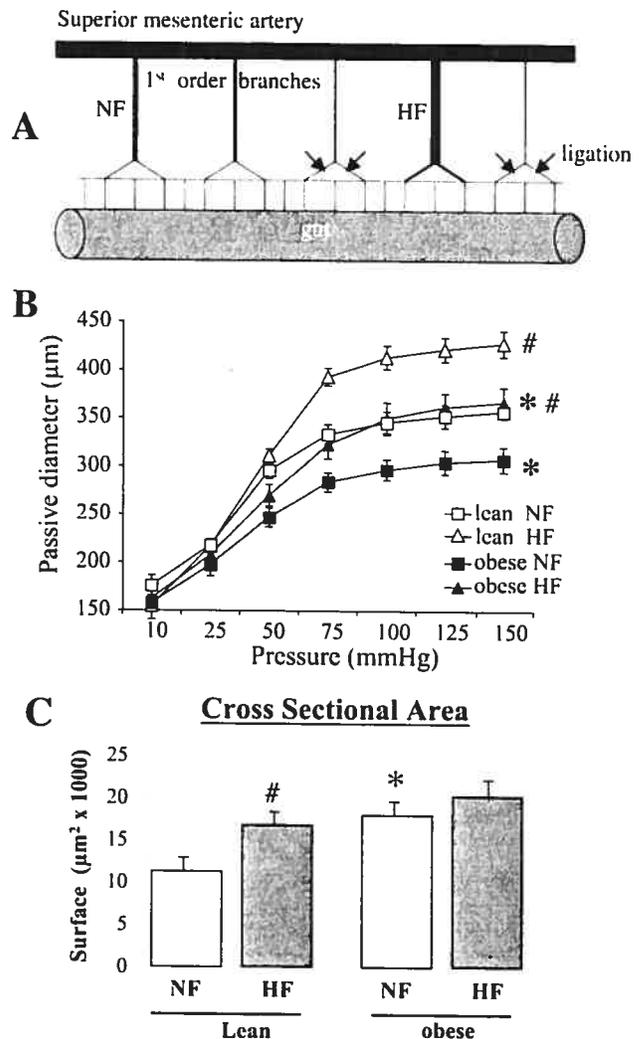
### Pressure-Diameter Relationship and Flow-Mediated Dilatation in NF and HF Arteries

A first segment of NF and HF arteries, 4-mm long and  $\approx 300 \mu\text{m}$  ID, was cannulated at both ends and mounted in a video monitored perfusion system<sup>17</sup> as described previously.<sup>16</sup> Briefly, flow-mediated dilatation (FMD; steps of 3 to 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) was determined under a pressure of 75 mm Hg on precontracted arteries (phenylephrine; 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ). After 30 minutes, FMD was repeated in the presence of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ; 20 minutes). Finally, after washout, passive arterial diameter was evaluated in the absence of smooth muscle tone, that is, in the presence of EGTA (2 mmol/L) and sodium nitroprusside (SNP; 0.1 mmol/L) and in the absence of extracellular calcium.<sup>16</sup>

To determine their cross-sectional area (CSA), arteries were fixed with formaldehyde under a pressure of 75 mm Hg. CSA was determined as described previously.<sup>16</sup>

### Pharmacological Profile of Isolated NF and HF Arteries

Two other arterial segments (2-mm long each) were dissected and mounted in a wire myograph (DMT).<sup>16</sup> Cumulative concentration-response curves to phenylephrine (0.01 to 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) and SNP (0.001 to 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) were performed. In other arterial segments, 2 concentration-response curve to acetylcholine (ACh; 0.001 to 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) were obtained before and after incubation with one of the following agents: L-NAME (100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), the catalase mimetic Tempol (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), superoxide dismutase (120 U/mL) plus catalase (80 U/mL), or tetrahydrobiopterin (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) plus L-arginine (100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ). SNP- and ACh-dependent dilation was performed in arteries precontracted with phenylephrine to 50% of their maximal contractile response.



**Figure 1.** Structural changes in HF and NF mesenteric resistance arteries isolated from lean and obese rats. A, Schematic representation of the model used to locally change blood flow in mesenteric arteries after alternative arterial ligation. B, Changes in passive diameter in response to stepwise increases in pressure. C, CSA of mesenteric arteries at 75 mm Hg. Mean  $\pm$  SEM is presented ( $n=12$  per group). \* $P<0.05$ , obese vs lean. # $P<0.05$ , HF vs NF in each group.

### Western Blot Analysis

As described previously,<sup>9</sup> arteries were homogenized, and proteins (25  $\mu\text{g}$  of total protein from each sample) were separated by SDS-PAGE using a 4% stacking gel followed by a 10% running gel. Proteins were detected with specific antibodies (Transduction Laboratories) against endothelial NO synthase (eNOS) 1:1000, phospho-eNOS 1:500, and subunits of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase (gp91<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup>) actin 1:1000 (dilutions in Tris-buffered saline Tween 20). Protein expression was visualized using the ECL-Plus chemiluminescence kit (Amersham) and normalized by actin expression.

### Detection of Superoxide Anions

Another arterial segment was embedded vertically in Tissue-tek (Sakura) and frozen in isopentane. Superoxide detection was performed on transverse cross-sections 7- $\mu\text{m}$  thick incubated with dihydroethyline (DHE), as described previously.<sup>18</sup> Positive staining was visualized using confocal microscopy and QED-Image software (Solamere Technology). Image analysis was performed using Histo-lab (Microvision). Pixel quantification was executed as described

previously.<sup>9</sup> A positive control experiment was performed using sections of mesenteric artery treated for 2 hours with lipopolysaccharide *in vitro* at 37°C in a physiological salt solution. A negative control was obtained by omitting DHE or by adding Tempol to the section 15 minutes before DHE.

### Statistical Analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Significance of the difference between arteries was determined by ANOVA (1-factor ANOVA or ANOVA for consecutive measurements for the comparison of concentration–response curves). Means were compared by paired *t* test or by the Bonferroni test for multigroup comparisons. Values of  $P < 0.05$  were considered to be significant.

### Results

Mean arterial blood pressure was significantly higher in obese ( $102 \pm 2$  mm Hg;  $n = 12$ ) versus lean rats ( $91 \pm 2$  mm Hg;  $n = 10$ ). Similarly, body weight was significantly higher in obese versus lean rats ( $391 \pm 16$  versus  $322 \pm 7$  g;  $n = 12$  per group).

After 7 days of ligation, NF and HF artery passive diameters were determined *in vitro* in response to intraluminal pressure ranging from 10 to 150 mm Hg. Passive diameter was significantly higher in HF than in NF arteries in lean rats ( $412 \pm 11$  versus  $346 \pm 9$   $\mu\text{m}$ ;  $n = 12$ ; for a pressure of 100 mm Hg;  $P < 0.05$ ). This diameter enlargement occurred similarly in obese rats ( $348 \pm 14$  versus  $294 \pm 11$   $\mu\text{m}$ ;  $n = 12$  per group;  $P < 0.05$ ; pressure was 100 mm Hg; Figure 1B shows diameter measurements for pressure values ranging from 10 to 150 mm Hg). Arterial diameter was significantly smaller in obese than in lean rats for both NF and HF arteries (Figure 1B). Passive diameter in NF and HF rats was significantly lower in obese versus lean rats. The ligation also induced an increase of CSA in HF arteries, which was significant in lean rats only. CSA was significantly higher in obese HF arteries than in lean HF arteries (Figure 1C).

In both NF and HF arteries, ACh-induced dilation was significantly lower in obese versus lean rats. In obese rats, ACh-induced dilation was significantly lower in HF than in NF arteries (Figure 2A). ACh-induced dilation was similar in all of the groups after NO synthase inhibition with L-NAME (Figure 2B and 2C). The expression level of eNOS was higher in HF than in NF arteries in both lean and obese rats (Figure 2D). Nevertheless, eNOS phosphorylation was not significantly higher in HF than in NF arteries (Figure 2E). The ratio of phospho-eNOS/eNOS was significantly reduced in obese rats compared with lean rats in NF and HF arteries. In addition, it was lower in HF arteries compared with NF arteries in obese rats (Figure 2F).

Superoxide formation, evaluated by ethidium bromide-enhanced fluorescence (Figure 3A), was significantly increased in HF compared with NF arteries. Moreover, in obese rats, superoxide levels were significantly higher than in lean rats in both HF and NF arteries (Figure 3B). Positive and negative control experiments confirmed that DHE staining is efficient in sections of arterial segments (Figure S1, available at <http://hyper.ahajournals.org>). Expression levels of the reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase subunits gp91<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup> were higher in obese than in lean rats in both NF and HF arteries (Figure 3C and 3D). In

addition, they were augmented in all of the HF arteries compared with NF arteries.

The relation between excess reactive oxygen species (ROS) production and endothelial dysfunction was confirmed using Tempol (Figure 3E) acutely or the combination of superoxide dismutase plus catalase (Figure 3F). In these conditions, ACh-induced dilation was no longer different between HF and NF arteries, as well as between obese and lean rats (compared with Figure 2A). Similarly, the combination of L-arginine plus tetrahydrobiopterin restored endothelium-dependent dilation in obese rat NF and HF arteries to the control level (lean NF arteries; Figure 3G). Tempol, in the addition of L-arginine plus tetrahydrobiopterin, had no additional effect on endothelium-dependent dilation than L-arginine plus tetrahydrobiopterin alone (Figure 3H).

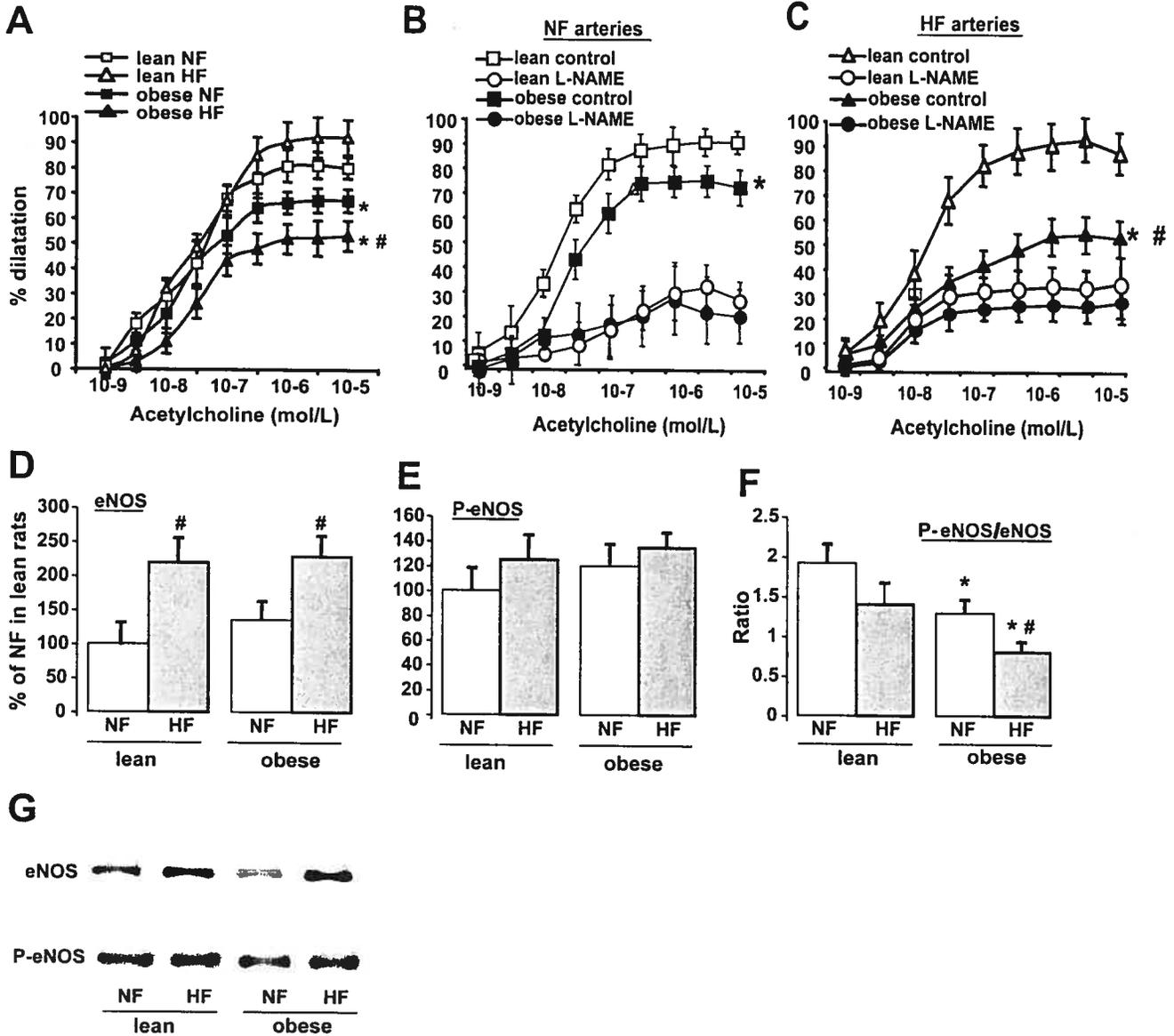
Phenylephrine- and KCl-induced contraction, as well as SNP-induced dilation, was similar in obese and lean rats. Similarly, they were not significantly affected by the chronic changes in blood flow (Figure S2).

In lean rats, FMD was significantly higher in HF than in NF arteries. In obese rats, no difference in FMD was observed between the NF and HF arteries (Figure S3A). In both NF and HF arteries, FMD was lower in obese than in lean rats. L-NAME reduced FMD in both groups. In lean rats, the attenuation of FMD by L-NAME was significantly higher in HF than in NF arteries, whereas, in obese rats, FMD attenuation by L-NAME was similar in NF and HF arteries. Moreover, in HF and NF arteries, the effect of L-NAME was lower than in the corresponding arteries in lean rats (Figure S3B). Arterial diameter before dilating arteries with flow was similar in the 4 groups of arteries ( $n = 12$  per group):  $158 \pm 26$   $\mu\text{m}$  (lean NF),  $153 \pm 26$   $\mu\text{m}$  (lean HF),  $163 \pm 21$   $\mu\text{m}$  (obese NF), and  $161 \pm 22$   $\mu\text{m}$  (obese HF).

### Discussion

We found in obese Zucker rats that a chronic increase in blood flow in resistance arteries induced a diameter enlargement associated with a reduced vasorelaxing capacity of the endothelium by contrast with lean rats in which remodeling was associated with an increased vasorelaxing capacity of the endothelium. The reduced NO-dependent dilation found in obese rats was most likely the consequence of an excessive ROS production.

The obese Zucker rat is a model of metabolic syndrome.<sup>19</sup> Arterial diameter was smaller in obese than in lean rats (Figure 1). This is in agreement with previous studies performed in obese rat skeletal muscle arteries.<sup>20,21</sup> In addition, we found that endothelium-dependent dilation was lower in obese rats compared with lean animals (Figure 2). Indeed, both ACh and FMD were decreased in obese versus lean rats (Figures 2 and S3). This might reflect a reduced involvement of NO, because L-NAME was less efficient in obese than in lean rats (Figure S3B), though this issue remains to be confirmed, because no direct measurement of NO production was performed. Nevertheless, we found that eNOS expression and phosphorylation were reduced in obese compared with lean rats. Furthermore, the ratio of phospho-eNOS/eNOS was reduced in obese rats (Figure 2). This ratio is an index of eNOS activity, especially when eNOS expres-

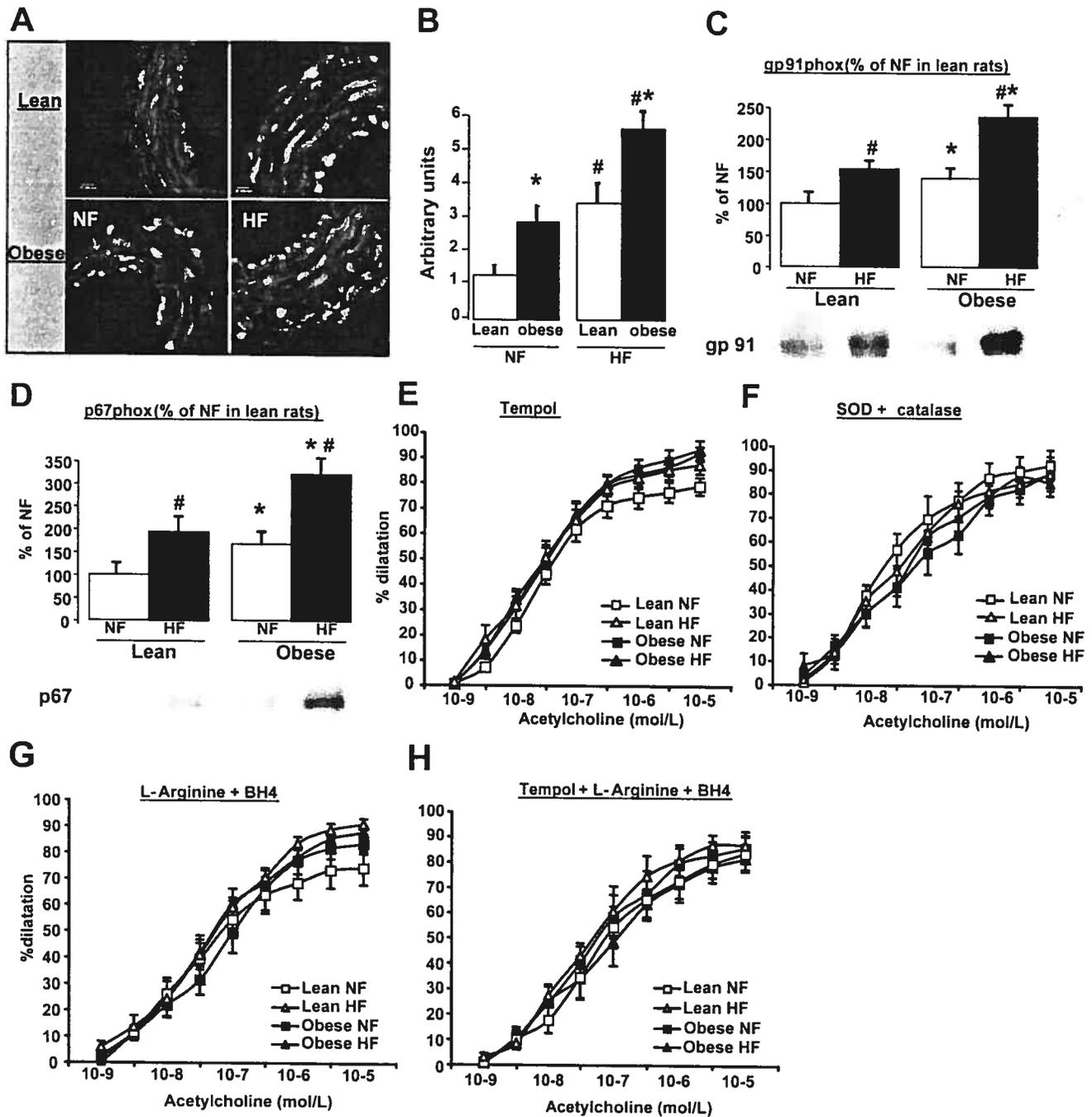


**Figure 2.** Cumulative response curve (CRC) to ACh (0.001 to 10  $\mu$ mol/L; A) in HF and NF mesenteric resistance arteries isolated from lean and obese rats. Inhibition of NO synthesis was performed using L-NAME in NF (B) and HF (C) lean and obese rats. Western blot analysis of eNOS (D) and phospho-eNOS (P-eNOS; E) was performed in HF and NF arteries in lean and obese rats. The ratio (F) phospho-eNOS/eNOS is shown in F. G, Typical blots for eNOS and P-eNOS. Mean  $\pm$  SEM is presented (n=12 per group). \**P*<0.05, obese vs lean. #*P*<0.05, HF vs NF in each group.

sion level is different among groups.<sup>22</sup> Our observations are in agreement with previous studies demonstrating an endothelial dysfunction in obese Zucker rat, especially in the NO pathway.<sup>20,23</sup> An excessive ROS production might also cause this low NO bioavailability. This was evidenced by a rise in DHE staining and NADPH oxidase (gp91 and p67) expression in mesenteric arteries, as well as by the restoration of ACh-induced dilation by antioxidant treatments, as shown in Figure 3. This is in agreement with previous studies performed in gracilis muscle arteries isolated from high-glucose-fed rats<sup>18</sup> and in mice with type 2 diabetes (db/db mice)<sup>24</sup> in which NO-dependent dilation is reduced because of an excessive ROS production. Interestingly, we found that tetrahydrobiopterin added to the bath of obese NF and HF arteries also restored ACh-induced dilation to the control

level. Thus, the endothelial disorder found in obese rats was not only because of an excessive production of ROS, but these superoxide anions might, at least in part, provide from eNOS uncoupling as described in diabetic mice resistance arteries.<sup>18</sup> As described previously in a review article,<sup>25</sup> in hypercholesterolemia and diabetes, eNOS itself can produce ROS when its cofactor tetrahydrobiopterin availability is reduced.

The endothelium dysfunction found in obese rats selectively affected the endothelium, because we found that SNP, a direct NO donor, induced similar relaxation in obese and in lean rats (Figure S2), indicating that the responsiveness of smooth muscle cells to NO was not affected. This is in agreement with a previous study performed in large arteries.<sup>26</sup> Similarly, phenylephrine-induced contraction was similar in



**Figure 3.** In situ detection of superoxide in NF and HF mesenteric arteries from lean and obese rats (A). Superoxide production in the different groups is shown in the bar graphs in B. Expression levels of the reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase subunits, gp91phox (C) and p67phox (D), were determined using Western blot analysis (typical blots are shown below bar graphs). The incidence of superoxide production inhibition on ACh-mediated dilation was performed using Tempol (E), superoxide dismutase plus catalase (F), L-arginine plus tetrahydrobiopterine (G), or Tempol in addition to L-arginine plus tetrahydrobiopterine (H). Mean  $\pm$  SEM is presented ( $n=12$  per group). \* $P<0.05$ , obese vs lean. # $P<0.05$ , HF vs NF in each group.

obese and lean rats, suggesting that smooth muscle cell contractility was also preserved.

The endothelial dysfunction observed in obese rats led us to investigate the capacity of resistance arteries to adapt in response to a chronic increase in blood flow. This adaptation or remodeling involves a rise in diameter associated with an increased endothelium (NO)-dependent dilation.<sup>9,16</sup>

First, flow-induced outward remodeling occurred in the same proportion in obese and lean rats (Figure 1B). The

diameter enlargement, which we found in both groups, was equivalent to that found in Wistar rat mesenteric arteries.<sup>6,7,9,27</sup> However, the increase in media CSA accompanying the diameter enlargement in lean rats was not found in obese animals (Figure 1C). This might be the consequence of the pre-existing arterial wall hypertrophy observed in obese rat mesenteric arteries. A similar arterial wall hypertrophy has been described in a previous study performed in skeletal muscle arteries.<sup>21</sup> The diameter enlargement induced by the

chronic rise in blood flow depends on the production of NO<sup>9</sup> and ROS.<sup>28</sup> In agreement with these studies, we observed an increase in eNOS expression and NO efficacy (Figure 2), as well as a rise in ROS production (Figure 3) in HF arteries in lean rats. In obese rats, the rise in ROS production was larger and the NO bioavailability was lower than in lean rats. Nevertheless, the diameter enlargement was equivalent in obese and lean rats. Although the rise in ROS and the decrease in NO bioavailability are probably linked,<sup>18</sup> the rise in diameter induced by flow may occur in conditions where the production of NO is reduced. In a previous study,<sup>29</sup> a partial NO blockade with L-NAME failed to prevent flow-induced remodeling in rats, whereas we have shown that a higher dose of L-NAME, or the absence of eNOS, prevented the diameter enlargement.<sup>9</sup> On the other hand, that the excessive ROS production found in obese rats did not oppose the remodeling is in agreement with a previous study showing that ROS play a key role in flow-mediated remodeling (diameter enlargement) in the carotid artery.<sup>28</sup> This latter study has shown that NO and ROS associate to form peroxynitrites, which then activate matrix metalloproteinases and arterial remodeling. Nevertheless, in resistance arteries, the involvement of ROS and peroxynitrites has not yet been shown directly and, thus, remains to be demonstrated.

Second, we found that the chronic increase in blood flow induced a larger endothelium dysfunction in obese rat HF arteries than in obese NF arteries. By contrast, in lean rats, endothelium-dependent dilation to ACh and flow was higher in HF than in NF arteries. Thus, as compared with lean arteries, obese HF arteries presented a strong endothelial dysfunction. Because smooth muscle cells were intact in obese rats (no change in response to phenylephrine or SNP; Figure S2), this reduced NO-dependent dilation was probably because of an increased inactivation of NO. It is most likely that this is the consequence of the excessive ROS production found in these arteries (Figure 3). We found that the increase in superoxide generation and the expression level of gp91 and p67 was higher in obese HF arteries than in lean HF arteries. This excessive superoxide production might explain the altered NO-dependent dilation. This was confirmed by the restoration of ACh-induced dilation in obese HF arteries by Tempol and by catalase plus superoxide dismutase (Figure 3). Such an antioxidant treatment totally suppressed the differences between lean and obese rats and between HF and NF arteries (Figure 3). In addition, we found that tetrahydrobiopterin added to the bath of obese HF arteries restored dilation to the level found in lean arteries. Tempol added to the bath in addition to tetrahydrobiopterin had no additional effect, suggesting that a large part of the endothelial dysfunction was because of eNOS uncoupling as described previously in diabetes.<sup>18</sup> Thus, the rise in ROS production accompanying flow-induced remodeling (diameter enlargement plus increased endothelium-dependent dilation) had a negative impact on NO-mediated dilation in obese rats.

### Perspectives

The current study predicts impaired microvascular regulation and structural abnormality during metabolic syndrome. Although a "structural" remodeling occurred after increasing

chronically blood flow, the arteries presented a reduced diameter and an exaggerated alteration in endothelium-dependent dilation. This could support elevated vascular resistance, moderate hypertension, or limited oxygenation of host organs. In addition, the endothelial alteration after chronic rise in blood flow might have negative consequences in the long term when patients suffering from metabolic syndrome are recommended to practice exercise or are given vasodilator treatments to improve blood flow.<sup>10,11</sup>

In conclusion, we identified an endothelial dysfunction occurring after high blood flow-induced remodeling in addition to the pre-existing endothelial dysfunction characterizing the obese. This finding might be important to consider in the treatment of obese patients suffering vascular disorders. Treatments improving endothelium-dependent dilation, such as angiotensin I-converting enzyme inhibitors,<sup>30</sup> might be preferred for the treatment of cardiovascular diseases, such as hypertension, in obese subjects.

### Acknowledgments

We thank the local animal care unit of the University of Angers and Jérôme Roux, Pierre Legras, and Dominique Gilbert for their kind help in treating the rats.

### Sources of Funding

C.B. received a studentship from the Research and Development/Canadian Institute of Health and Research. P.M. is a scholar from the Fonds de Recherche en Santé du Québec. Centre National de la Recherche Scientifique, INSERM, University of Angers, supported this work.

### Disclosures

None.

### References

- Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA*. 2001;286:1195–1200.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27:1047–1053.
- Thomas GN, Chook P, Qiao M, Huang XS, Leong HC, Celermajor DS, Woo KS. Deleterious impact of "high normal" glucose levels and other metabolic syndrome components on arterial endothelial function and intima-media thickness in apparently healthy Chinese subjects: the CATHAY study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:739–743.
- Iannuzzi A, De Michele M, Bond MG, Sacchetti L, Fortunato G, Salvatore F, Mattiello A, Panico S, Rubba P. Carotid artery remodeling in middle-aged women with the metabolic syndrome (from the "Progetto ATENA" study). *Am J Cardiol*. 2005;96:1162–1165.
- Hu G, Qiao Q, Tuomilehto J, Balkau B, Borch-Johnsen K, Pyorala K. Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. *Arch Intern Med*. 2004;164:1066–1076.
- Pourageaud F, De Mey JG. Structural properties of rat mesenteric small arteries after 4-wk exposure to elevated or reduced blood flow. *Am J Physiol*. 1997;273:H1699–H1706.
- Unthank JL, Fath SW, Burkhart HM, Miller SC, Dalsing MC. Wall remodeling during luminal expansion of mesenteric arterial collaterals in the rat. *Circ Res*. 1996;79:1015–1023.
- Tronc F, Wassef M, Esposito B, Henrion D, Glagov S, Tedgui A. Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1256–1262.
- Dumont O, Loufrani L, Henrion D. Key role of the NO-pathway and matrix metalloproteinase-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:317–324.
- Gorny D, Loufrani L, Kubis N, Levy BI, Henrion D. Chronic hydralazine improves flow (shear stress)-induced endothelium-dependent dilation in

- mouse mesenteric resistance arteries in vitro. *Microvasc Res.* 2002;64:127–134.
11. Sun D, Huang A, Koller A, Kaley G. Adaptation of flow-induced dilation of arterioles to daily exercise. *Microvasc Res.* 1998;56:54–61.
  12. Zanchi A, Delacretaz E, Taleb V, Gaillard R, Jeanrenaud B, Brunner HR, Waeber B. Endothelial function of the mesenteric arteriole and mechanical behaviour of the carotid artery in rats with insulin resistance and hypercholesterolaemia. *J Hypertens.* 1995;13:1463–1470.
  13. Bohlen HG. Protein kinase betaII in Zucker obese rats compromises oxygen and flow-mediated regulation of nitric oxide formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H492–H497.
  14. Loufrani L, Matrougui K, Li Z, Levy BI, Lacolley P, Paulin D, Henrion D. Selective microvascular dysfunction in mice lacking the gene encoding for desmin. *Faseb J.* 2002;16:117–119.
  15. Tuttle JL, Nachreiner RD, Bhuller AS, Condict KW, Connors BA, Herring BP, Dalsing MC, Unthank JL. Shear level influences resistance artery remodeling: wall dimensions, cell density, and eNOS expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281:H1380–H1389.
  16. Loufrani L, Levy BI, Henrion D. Defect in microvascular adaptation to chronic changes in blood flow in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circ Res.* 2002;91:1183–1189.
  17. Halpern W, Osol G, Coy GS. Mechanical behavior of pressurized in vitro prearteriolar vessels determined with a video system. *Ann Biomed Eng.* 1984;12:463–479.
  18. Bagi Z, Toth E, Koller A, Kaley G. Microvascular dysfunction after transient high glucose is caused by superoxide-dependent reduction in the bioavailability of NO and BH(4). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H626–H633.
  19. Kurtz TW, Morris RC, Pershadsingh HA. The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. *Hypertension.* 1989;13:896–901.
  20. Frisbee JC, Stepp DW. Impaired NO-dependent dilation of skeletal muscle arterioles in hypertensive diabetic obese Zucker rats. *Am J Physiol.* 2001;281:H1304–H1311.
  21. Frisbee JC. Remodeling of the skeletal muscle microcirculation increases resistance to perfusion in obese Zucker rats. *Am J Physiol.* 2003;285:H104–H111.
  22. Sun D, Huang A, Yan EH, Wu Z, Yan C, Kaminski PM, Oury TD, Wolin MS, Kaley G. Reduced release of nitric oxide to shear stress in mesenteric arteries of aged rats. *Am J Physiol.* 2004;286:H2249–H2256.
  23. Jin JS, Bohlen HG. Non-insulin-dependent diabetes and hyperglycemia impair rat intestinal flow-mediated regulation. *Am J Physiol.* 1997;272:H728–H734.
  24. Bagi Z, Koller A, Kaley G. Superoxide-NO interaction decreases flow- and agonist-induced dilations of coronary arterioles in Type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H1404–H1410.
  25. Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:413–420.
  26. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest.* 1996;97:2601–2610.
  27. Tulis DA, Unthank JL, Prewitt RL. Flow-induced arterial remodeling in rat mesenteric vasculature. *Am J Physiol.* 1998;274:H874–H882.
  28. Castier Y, Brandes RP, Leseche G, Tedgui A, Lehoux S. p47phox-dependent NADPH oxidase regulates flow-induced vascular remodeling. *Circ Res.* 2005;97:533–540.
  29. Ceiler DL, De Mey JG. Chronic N(G)-nitro-L-arginine methyl ester treatment does not prevent flow-induced remodeling in mesenteric feed arteries and arcading arterioles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2057–2063.
  30. Varin R, Mulder P, Tamion F, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Lerebours G, Thuillez C. Improvement of endothelial function by chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure: role of nitric oxide, prostanoids, oxidant stress, and bradykinin. *Circulation.* 2000;102:351–356.