

Université de Montréal

**Impact du stress hyperoxique en période néonatale sur la structure vasculaire : implication des phénomènes de sénescence et rôle possible dans la programmation développementale de l'hypertension artérielle**

par

Fanny Huyard

Département de Science Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de docteur  
en Sciences Biomédicales option générale

Mai 2013

© Fanny Huyard, 2013

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Impact du stress hyperoxique en période néonatale sur la structure vasculaire : implication des phénomènes de sénescence et rôle possible dans la programmation développementale de l'hypertension artérielle**

Présentée par :  
Fanny Huyard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pr Pierre Moreau, président-rapporteur  
Pr Anne Monique Nuyt, directeur de recherche  
Pr Athanase Benetos, co-directeur de recherche  
Pr Éric Thorin, membre du jury  
Pr Rosa-Maria Guéant Rodriguez, membre du jury  
Pr Stéphanie Lehoux, examinateur externe  
Pr Pascal Rossi, examinateur externe  
Pr Hélène Girouard, représentante de la doyenne de la FES

**Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

**Thèse**

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

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

**par Fanny HUYARD épouse HUYARD-DUPONT**

**Impact du stress hyperoxique en période néonatale sur la  
structure vasculaire : implication des phénomènes de  
sénescence et rôle possible dans la programmation  
développementale de l'hypertension artérielle**

**Septembre 2013**

**Membres du jury :**

<b>Rapporteurs :</b>	<b>M. Pascal ROSSI</b>	<b>Professeur, CHU Nord, Aix-Marseille Université</b>
	<b>Mme Stéphanie LEHOUX</b>	<b>Professeur, Jewish General Hospital, Université McGill, Montréal</b>
<b>Examineurs :</b>	<b>M. Pierre MOREAU</b>	<b>Professeur, Faculté de pharmacie, Université de Montréal</b>
	<b>Mme Rosa-Maria GUEANT-RODRIGUEZ</b>	<b>Professeur, Inserm 954, Université de Lorraine</b>
	<b>Mme Anne Monique NUYT</b>	<b>Professeur, CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, directeur de thèse</b>
	<b>M. Athanase BENETOS</b>	<b>Professeur, Inserm U961, Université de Lorraine, co-directeur de thèse</b>
<b>Membres invités:</b>	<b>M. Eric THORIN</b>	<b>Professeur, Département de pharmacologie, Université de Montréal</b>
	<b>Mme Hélène GIROUARD</b>	<b>Professeur, Département de pharmacologie, Université de Montréal</b>

## RESUME

Ce projet traite de la programmation développementale de l'hypertension artérielle (HTA) à travers des influences néonatales précoces pouvant moduler le développement vasculaire. Les bébés prématurés présentent des défenses antioxydantes diminuées comparés aux nouveau-nés à terme et sont exposés à la naissance à des concentrations élevées en oxygène (O<sub>2</sub>) engendrant la production d'espèces réactives de l'O<sub>2</sub> (ERO). Les conséquences vasculaires à long terme de dommages liés aux ERO en période néonatale et les mécanismes impliqués sont très partiellement compris. Les précédents résultats du laboratoire ont montré qu'un stress hyperoxique néonatal conduit chez le rat adulte à de l'HTA, une dysfonction endothéliale et une rigidité artérielle, éléments de vieillissement vasculaire. Nous émettons l'hypothèse qu'un stress hyperoxique néonatal conduit à long terme à l'altération de la structure vasculaire et à un vieillissement vasculaire précoce.

Nous avons démontré une diminution de la prolifération cellulaire, une capacité angiogénique altérée, des dommages à l'ADN et une augmentation de l'expression de protéines de sénescences (des indices de sénescence cellulaire) au-delà de la période néonatale suite à une exposition brève à l'O<sub>2</sub> au niveau vasculaire dans un modèle animal (rats Sprague-Dawley exposés à 80 % d'O<sub>2</sub> du 3<sup>ème</sup> au 10<sup>ème</sup> jour de vie comparés à des rats restés à l'air ambiant) et cellulaire (cellules musculaires lisses d'aortes thoraciques d'embryon de rat exposées à 40% O<sub>2</sub> pendant 24h ou 48h, puis remises en normoxie pendant 96h). De plus, des altérations des composants de la structure vasculaire indiquant un remodelage vasculaire aortique ont été mises en évidence. Ces changements précèdent tous l'HTA et la dysfonction vasculaire observées dans le modèle animal à l'âge adulte et pourraient y contribuer. L'étude de jeunes adultes nés < 29 semaines comparés à des jeunes adultes nés à terme indique une augmentation de marqueurs de rigidité artérielle (indices d'un vieillissement vasculaire précoce) chez la population prématurée.

L'ensemble des résultats démontre un vieillissement vasculaire précoce après une exposition néonatale transitoire à un stress hyperoxique permettant une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la survenue des troubles vasculaires retrouvés chez l'adulte et contribue à la mise en place de moyens de prévention chez des patients prématurés.

**Mots-clés :** Programmation développementale, Prématurité, Hyperoxie, Vieillesse, Rigidité artérielle, Hypertension

## ABSTRACT

The scope of this thesis is developmental programming of arterial high blood pressure (HBP) hypertension through early neonatal stimuli that may alter vascular development. Premature newborns have decreased antioxidant defenses compared to term babies and are exposed upon birth to high oxygen (O<sub>2</sub>) concentration, causing reactive oxygen species (ROS) production. Long term vascular consequences of ROS related damage during the neonatal period and the mechanisms involved remain unknown. Recent data from the laboratory show that neonatal hyperoxic stress leads in adult rat to HBP, endothelial dysfunction and arterial rigidity, characteristic features of vascular aging. We hypothesize that a neonatal hyperoxic stress leads to long term vascular structure alteration explained by an early aging of the vascular system.

We showed a decreased proliferation rate, an altered angiogenic capacity, as well as long term DNA damage and increased expression of senescence proteins at a vascular level following O<sub>2</sub> exposure in the animal (male Sprague-Dawley pups kept at 80% O<sub>2</sub> from postnatal days 3 to 10 vs. rats remained in room air) and cellular models (embryonic vascular smooth muscle cells from rat thoracic aorta exposed to 40% O<sub>2</sub> for 24h or 48h followed by 96h recovery in control conditions). In addition, alterations of vascular structure components indicating vascular remodeling was shown before the onset of the HBP at adult age. Those changes precede the HBP and vascular dysfunction observed in our animal model at adult age and could contribute to them. Study of young adults born before 29 weeks vs. young adults born at term showed that young adults born preterm present indices of arterial stiffness vs. term controls.

Results of the present thesis demonstrate a major role of premature vascular aging in the surge of vascular diseases in adulthood and contribute to a better understanding of the patho-physiological mechanisms involved and could put into practice new prevention strategies among preterm patients.

**Keywords:** Developmental programming, Prematurity, Hyperoxia, Aging, Arterial stiffness, Hypertension.

# Table des matières

<b>RESUME.....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>i</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>ii</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>xii</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>xvi</b>
<b>Avant-propos.....</b>	<b>xxi</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Programmation développementale des maladies à l'âge adulte.....</b>	<b>2</b>
1.1 Historique des études épidémiologiques sur la programmation développementale.....	2
1.2 Origine périnatale : Hypothèse de Barker.....	3
1.3 Mécanisme de l'origine développementale : la notion de programming.....	3
1.4 Mécanisme de régulation épigénétique sous tendant l'impact de la vie intra-utérine sur le futur cardiovasculaire du sujet.....	6
1.5 Modèles animaux de programmation développementale.....	6
1.6 La prématurité.....	8
1.6.1 Définition et prévalence.....	8
1.6.2 Facteurs de risques et causes de la prématurité.....	9
1.6.3 Conséquences de la prématurité.....	10
1.7 Programmation développementale de l'hypertension chez le prématuré.....	11
1.8 Mécanisme du stress oxydant chez le prématuré.....	12
1.8.1 Rappel sur le stress oxydant vasculaire.....	12
1.8.1.1 Sources principales des molécules oxydantes vasculaires.....	12
1.8.1.2 Equilibre rédox.....	13
1.8.2 Lien avec la prématurité.....	14
1.8.3 Rôle du glutathion.....	16
<b>2. La sénescence cellulaire.....</b>	<b>18</b>
2.1 Caractéristique des cellules sénescents.....	18
2.1.1 Changements morphologiques :.....	18
2.1.2 Croissance cellulaire.....	19
2.1.2.1 Rappel sur le cycle cellulaire :.....	19
2.1.2.2 Arrêt de croissance cellulaire.....	20
2.1.3 Expression génique altérée : inhibiteurs du cycle cellulaire.....	21
2.1.3.1 p16 <sup>Ink4a</sup> biomarqueur et effecteur du vieillissement cellulaire:.....	21

a)	Découverte et localisation du gène de la protéine p16.....	21
b)	Fonctions de la protéine p16.....	21
c)	Rôle de la protéine p16 dans la sénescence .....	22
2.1.3.2	p53.....	22
a)	Découverte et localisation du gène de la protéine p53.....	22
b)	Fonctions de la protéine p53.....	23
c)	Rôle de la protéine p53 dans la sénescence .....	24
2.1.3.3	p21.....	24
a)	Découverte et localisation du gène de la protéine p21.....	24
b)	Fonctions de la protéine p21.....	25
c)	Rôle de la protéine p21 dans la sénescence .....	25
2.1.3.4	pRb.....	26
a)	Découverte et localisation du gène de la protéine pRb.....	26
b)	Mécanismes d'action de la protéine pRb.....	26
c)	Rôle de la protéine pRb dans la sénescence.....	26
2.1.4	Résistance à l'apoptose.....	27
2.1.5	Augmentation de l'activité de la Senescence-associated $\beta$ -galactosidase .....	28
2.2	Principaux mécanismes de déclenchement du programme de sénescence cellulaire .....	29
2.2.1	Stress oxydant et sénescence cellulaire.....	29
2.2.2	Domages à l'ADN .....	30
2.2.2.1	Relation avec les protéines inhibitrices du cycle cellulaire.....	30
2.2.2.2	Relation avec le suppresseur de tumeur p53 se liant à la protéine 1 : 53BP1 .....	31
<b>3.</b>	<b>Effets du vieillissement précoce sur l'aorte.....</b>	<b>33</b>
3.1	Rappel sur l'aorte.....	33
3.1.1	Anatomie.....	33
3.1.2	Structure de la paroi artérielle.....	34
3.1.2.1	L'intima.....	35
3.1.2.2	La média.....	36
a)	Les CMLV des artères élastiques.....	37
b)	Les CMLV au cours de l'angiogénèse.....	37
c)	Les CMLV matures.....	39
3.1.2.3	L'adventice.....	39
3.1.3	Les différents types d'artères.....	40
3.2	Mécanismes cellulaires et moléculaires du vieillissement aortique : le remodelage vasculaire .....	41
3.2.1	Rappel sur la MEC du tissu aortique .....	42
3.2.1.1	L'élastine.....	42
a)	La synthèse de l'élastine .....	42
b)	La structure de l'élastine.....	43
3.2.1.2	Le collagène .....	44
a)	La synthèse du collagène : .....	44
b)	Structure du collagène : .....	44
i.	Les fibres de collagène.....	45
ii.	Orientation et propriétés hémodynamiques des fibres de collagène:.....	46
3.2.1.3	Les autres molécules de la MEC des artères élastiques .....	47

3.2.2	Altérations de la composition biochimique de la MEC .....	48
3.2.2.1	Enzymes de dégradation de la MEC .....	49
a)	Les MMPs.....	49
b)	Les Cystéine-protéases .....	51
3.2.2.2	Les changements de la MEC.....	52
a)	Dégradation de l'élastine .....	53
b)	Augmentation de macromolécules au sein de la MEC .....	53
c)	Augmentation du phénotype sécrétoire des CML.....	54
3.3	Mécanisme hémodynamique du vieillissement aortique : altération des propriétés biophysiques .....	55
3.3.1	Définition de la rigidité artérielle.....	56
3.3.2	Mesure de la rigidité artérielle : principe de l'échocardiographie .....	56
3.3.2.1	Principe de l'imagerie ultrasonore : .....	57
3.3.2.2	Principe de l'effet Doppler : .....	57
3.3.2.3	Techniques d'enregistrement : .....	58
a)	Echocardiographie monodimensionnelle (TM) .....	59
b)	Echocardiographie bidimensionnelle (2D).....	59
i.	Voie suprasternale : .....	60
ii.	Voie parasternale gauche : .....	60
3.3.3	Paramètres de mesure de la rigidité artérielle .....	61
3.3.3.1	Les mesures directes de la rigidité aortique .....	63
a)	Module élastique de Peterson (Ep) : .....	63
b)	$\beta$ stiffness index ( $\beta$ SI) : .....	64
3.3.3.2	Les mesures indirectes de la rigidité aortique et de la réflexion des ondes.....	66
a)	Vitesse de l'onde de pouls .....	66
b)	Les mesures d'impédances aortiques caractéristique $Z_c$ et d'entrée $Z_i$ .....	69
<b>CHAPITRE 2 : HYPOTHESES DE RECHERCHE ET BUTS DE L'ETUDE.....</b>		<b>72</b>
<b>CHAPITRE 3 : MODÈLES UTILISÉS.....</b>		<b>75</b>
1.	<b>Modèle cellulaire.....</b>	<b>76</b>
2.	<b>Modèle animal.....</b>	<b>79</b>
3.	<b>Etude clinique.....</b>	<b>83</b>
<b>CHAPITRE 4 : RESULTATS : PRÉSENTATION DES ARTICLES .....</b>		<b>86</b>
<b>Premier Article :.....</b>		<b>87</b>
<b>Markers of vascular senescence in rats following transient neonatal high oxygen exposure. ....</b>		<b>87</b>
<b>Deuxième Article :.....</b>		<b>125</b>

<b>Transient neonatal high oxygen exposure leads to remodelling of aorta extracellular matrix perpetuated to adulthood in rats.....</b>	<b>125</b>
---	------------

<b>Troisième Article :.....</b>	<b>163</b>
---------------------------------	------------

<b>Evidence of arterial stiffness in young adults born extremely preterm (&lt;29 weeks). 163</b>	
--	--

<b>Résultats additionnels :.....</b>	<b>188</b>
--------------------------------------	------------

<b>1. Matériels et méthodes.....</b>	<b>189</b>
--------------------------------------	------------

1.1	Modèle cellulaire .....	189
1.1.1	Etude de la prolifération cellulaire.....	189
1.1.1.1	Compte cellulaire .....	189
1.1.1.2	Mesure de la synthèse d'ADN par incorporation de BrdU .....	189
1.1.2	Evaluation de la cytotoxicité par le test de libération de Lactate déshydrogénase .....	190
1.1.3	Evaluation des dommages à l'ADN : immunofluorescence du 53BP1.....	190
1.2	Cohorte.....	191
1.2.1	Evaluation d'indices de stress oxydant .....	191
1.2.1.1	MDA .....	191
1.2.1.2	Glutathion.....	191
1.2.2	Extraction des CPE au Ficoll et Compte des CPE par cytométrie en flux.....	192

<b>2. Résultats.....</b>	<b>194</b>
--------------------------	------------

2.1	Modèle cellulaire .....	194
2.1.1	Effet de l'exposition à l'O <sub>2</sub> sur la prolifération des cellules A10 .....	194
2.1.2	Effet de l'exposition à l'O <sub>2</sub> sur les dommages à l'ADN cellules A10.....	194
2.1.3	Effet de l'exposition à l'O <sub>2</sub> sur la libération de LDH : évaluation de la cytotoxicité .....	195
2.2	Modèle animal .....	200
2.2.1	Evaluation de l'expression de Bax et Bcl2 à 4W par Western Blot.....	200
2.3	Cohorte.....	200
2.3.1	MDA .....	200
2.3.2	Glutathion .....	201
2.3.3	Quantification des CPE dans la population de jeunes adultes nés très prématurément .....	203

<b>CHAPITRE 5 : DISCUSSION.....</b>	<b>204</b>
-------------------------------------	------------

<b>1. Le mécanisme du stress oxydant dans le développement de l'HTA .....</b>	<b>205</b>
---	------------

1.1	Le rôle d'une exposition prématurée à l'oxygène en période néonatale.....	205
1.2	Les conséquences d'une déficience en enzyme antioxydante chez le prématuré .....	207

<b>2. Le mécanisme de sénescence vasculaire précoce impliqué dans la programmation développementale de l'HTA.....</b>	<b>209</b>
---	------------

2.1	Le défaut de prolifération des cellules vasculaires .....	209
-----	---	-----



2.2	La présence de dommages à l'ADN au sein des cellules vasculaires sans augmentation des phénomènes d'apoptose .....	214
2.3	L'augmentation des protéines de sénescence au sein de la paroi vasculaire.....	215
<b>3.</b>	<b>Les conséquences fonctionnelles au niveau vasculaire de la prématurité et leurs rôles dans la programmation développementale de l'HTA à l'âge adulte observée lors d'une exposition à l'oxygène en période néonatale .....</b>	<b>219</b>
3.1	Le défaut d'angiogénèse et la raréfaction microvasculaire associée.....	219
3.2	Le mécanisme du remodelage vasculaire.....	221
3.3	L'augmentation d'indice de la rigidité artérielle.....	225
<b>CHAPITRE 6 : PERSPECTIVES GENERALES .....</b>		<b>230</b>
1.	Implication des mécanismes de régulation épigénétique .....	231
2.	Étude de la vasodilatation de l'artère brachiale par Doppler .....	231
3.	Étude des cellules souches vasculaires : les cellules progénitrices endothéliales	232
4.	Étude de la longueur des télomères.....	233
<b>CHAPITRE 7 : CONCLUSIONS .....</b>		<b>235</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>		<b>241</b>

## Liste des tableaux

### CHAPITRE 1

Tableau 1 : Enoncés des principes de programmation développementale, adapté de Nijland

Tableau 2: MMPs de la paroi artérielle et principaux substrats

Tableau 3 : Efficacité élastinolytique des MMPs et des cathepsines, adapté de H. A. Chapman

Tableau 4 : Synthèse des différents paramètres de mesure de la rigidité artérielle

### CHAPITRE 3

Tableau 5 : Valeurs de pO<sub>2</sub> (mmHg) dans le milieu de culture suivant l'exposition

### CHAPITRE 4

#### ARTICLE 1

Table 1: DNA damage in vascular cells from aorta of P10, 4 weeks and 16 weeks rats after transient neonatal high O<sub>2</sub>-exposure

#### ARTICLE 3

Table 1 : General birth characteristics of young adults who were born very preterm compared to young adults born at term

Table 2 : General characteristics of young adults who were born very preterm compared to young adults born at term

Table 3 : Echo-Doppler data and Arterial Biophysical properties of young adults who were born very preterm compared to young adults born at term

Table 4 : Carotid artery measurements of young adults who were born very preterm compared to young adults born at term

# Liste des figures

## CHAPITRE 1

- Figure 1 : Répartition de la prématurité en fonction de l'AG, d'après R. L. Goldenberg
- Figure 2 : Répartition des causes de la prématurité, d'après R. L. Goldenberg
- Figure 3 : Modification de l'équilibre rédox cellulaire par la production aigue ou chronique des ERO, adapté de (Droge 2002).
- Figure 4 : Les quatre phases du cycle cellulaire et la phase G0 et interventions des différents complexes Cycline / CDK au cours du cycle cellulaire
- Figure 5 : Anatomie de l'aorte
- Figure 6 : Section transversale d'aorte thoracique de rat Sprague-Dawley
- Figure 7 : Deux voies d'exploration du cœur utilisées pour l'étude des paramètres de rigidité vasculaire en échographie bidimensionnelle 2D
- Figure 8 : Pression intravasculaire et variation de diamètre
- Figure 9 : Logarithme naturel du ratio de pression systolique-diastolique et extensibilité de la paroi artérielle
- Figure 10 : Enregistrement en mode TM pour la mesure du AAoD et du AAoS pour les calculs de  $E_p$  et de  $\beta SI$
- Figure 11 : Représentation schématique de l'effet des ondes de réflexion sur la pression artérielle aortique. (SPTI : surface sous la courbe de pression systolique, DPTI, surface sous la courbe de pression diastolique) issue de (Boutouyrie 2004).
- Figure 12 : Coupe 2D suprasternale longitudinale de la crosse de l'aorte utilisée pour le calcul de la vitesse de l'onde de pouls
- Figure 13 : Coupe 2D parasternale longitudinale du cœur utilisée pour le calcul de la surface de la coupe de l'anneau aortique pour le calcul des impédances

## CHAPITRE 3

- Figure 14 : Chambre à hyperoxie utilisée pour le modèle cellulaire

- Figure 15 : Déroulement des expériences du modèle cellulaire dans le temps
- Figure 16 : Chambre à hyperoxie utilisée pour le modèle animal
- Figure 17 : Déroulement des expériences du modèle animal dans le temps
- Figure 18 : Élévation de la pression artérielle à l'âge adulte suite à un stress hyperoxique en période néonatale
- Figure 19 : Dysfonction endothéliale à l'âge adulte suite à un stress hyperoxique en période néonatale
- Figure 20 : Augmentation de la VOP à l'âge adulte suite à un stress hyperoxique en période néonatale

## **CHAPITRE 4**

### **ARTICLE 1**

- Figure 1: Decreased aorta cell proliferation without apoptosis after O<sub>2</sub> exposure of newborn rats.
- Figure 2: Decreased angiogenic capacity and capillary density after neonatal high O<sub>2</sub> exposure.
- Figure 3: Neonatal high O<sub>2</sub>-exposure lead to persistent DNA damage in aorta.
- Figure 4: Neonatal high O<sub>2</sub>-exposure increased p16 and p53 senescence-associated proteins expression.
- Figure 5: Impact of neonatal high O<sub>2</sub> exposure on p16, p21, p53 and pRb senescence-associated proteins expression by Western blots.

### **ARTICLE 2**

- Figure 1: Neonatal oxygen exposure does not induce vascular production of ROS and does not change vascular contractility
- Figure 2: Neonatal oxygen exposure does not lead to hyperplasia or hypertrophy in aortic media
- Figure 3: Neonatal oxygen exposure increased collagen and decreased elastin content in aortic media

- Figure 4: Neonatal oxygen exposure increased cathepsin S and decreased cathepsin K in aortic media
- Figure 5: Neonatal oxygen exposure increased MMP-2 and decreased TIMP-2 in aortic media.
- Figure 6: Neonatal oxygen exposure decreased MMP-9 and increased TIMP-1 in aortic media.

## **RESULTATS ADDITIONNELS**

- Figure 1: Hyperoxia decreases proliferation rate in A10 cells without cell toxicity
- Figure 2: Hyperoxia promotes persistent 53BP1 staining
- Figure 3 : Expression de Bcl 2 et de Bax rapportée à la  $\beta$ -actine dans des extraits totaux de protéines aortiques de rats à 4W (n =6) ayant été exposés à l'oxygène en période néonatale (Hyperoxia) et contrôle déterminée par Western Blot et quantifié avec le logiciel Gel Pro Analyser 3.1
- Figure 4 : Concentrations plasmatiques de malondialdehyde (MDA) chez de jeunes adultes nés prématurés (n=18) comparés à des jeunes adultes nés à terme (n=16)
- Figure 5 : Évaluation du statut oxydant dans les érythrocytes de jeunes adultes nés prématurés (n=18) comparés à des jeunes adultes nés à terme (n=16)
- Figure 6 : Quantification des CPEs par cytométrie en Flux dans les cellules mononuclées de sang périphériques de jeunes adultes nés prématurés (n=16) comparés à des jeunes adultes nés à terme (n=17)

## **CHAPITRE 5**

- Figure 21 : Programme effecteur de la sénescence comprenant les voies p53/p21 et p16/pRb, d'après Bringold
- Figure 22 : Synthèse mécanistique d'un point de vue moléculaire de l'arrêt du cycle cellulaire aboutissant à la sénescence. Implications de divers stimuli pouvant activer un programme commun de sénescence.
- Figure 23 : Synthèse mécanistique d'un point de vue fonctionnel du développement de la rigidité artérielle via le remodelage vasculaire et l'augmentation des impédances

## **CHAPITRE 7**

Figure 24 : Mécanisme physiopathologique du développement de l'élévation de la pression artérielle à l'âge adulte lors d'une exposition à l'O<sub>2</sub> en période néonatale

## Liste des abréviations

16W :	16 semaines de vie
4W :	4 semaines de vie
53BP1:	TP53-binding protein 1 (Suppresseur de tumeur p53 se liant à la Protéine 1)
AAoD :	Ascending Aorta minimum Diastolic dimension (diamètre minimum de l'aorte ascendante en diastole)
AAoS :	Ascending Aorta maximum Systolic dimension (diamètre maximum de l'aorte ascendante en systole)
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AG :	Age gestationnel
AGE :	Advanced Glycation End-product (Produit final de la glycation avancée)
AoCSA :	Aortic Cross Sectional Area (surface de coupe de l'aorte)
AoL :	Aortic Lengh (longueur de l'arc aortique)
Bax :	Bcl-2-associated X protein, protéine pro-apoptotique
Bcl2 :	B-cell lymphoma 2, protéine anti- apoptotique
$\beta$ SI :	$\beta$ -Stiffness Index (index de rigidité artérielle)
BrdU :	Bromodeoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine)
CDK :	Cyclin Dependent Kinase
CDK2:	Cyclin Dependent Kinase 2
CDK4:	Cyclin Dependent Kinase 4
CDK6:	Cyclin Dependent Kinase 6
CDKI :	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
CDKI1:	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1
CDKN1A :	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
CDKN2A :	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CIP1 :	CDK Interacting Protein 1

CMLV :	Cellules Musculaires Lisses Vasculaires
CPE :	Cellules Progénitrices Endothéliales
DAPI :	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DBP :	Dysplasie bronchopulmonaire
DNA :	DeoxyriboNucleic Acid
DNA DSBs :	DNA Double Strands Breaks (Cassures doubles brins à l'ADN)
DOHaD :	Developmental Origins of Health and Disease (Origines développementales de la santé et des maladies)
DS :	Déviation Standard
E2F1 :	E2F transcription factor 1
EBP :	Elastic-binding protein
ECG :	Electrocardiogramme
Ep :	Module élastique de Peterson
ERO :	Espèces Réactives de l'Oxygène
FACs :	Fluorescence-Activated Cell sorting (Cytométrie de Flux)
G0 :	Gap 0
G1 :	Gap 1
G2 :	Gap 2
GSH :	Glutathion réduit
GSSG :	Glutathion oxide
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peroxyde d'hydrogène
HBP :	High Blood Pressure
HPV :	Human Papillomavirus (papillomavirus humain)
HTA :	Hypertension Artérielle
Ink4a :	Inhibitor of CDK4 A
kDa :	kiloDalton
LOX :	Lysyle Oxydase



M :	Mitose
MAGP:	Multifibrillar Associated GlycoProtein
MAPK :	Mitogen Activating Protein Kinase
MDA :	Malondialdéhyde
MEC :	Matrice ExtraCellulaire
mmHg :	millimètre de mercure
MMP :	Métalloprotéinase Matricielle
MMP-2 :	Métalloprotéinase Matricielle-2
MMP-9 :	Métalloprotéinase Matricielle-9
NAD(P)H :	Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide-Phosphate
NO :	Oxyde Nitrique
NO <sup>-</sup> :	Anion nitroxyl
NOS <sub>e</sub> :	Oxyde Nitrique Synthétase endothéliale
O <sub>2</sub> :	Oxygène
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> :	Anion superoxide
OH <sup>•</sup> :	Radical hydroxyl
ONOO <sup>-</sup> :	Peroxynitrite
P10 :	10 jours de vie
p16 :	Protéine 16
p21 :	Protéine 21
p38 :	Protéine 38
p53 :	Protéine 53
PAD :	Pression Artérielle Diastolique
PAM :	Pression Artérielle Moyenne
PAS :	Pression Artérielle Systolique
PBMC :	Peripheral Blood Mononuclear Cells (cellules mononuclées du sang périphérique)

pO <sub>2</sub> :	Pression partielle en Oxygène
PP :	Pression Pulsée
pRb :	Protéine du Rétinoblastome
Rats SD :	Rats Sprague Dawley
ROP :	Rétinopathie du prématuré
RCIU :	Retard de Croissance Intra-Utérin
RT-PCR :	Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction
S :	Synthèse de nouvelle molécule d'ADN
SA :	Semaines d'Aménorrhée
SA-β-Gal :	Senescence-Associated β-Galactosidase
SDI1:	Senescent cell-Derived Inhibitor 1
SG :	Semaines Gestationnelles
SOD :	Superoxide Dismutase
SV40 :	Simian Virus 40 (Virus Simien 40)
TIMP :	Tissue Inhibitors of MetalloProteinases (Inhibiteurs Tissulaires des MetalloProteinases)
TM :	Temps-Mouvement
TT :	Temps de transit
VOP :	Vitesse d'Onde de Pouls
VSMC :	Vascular Smooth Muscle Cells
WAF1:	Wildtype p53-Activated Fragment 1
X-Gal :	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranoside
Zc :	Impédance aortique caractéristique
Zi :	Impédance aortique d'entrée

## Remerciements

Un doctorat ne se fait bien évidemment pas seul. En premier vient le plus évident, dans ce cas l'évidence est de plus un choix, elle est en première place :

Le professeur Anne Monique Nuyt a su mener ma formation doctorale avec excellence. Je la remercie pour sa disponibilité et sa rigueur scientifique envers mon apprentissage. Elle a su me mener dans l'originalité de la science et dans des domaines dans lesquels je n'aurais jamais été par moi-même. En arrivant ici, je n'aurais jamais pensé que le vieillissement vasculaire allait devenir mon sujet de thèse et, qui plus est dans la discipline de la néonatalogie ; ce qui par définition en fait un sujet paradoxal. A ce stade, je tiens également à souligner ici, sur le ton de la litote, je le précise, toute mon admiration pour sa carrière. Aussi simplement que cela, si je devais choisir mon directeur à nouveau, je la choisirais sans hésitation.

Le professeur Athanase Benetos a accepté d'être mon codirecteur de thèse. Son excellence dans le domaine du vieillissement artériel en faisait une personne évidente pour codiriger cette thèse et il a accepté de la codiriger alors que l'histoire avait déjà commencée. Pour cette confiance je le remercie très sincèrement.

Je remercie le Professeur Pierre Moreau qui a accepté la présidence de cette thèse, ainsi que le Professeur Eric Thorin et le Professeur Rosa-Maria Guéant Rodriguez de l'honneur

qu'ils me font en acceptant d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Ils prennent une partie de leur temps pour évaluer ce travail et je leur en suis reconnaissante.

Je suis également très honorée que le Professeur Pascal Rossi ainsi que le Professeur Stéphanie Lehoux aient accepté d'être examinateurs externes de cette thèse. Je les remercie tout particulièrement pour le temps qu'ils consacreront à la lecture de cette thèse.

Je remercie également le Professeur Hélène Girouard pour avoir accepté d'être la représentante de la doyenne de la Faculté des études supérieures lors de la soutenance de ma thèse.

Viennent ensuite les membres du laboratoire qui m'ont accueilli avec plaisir : le Dr Catherine Zydorczyk et le Dr Frank Cloutier. Je n'oublierai jamais l'accueil que vous m'avez fait ici à Montréal, vous avez tout fait pour que je me sente bien et ce fut le cas : vous avez su confirmer mon choix de venir ici au Québec. Il y a également Anik Cloutier, assistante de recherche au laboratoire. Je crois que le moment où tu m'as le plus aidé c'était pendant ta grossesse, tu étais active et te démenais pour faire avancer le projet clinique et c'était loin d'être facile surtout à ce moment de ton existence, je sais maintenant de quoi je parle.... Merci pour tout ce que tu as pu faire jusqu'à aujourd'hui encore! Bien sur Mariane j'écris ces quelques mots en français mais tu m'as réellement appris à parler anglais et c'était vraiment un réel plaisir de passer ce doctorat avec toi car l'on s'entend tellement bien ! Puis Megan et Marie-Amélie vous allez voir le Québec est tellement riche, merci pour votre expérience de récente docteure, je me suis inspirée de vos méthodes. Je n'oublie

pas également Hélène Gagnon qui est ma collaboratrice sur le terrain du projet clinique. Oui, oui toujours trouver des dates, cela aura été mon obsession, c'est vraiment un bonheur de travailler avec toi. Merci pour ton calme et ton expérience ! Je n'oublie pas Lise-Angela Ouellet et Hugues Charron qui ont également participé à la venue des participants. Il y a aussi Alexandre, Ariane, Catherine, Laurence et Anne tout dernièrement : j'ai passé d'excellents moments avec vous.

Il y a par la suite deux anges bienveillants qui veillent sur nous, étudiants : Sandy et Dominika. Chacune vous savez être à l'écoute de ma vie de doctorante et qui maintenant devient maman !

Viennent ensuite les organismes subventionnaires qui ont accepté de financer mon doctorat et ce à deux reprises que ce soit le QTNPR / IRSC et par la suite la Fondation des Etoiles. Mais aussi le département du programme de Sciences Biomédicales pour leur bourse d'excellence et enfin la FESP pour la bourse de fin d'étude.

Dans un tout autre registre, il y a aussi bien sur mes amis, mes proches et ma famille...qui ont bien dû trouver étrange mon départ, alors que tout allait si bien pour moi dans la plus belle ville du monde : Paris. Parmi eux, il y a mes parents. Vous avez placé la barre très très très haute en m'élevant comme vous l'avez fait, j'espère que je saurai aussi bien faire que vous, vous êtes vraiment les meilleurs parents du monde mais vous le savez déjà tout le monde vous l'a déjà dit et je ne peux que plussoyer! Il y a mes grands-parents paternels, je ne vous dissocie pas, vous avez incarné pour moi l'existence au travers de l'histoire: votre

chemin de vie m'inspirera toujours. Ma grand-mère Marie-Renée, je sais que tu collectionnes mes diplômes sur le meuble dans le salon alors bientôt il y en aura d'autres ... *Alea jacta est*, je sais aussi que tu suis mon parcours; sache que j'admire le tiens. Marcelle aussi, vous avez toujours su prendre soin de moi lorsque vous veniez chez nous ici à Montréal, à tel point que je me sentais invitée chez moi dans le bon sens du terme tellement vous preniez les choses en main à la maison ! Jeanne, Juliana et Anne (mention québécoise à toi on a été un peu folles ce 1<sup>er</sup> Avril 2008 non ?), oui je suis de retour !!!!!!! Je n'oublie pas non plus mes copines du QTNPR : Sonia et Fathia et Sarah aussi ! On a survécu à tous ces cours .... J'ai passé d'excellents moments avec vous, il était important pour moi d'avoir votre écoute et retour sur ce que nous vivions en doctorat !

Enfin il y a tout simplement une personne bien évidente que je remercie, Emmanuel, M, aime comme j'aime à te nommer. Je fais alors une entrave à une règle que je me suis toujours tenue de suivre, moi qui n'en suis pas habituellement, et mélange alors les deux mondes, celui privé et celui professionnel, en te mentionnant ici car tu as toute ta place dans la réussite de ce doctorat. Toi qui a accepté de tout quitter pour moi après qu'à mon tour ce soir d'octobre 2004 j'avais fais raisonnablement ce choix délibéré de choisir ton existence contre ma vocation. Je ne pouvais ne pas te nommer ici. Tu as su être patient et généreux et si gentil quand je travaillais tard le soir et quelquefois même jusqu'au petit matin (cf prédoc...). Tu es simplement une partie de moi et ce pour toujours. J'écris cela avec une extrême brillance au fond de mon iris. Nous partons vers un chemin inconnu, la création de l'existence d'un être qui est la résultante de notre amour. Irrémédiablement et définitivement : je T'aime.

« ... Rien avoir, mais passionnément,  
Ne rien se dire éperdument,  
Mais tout donner avec ivresse  
Et, riche de dépossession,  
N'avoir que sa vérité,  
Posséder toutes les richesses,... »

**Monique Serf dite Barbara**  
*Extraits de Perlimpinpin*  
*Olympia 1978.*

## **Avant-propos**

La notion de programmation développementale des maladies cardiovasculaire est un concept en plein essor. L'objectif de ce travail était de répondre à cette problématique à travers une approche peu commune, par l'entremise au sein d'un même projet de la recherche fondamentale et de la recherche clinique. Le défi consistait à allier deux courants de recherche traditionnellement séparés, afin d'arriver ultimement à une recherche dite translationnelle qui constitue une passerelle directe entre la recherche exploratoire et la recherche clinique. Cette thèse de doctorat s'est ainsi déroulée en cotutelle entre l'Université de Montréal et l'Université de Nancy, de manière à allier l'expertise des deux directeurs de recherche, le Pr Anne Monique Nuyt, néonatalogiste, (Centre de recherche du CHU Ste-Justine, 3175 chemin de la Côte Sainte-Catherine, Montréal, Qc H3T 1C5, Canada) pour son expérience dans la programmation développementale des maladies cardiovasculaires à l'âge adulte, et le Pr Athanase Benetos, cardiologue et gériatre, (UMR 961 Risques cardiovasculaires, fibrose et hypercoagulabilité, 9 avenue de la Forêt de la Haye, 54 500 Vandoeuvre les Nancy, France) pour son expertise en vieillissement vasculaire chez l'humain.

Le corps du texte s'articule de la manière suivante : l'introduction correspondant au chapitre 1 est divisée en 3 parties. La première partie présente la notion de programmation développementale, où la prématurité est définie. La deuxième partie est consacrée à la définition proprement dite de la sénescence cellulaire ; hypothèse proposée afin d'expliquer les troubles retrouvés à l'âge adulte dans le modèle animal de prématurité. La troisième



partie aborde quant à elle les effets du vieillissement précoce sur l'aorte. Cette partie présente plus précisément la notion de rigidité artérielle, caractéristique majeure du vieillissement aortique. L'hypothèse de recherche et les buts de l'étude sont ensuite présentés dans le chapitre 2. Le chapitre 3 décrit les modèles que nous avons utilisés dans le cadre de cette recherche. Suivent les résultats, présentés sous forme de trois articles ainsi que de données additionnelles, puis une discussion générale des mécanismes mis en évidence. Enfin, des propositions de perspectives et une conclusion résumant les principaux mécanismes sous forme de schéma récapitulatifs achèvent ce texte de thèse.

**CHAPITRE 1 : INTRODUCTION**

## **1. Programmation développementale des maladies à l'âge adulte**

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'existence de liens entre diverses expositions dès la vie intra-utérine, et la mortalité, ou la survenue de maladies chroniques à l'âge adulte. Le concept des origines développementales de la santé et des maladies (DOHaD pour *Developmental Origins of Health and Disease*) définit un concept intégrant l'ensemble de ces observations et postule que les conditions dans lesquelles un individu débute sa vie, et ce dès la période intra-utérine, et en période néonatale, influencent sa santé à très long terme. L'intégration des résultats de ces recherches entraînera à long terme des changements majeurs en santé publique dans la prévention et la prise en charge des maladies chroniques de l'adulte les plus fréquentes (hypertension, obésité, diabète, mais aussi cancer).

### **1.1 Historique des études épidémiologiques sur la programmation développementale**

Les travaux les plus anciens faisant apparaître la notion d'effet à long terme d'une situation survenue de nombreuses années auparavant sont de Kermack et al (Kermack, McKendrick et al. 1934). Ces chercheurs ont montré l'importance de bonnes conditions environnementales pendant l'enfance sur le taux de mortalité toutes causes confondues plus tard dans la vie. Par la suite, et au niveau cardiovasculaire, les travaux de Forsdahl en 1977 (Forsdahl 1977) ont montré que des conditions de vie difficiles durant l'enfance et l'adolescence pouvaient être un facteur de risque pour la survenue de maladies cardiovasculaires à l'âge adulte. Enfin, en 1985, Wadsworth et al (Wadsworth, Cripps et al. 1985) semblent les premiers à avoir montré une relation entre un facteur périnatal et l'hypertension à l'âge adulte : ils montrèrent aussi bien chez les hommes que chez les

femmes, une relation inverse entre le poids de naissance et la pression artérielle systolique, la diastolique n'étant pas affectée par le poids de naissance dans leur cohorte.

## **1.2 Origine périnatale : Hypothèse de Barker**

En 1986 furent publiés dans le Lancet les travaux de l'épidémiologiste anglais David Barker (Barker and Osmond 1986). Il remarqua que les régions à mortalité infantile élevée en Grande Bretagne dans les années 1920 étaient aussi celles qui avaient un taux important de mortalité d'origine coronaire dans les années 1970. Il a ainsi pu démontrer un lien entre divers aspects de la croissance avant la naissance ou pendant la petite enfance, et la mortalité et les maladies cardiovasculaires, ou la présence de facteurs de risque de ces maladies à l'âge l'adulte, chez les hommes comme chez les femmes (Barker 1998). Il conclut qu'une mauvaise santé et un faible poids des mères étaient des facteurs de risque importants de maladies coronariennes chez leurs enfants. Il a parallèlement publié des données montrant que les pathologies adultes pourraient être liées aux conditions de vie périnatales par une étude démontrant une relation inverse entre le poids à la naissance et la mortalité par maladies cardiovasculaires tant chez les hommes que chez les femmes (Barker, Osmond et al. 1989). C'est pour cette raison que les phénomènes par lesquels passent les effets d'une adaptation précoce à un environnement défavorable sont communément appelés "Hypothèse de Barker".

## **1.3 Mécanisme de l'origine développementale : la notion de programming**

Des hypothèses de mécanismes concernant les observations épidémiologiques de Barker furent alors proposées. Le terme « programming » apparaît pour la première fois

dans les travaux sur la nutrition de Lucas en 1991 (Lucas 1991), qui le définit comme une insulte intervenant à une période critique du développement allant engendrer des influences à long terme sur la structure et/ou la fonction d'un organisme. Les principes du programming furent ensuite définis dans une revue de Nijland (Nijland, Ford et al. 2008). Le tableau 1 en reprend les différents concepts. On notera cependant que Barker recommande de privilégier l'utilisation du terme plasticité développementale plutôt que programming, décrivant plus adéquatement la notion dynamique de la formation d'un organisme.

**Tableau 1 : Enoncés des principes de programmation développementale, adapté de Nijland (Nijland, Ford et al. 2008)**

<b>Principe 1</b>	Pendant le développement, il existe des périodes critiques de vulnérabilité aux situations délétères. Les périodes de vulnérabilité ont lieu à différents moments pour différents tissus. Les cellules se divisant rapidement pendant ce temps d'exposition sont à haut risque. Les facteurs de risques sont : une trop grande quantité ou un défaut d'hormones ou de vitamines, l'exposition à l'alcool ou au tabac, une altération des paramètres physiologiques comme un élévation de la pression artérielle.
<b>Principe 2</b>	La programmation a des effets permanents modifiant la susceptibilité aux maladies dans la vie future.
<b>Principe 3</b>	Le développement fœtal requière à toutes étapes un développement optimal. Chaque phase du développement doit fournir les conditions requises pour le développement ultérieur.
<b>Principe 4</b>	La programmation peut faire intervenir des changements structuraux dans des organes importants : le nombre absolu de cellules dans un organe peut être modifié, le rapport entre les différents types de cellules et leur distribution dans un organe peut être déséquilibré, la vascularisation normale de l'organe peut être compromise.
<b>Principe 5</b>	Dans un environnement défavorable, le bébé en développement tente de compenser les déficiences qu'il subit. Cette compensation peut avoir des conséquences.
<b>Principe 6</b>	Les tentatives post-natales pour corriger les effets de la programmation peuvent avoir leurs propres conséquences non-désirées. Quand les conditions post-natales ne sont pas celles pour lesquelles le fœtus est préparé, des problèmes peuvent apparaître.
<b>Principe 7</b>	Les mécanismes cellulaires fœtaux sont souvent différents des processus adultes. Les fœtus réagissent différemment aux conditions délétères que les nouveaux-nés ou les adultes.
<b>Principe 8</b>	Les effets de la programmation peuvent se transmettre entre générations par des mécanismes n'impliquant pas nécessairement de changements génétiques.

#### **1.4 Mécanisme de régulation épigénétique sous tendant l'impact de la vie intra-utérine sur le futur cardiovasculaire du sujet**

Dans le cadre des mécanismes pouvant intervenir dans le développement des maladies cardiovasculaires, l'hypothèse de modification épigénétique peut être avancée. En effet, des influences environnementales précoces dans le développement pourraient entraîner des variations au niveau de l'ADN et ainsi affecter à long terme la survenue de maladies cardiovasculaires.

L'épigénétique regroupe les modifications pouvant survenir au niveau de l'ADN (méthylation de l'ADN) et au niveau des histones (modification de la compaction de la chromatine), sans modification de la séquence nucléotidique de l'ADN. La plus étudiée est la méthylation de l'ADN sur des résidus cytosine suivis d'une guanine: le dinucléotide CpG, souvent regroupé en îlots. Des études ont notamment montré que l'environnement périnatal pouvait influencer la mise en place ou le maintien de ses méthylations (Waterland 2009). Il paraît important de préciser qu'à l'inverse des mutations au sein même des séquences de l'ADN, qui sont irréversibles, ces modifications présentent un degré d'instabilité et peuvent donc être réversibles.

#### **1.5 Modèles animaux de programmation développementale**

Afin d'expliquer les mécanismes de ces études épidémiologiques, confirmés depuis par d'autres études dans plusieurs pays, ce concept a reçu le renfort des sciences biologiques expérimentales qui ont, à partir de modèles animaux, expliqué et démontré une relation de cause à effet entre des manipulations de l'environnement précoce et leurs conséquences sur le développement d'anomalies biologiques et de maladies à l'âge adulte.

Tout d'abord, les recherches en sciences fondamentales se sont développées autour de différents régimes nutritionnels. De nombreux modèles animaux ont été utilisés pour étudier la programmation développementale de l'hypertension, mettant en œuvre principalement des rongeurs, mais aussi des moutons, des porcs et des cochons d'Inde. Une majorité d'études ont utilisé un régime isocalorique réduit en protéines, un régime globalement restreint ou au contraire un régime de type cafeteria, mais des régimes réduits ou appauvris en fer ou en autre micronutriment ont également pu être utilisés (Lewis, Forhead et al. 2002, Ojeda, Grigore et al. 2008, Samuelsson, Matthews et al. 2008). La pression sanguine élevée chez les descendants a également été déclenchée par une administration anténatale de glucocorticoïdes, par de l'hypoxie, par une vascularisation altérée du placenta ou du diabète gestationnel (Alexander 2003, Nehiri, Duong Van Huyen et al. 2008). Par la suite d'autres modèles ont été utilisés pour reproduire d'autres situations délétères en période périnatale comme la prématurité en utilisant l'exposition à l'oxygène (O<sub>2</sub>) en période néonatale. Notre laboratoire a notamment démontré que l'exposition en période néonatale de jeunes rats à 80% d'O<sub>2</sub> entraînait chez le rat adulte d'importantes modifications au niveau vasculaire, comme l'apparition d'une élévation de la pression artérielle et diastolique, une dysfonction endothéliale et une rigidité artérielle. La programmation développementale peut enfin être modulée par le patrimoine génétique des animaux étudiés (Roghair and Aldape 2007).



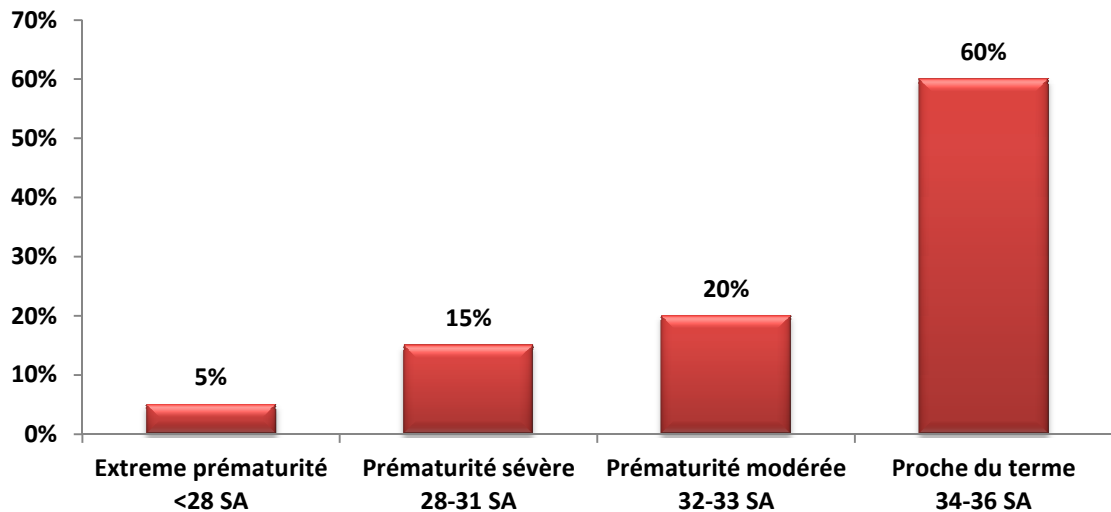
## **1.6 La prématurité**

### **1.6.1 Définition et prévalence**

Pendant de nombreuses années, la prématurité a été définie par un petit poids de naissance. Aujourd'hui, l'Organisation Mondiale de la Santé définit la prématurité comme un accouchement survenant avant 37 semaines révolues d'aménorrhée (SA). On distingue la très grande prématurité (accouchement avant 28 SA), la grande prématurité (entre 28 et 32 SA + 6 jours) et la prématurité modérée (de 33 à 36 SA+ 6 jours) (Goldenberg, Culhane et al. 2008). La figure 1 présente le répartition de chaque type de prématurité. Cette définition souligne donc l'importance de l'âge gestationnel (AG) et succède donc à celle fondée sur le poids de naissance de l'enfant qui ne permettait pas de distinguer la prématurité d'un problème de croissance in utero. Afin de dissocier l'effet de la prématurité de celui des autres causes de faibles poids de naissance (notamment une restriction de croissance intra-utérine), il sera important de se tourner vers des études évaluant l'effet pur de l'AG et non vers des études prenant en compte les poids de naissances sans indication d'AG.

La prévalence de la prématurité est en constante augmentation dans le monde, elle est aujourd'hui de 12% aux USA (Goldenberg, Culhane et al. 2008), 8% au Canada (System. 2003), et de 5 à 10% en Europe avec un taux de 6% en France (Buitendijk, Zeitlin et al. 2003).

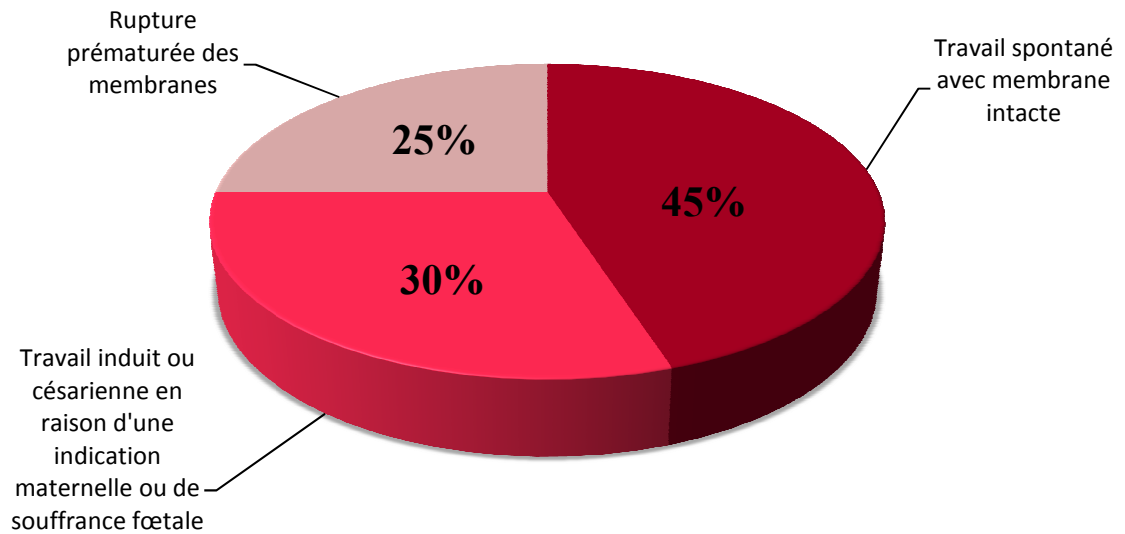
**Figure 1 : Répartition de la prématurité en fonction de l'AG, d'après R. L. Goldenberg**



#### 1.6.2 Facteurs de risques et causes de la prématurité

Il convient tout d'abord de distinguer les termes « facteurs de risques » et « causes ». Un facteur de risque augmente le risque d'avoir un enfant prématuré mais n'est pas forcément le facteur causal de l'accouchement prématuré. Par exemple, ce n'est pas parce qu'une mère présente un facteur de risque qu'elle accouchera obligatoirement de façon prématurée. Les causes de la prématurité peuvent être soit l'induction d'un travail spontané, regroupant le travail prématuré spontané avec membrane intacte (45%) ou la rupture prématurée des membranes (25%), souvent associés à une infection d'origine maternelle ; soit un travail prématuré induit ou une césarienne en raison d'une indication maternelle (prééclampsie) ou de souffrance fœtale (30%) (Goldenberg, Culhane et al. 2008).

**Figure 2 : Répartition des causes de la prématurité, d'après R. L. Goldenberg**



On distinguera ensuite :

- les facteurs de risques obstétricaux de la prématurité : grossesses multiples, col inférieur à 25 mm asymptomatique, antécédents de naissance prématurée, stress, tabac, syndrome dépressif, alcool, drogues, surdistension utérine, hémorragie ou ischémie utéro-placentaire, processus d'inflammation, changement hormonal, infection intra-utérine,
- les facteurs de risques fœtaux: anomalie congénitale (ex. défaut tube neural), poly ou oligohydroamnios, infection fœtale.

### 1.6.3 Conséquences de la prématurité

Pendant le dernier trimestre de la grossesse la plupart des organes acquièrent la maturité nécessaire permettant à l'individu de s'adapter à la vie extra-utérine. Toute naissance prématurée comporte donc le risque que certaines fonctions contrôlant

l'homéostasie et les adaptations nécessaires au nouvel environnement ne s'établissent pas correctement, reprenant ainsi la notion du programming vu dans le paragraphe 1.3.

### **1.7 Programmation développementale de l'hypertension chez le prématuré**

Plusieurs études démontrent que de l'enfance jusqu'à l'âge adulte, les prématurés ont des valeurs de pression artérielle supérieures à celles de contrôles nés à terme (Irving, Belton et al. 2000, Kistner, Jacobson et al. 2002, Bonamy, Bendito et al. 2005, Hack 2006, Bonamy, Martin et al. 2007, Bonamy, Kallen et al. 2012) et ce de manière inversement proportionnelle à l'AG (Siewert-Delle and Ljungman 1998). De plus, une récente méta-analyse (de Jong, Monuteaux et al. 2012) met en évidence une augmentation de la pression artérielle systolique (PAS) de 2.5 mm Hg (95% IC : 2.6-5.0 mm Hg). Notre laboratoire a également démontré une augmentation de l'incidence d'hypertension artérielle (HTA) chez des femmes nées prématurément (Boivin, Luo et al. 2012). Enfin il est intéressant de noter que l'impact de la prématurité semble indépendant du retard de croissance intra-utérin (RCIU) (Kistner, Celsi et al. 2000, Mikkola, Leipala et al. 2007).

Ainsi une naissance prématurée peut être associée à long terme à une élévation de la tension artérielle mais également à des modifications de structure et de fonction cardiovasculaire (Cheung, Wong et al. 2004, Tauzin, Risso et al. 2005, Bassareo, Fanos et al. 2010, Ligi, Grandvullemin et al. 2010), marqueurs indépendants d'hypertension et d'événements cardiovasculaires (Gokce, Keaney et al. 2002, Redheuil, Yu et al. 2010). En revanche à ce jour, il y a très peu d'études qui ont examiné des sujets à long terme devenus adultes. De plus, ces études ne différencient pas les degrés de prématurité, en particulier la

prématurité extrême. A l'aide de la cohorte utilisé dans ce projet, nous avons tenté de caractériser davantage le profil vasculaire de jeunes adultes nés très prématurément.

## **1.8 Mécanisme du stress oxydant chez le prématuré**

### 1.8.1 Rappel sur le stress oxydant vasculaire

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre la production de radicaux libres et la défense anti-oxydante (Sies 1991). Avant d'aborder les conséquences vasculaires du stress oxydant dans la prématurité, les principales enzymes responsables du stress oxydant et la notion de statut rédox seront brièvement présentées dans la section suivante.

#### *1.8.1.1 Sources principales des molécules oxydantes vasculaires*

Les différentes espèces réactives de l'oxygène (ERO) peuvent être produites dans plusieurs types cellulaires de la paroi vasculaire comme les cellules endothéliales, les macrophages, et les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), principalement quand celles-ci sont en état dit d'activation. Le déséquilibre entre production et neutralisation des ERO provoque un stress oxydant pouvant altérer les lipides, les protéines ou encore l'acide désoxyribonucléique (ADN) des cellules vasculaires.

La production des ERO au sein des différentes cellules de la paroi vasculaire se fait continuellement à l'aide d'enzymes. Une production anormalement élevée d'ERO au sein du tissu vasculaire, intervenant sous l'effet de différents stimuli, va alors générer un stress oxydant cellulaire, à l'origine de l'état d'activation des cellules impliquées dans la formation et la progression de maladies cardiovasculaires.

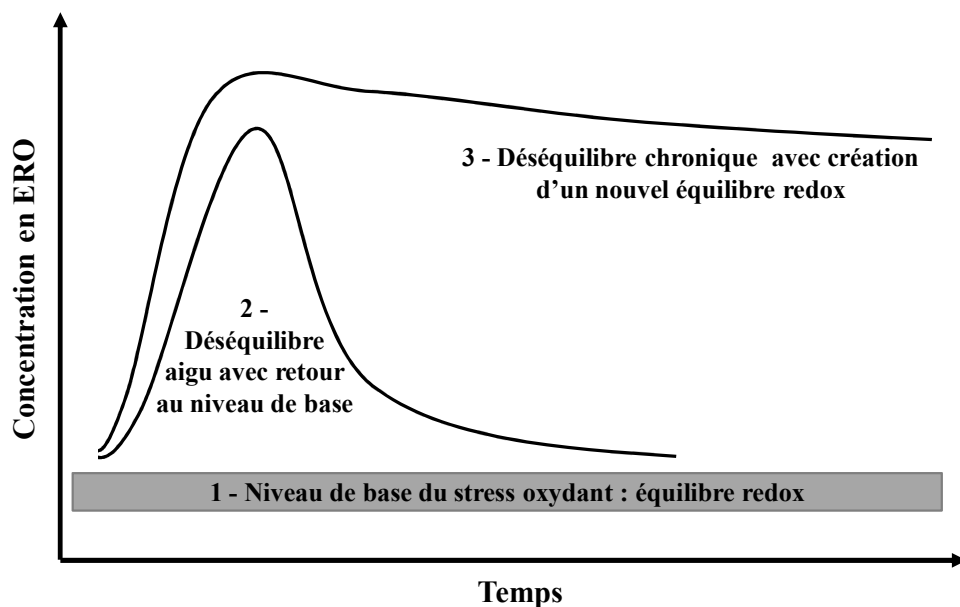
Le stress oxydant provoque un déséquilibre rédox responsable d'une modification des fonctions cellulaires via une modulation des voies de signalisation intracellulaires rédox-sensibles. Parmi les stimuli de la production d'ERO, on peut citer les facteurs activant les nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NAD(P)H) oxydases des cellules vasculaires ou la chaîne respiratoire mitochondriale, mais aussi les facteurs diminuant la biodisponibilité du monoxyde d'azote  $\bullet\text{NO}$  (formation de peroxynitrite ONOO- par réaction avec l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , piégeage du  $\bullet\text{NO}$  par les produits finaux de glycation avancée (AGE), ou découplage de la NO-synthase endothéliale, favorisant la production d'anion superoxide au détriment du NO). On notera que la diminution de la biodisponibilité du NO est responsable d'un dysfonctionnement endothélial. La modulation des voies de signalisation rédox-sensibles favorise la libération de facteurs pro-inflammatoires ou de facteurs de prolifération cellulaire, et induit des processus d'apoptose ou de nécrose, participant ainsi à l'évolution des complications cardiovasculaires.

#### *1.8.1.2 Equilibre rédox*

En situation physiologique, grâce à la présence d'antioxydants, il existe cependant un équilibre subtil entre la production et l'élimination des ERO. Les cellules vasculaires sont dans un état rédox basal. Cet équilibre pouvant néanmoins être rompu sous l'effet de certains stimuli pathologiques endogènes (hyper-LDLémie, hypertension, diabète...) ou exogènes (polluants environnementaux, tabagisme...) (Peynet, Beaudoux et al. 2005), conduisant à un stress oxydant délétère pour les constituants moléculaires et cellulaires de la paroi artérielle, et entraînant des dysfonctionnements. Ce stress peut être de courte durée

et, par les systèmes antioxydants, limité, avec un retour rapide à un état rédox physiologique, ou plus prolongé, avec finalement création d'un nouvel équilibre rédox de niveau oxydant plus élevé et permanent, comme celui que l'on peut retrouver dans des pathologies chroniques (Figure 3).

**Figure 3 : Modification de l'équilibre rédox cellulaire par la production aiguë ou chronique des ERO, adapté de (Droge 2002).**



### 1.8.2 Lien avec la prématurité

La situation de prématurité est susceptible de générer des radicaux libres allant entraîner un stress oxydant, qui est un facteur connu pour potentialiser les maladies cardiovasculaires (Halliwell 1993).

Les mécanismes par lesquels un environnement périnatal délétère peut modifier de façon permanente le développement et le fonctionnement de l'organisme, menant à l'âge adulte à des maladies chroniques, sont encore mal compris. La compréhension globale de

ce phénomène à savoir le fait qu'un évènement délétère, ici le stress oxydant en période néonatale, engendre des conséquences cardiovasculaires à l'âge adulte fait intervenir la plasticité du développement et une réponse adaptative prédictive qui se révèle inappropriée à long terme. Ainsi la réponse du fœtus au stress le conduirait à mettre en place des caractéristiques adaptatives visant à préserver son intégrité à court terme, mais inadaptées à long terme (Gluckman and Hanson 2006).

Plusieurs mécanismes ont cependant été proposés et continuent d'être explorés. En présence ou non d'un RCIU, la naissance prématurée traduit une perturbation du milieu intra-utérin souvent de nature oxydante (Saugstad 2005) et /ou inflammatoire, comme la pré-éclampsie (Gupta, Agarwal et al. 2005), le diabète gestationnel (Biri, Onan et al. 2006), ou l'inflammation (e.g. rupture prématurée des membranes) (Woods 2001). C'est également durant le dernier trimestre de grossesse que les taux d'enzymes antioxydantes augmentent. Un nouveau-né prématuré est donc relativement déficient en antioxydants quand il est confronté à l'augmentation massive de sa pression partielle en oxygène ( $pO_2$ ) à la naissance. De plus, il a été montré en période néonatale chez des prématurés des taux diminués et une capacité moindre d'induction d'enzymes antioxydantes (Saik, Hsieh et al. 1982) (Georgeson, Szony et al. 2002) ainsi que des indices de stress oxydant élevés (O'Donovan and Fernandes 2004, Saugstad 2005). En plus de l' $O_2$ , les prématurés sont également exposés à plusieurs autres sources d'espèces réactives causant du stress oxydant comme la nutrition parentérale (source de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )) (Kleiber, Chessex et al. 2010), des médicaments (Lavoie, Belanger et al. 1997), et des rayons X (Lai and Bearer 2008).



### 1.8.3 Rôle du glutathion

Afin de maintenir l'équilibre rédox et donc l'homéostasie cellulaire, les ERO sont éliminés par un système d'éléments comme les vitamines (vitamine E et beta-carotène), des enzymes (superoxyde dismutase, catalase) et des molécules comme le glutathion.

Le glutathion est une molécule clé de la défense antioxydante, qui existe dans un équilibre dynamique entre ses formes oxydée : le **GSSG** et réduite : le **GSH** via ses enzymes réductase et peroxidase. Le ratio GSH/GSSG apparait donc comme un important indicateur de l'environnement rédox (Kemp, Go et al. 2008) régulant plusieurs processus biochimiques dont la prolifération et la survie cellulaire (Schafer and Buettner 2001). L'altération du potentiel rédox entraîne une production cellulaire accrue d'ERO, via à une altération de la fonction mitochondriale, menant à un « épuisement » cellulaire et ultimement à l'arrêt de prolifération et réduction de la survie (Alexeyev, Ledoux et al. 2004, Wallace 2005).

Dans une étude réalisée dans cellules de sécrétions bronchiques de nouveau-né prématuré, le niveau de glutathion est corrélé positivement à l'AG (Lavoie and Chessex 1997), ainsi que dans une étude utilisant du sang de cordon (Kuster, Tea et al. 2011). Pendant la période néonatale, une autre étude montre une corrélation entre les taux de glutathion, un potentiel rédox davantage oxydé et la sévérité de la bronchodysplasie chez des  $26 \pm 1$  SA (Chessex, Watson et al. 2010). Un déséquilibre GSH/GSSG contribue ainsi à la perpétuation du potentiel rédox oxydé, aux changements du métabolisme cellulaire, à une susceptibilité au stress oxydant et ultimement aux dysfonctions (Jones 2008, Ballatori, Krance et al. 2009).

Des études animales supportent l'hypothèse qu'un stress oxydant en période fœtale et/ou néonatale peut induire des conséquences à long terme sur l'équilibre oxydant-antioxydant. Des travaux précédents du laboratoire ont montré que des rats adultes exposés à un stress hyperoxique en période néonatale présentent une augmentation de la production vasculaire de superoxyde, de malondialdéhyde circulant (MDA, indice de peroxydation lipidique), de GSSG ainsi qu'un potentiel rédox davantage oxydé (Yzydorczyk 2009). Inversement, nous avons également démontré que la supplémentation en antioxydant de la rate nourrie avec une diète faible en protéines prévient la réduction du glutathion, l'hypertension et la dysfonction vasculaire dans sa descendance (Cambonie, Comte et al. 2007).

De plus, il est maintenant reconnu que le statut rédox oxydé et le stress oxydant sont des mécanismes favorisant le maintien voire le développement de maladies chroniques comme l'hypertension et les maladies cardiovasculaires (Berg and Scherer 2005). Ni le potentiel rédox ni la présence d'indices de stress oxydant n'ont été rapportés chez des prématurés au-delà de la période néonatale, mais les enfants nés avec un RCIU présentent une augmentation des marqueurs de peroxydation lipidique et de stress oxydant (MDA et diminution de Vitamine E) (Franco, Kawamoto et al. 2007, Mohn, Chiavaroli et al. 2007).

## **2. La sénescence cellulaire**

Le processus de sénescence cellulaire a été décrit par Hayflick et Moorhead en 1961 dans une étude dans laquelle ils observaient que des fibroblastes humains étaient capables d'entrer dans un état irréversible d'arrêt de croissance après plusieurs passages en culture cellulaire. Cet état n'était pas observé dans les cellules cancéreuses, qui proliféreraient perpétuellement (Hayflick and Moorhead 1961). Leurs hypothèses étaient l'existence de facteurs cellulaires qui disparaissaient lors des divisions cellulaires. La sénescence cellulaire peut donc être vue comme un système de défense évitant la multiplication anarchique et incontrôlée caractéristique des cellules immortalisées et cancéreuses. Il apparaît alors une dualité entre la sénescence et l'apoptose, phénomène de mort cellulaire programmée.

### **2.1 Caractéristique des cellules sénescents**

#### **2.1.1 Changements morphologiques :**

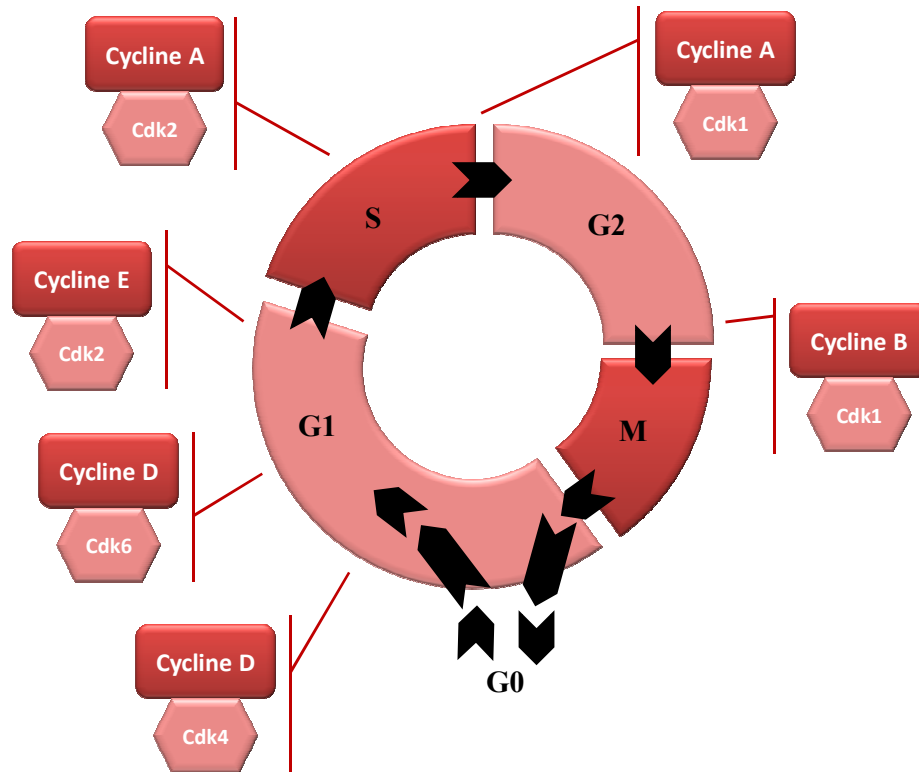
Les cellules entrant en sénescence cessent de répondre aux stimuli mitogènes et subissent de profonds changements au niveau de la structure de la chromatine et de l'expression génique. De plus en condition de culture (*in vitro*) leur morphologie est affectée, elles deviennent plus étalées et présentent un noyau plus large, leur vacuole est augmentée et leur cytoplasme a une granularité augmentée (Ben-Porath and Weinberg 2005). Il a été rapporté que des modifications du cytosquelette sont à l'origine de cette morphologie caractéristique (Kelley, Trotter et al. 1980).

## 2.1.2 Croissance cellulaire

### 2.1.2.1 *Rappel sur le cycle cellulaire :*

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases (Collins and Garrett 2005). Durant deux de ces phases, les cellules vont soit répliquer leur ADN (phase S) soit effectuer une division cellulaire (phase M). Les deux autres phases G1 et G2 s'intercalent entre ces deux périodes et sont des phases de latence où les cellules se préparent à la réalisation de la phase S et M respectivement (Figure 4). Quand la prolifération cesse, les cellules sortent du cycle cellulaire pour rentrer en phase G0, un état de non division cellulaire appelé l'état de quiescence cellulaire (Canepa, Scassa et al. 2007). La progression au long du cycle cellulaire est assurée par des points de contrôle appelés *cyclin dependent kinases* (CDK) (Collins and Garrett 2005) vérifiant que la phase a été correctement complétée avant d'entamer la suivante (Figure 4).

**Figure 4 : Les quatre phases du cycle cellulaire et la phase G0, et interventions des différents complexes Cycline / CDK au cours du cycle cellulaire**



### 2.1.2.2 Arrêt de croissance cellulaire

Une des principales caractéristiques des cellules sénescents est une incapacité à progresser à travers le cycle cellulaire. Les cellules sénescents restent métaboliquement actives mais arrêtent leur croissance cellulaire avec un contenu en ADN caractéristique de la phase G1. Elles n'initient donc pas la réplication de l'ADN en dépit de conditions adéquates de croissance. Cette arrêt est principalement causé -et caractérisé- par l'expression de protéines inhibitrices du cycle cellulaire. Au contraire de l'état de quiescence, l'arrêt de croissance cellulaire chez les cellules sénescents est permanent car elles ne peuvent être stimulées par des facteurs mitogènes.

### 2.1.3 Expression génique altérée : inhibiteurs du cycle cellulaire

Les cellules sénescents subissent de profonds changements au niveau de l'expression génique et notamment au niveau des inhibiteurs du cycle cellulaire, tels que les protéines 16, 53, 21 et la protéine du rétinoblastome (respectivement p16, p53, p21 et pRb). Plusieurs marqueurs ont été identifiés dans les cellules sénescents *in vitro* et *in vivo*. Cependant il n'y pas de marqueurs exclusifs à l'état de sénescence et ceux-ci peuvent notamment être partagés avec l'apoptose ou encore l'état de quiescence. Il sera alors important de présenter plusieurs marqueurs simultanés de sénescence, comme la détection de l'activation de la voie p53/p21 par exemple, avant de conclure à une sénescence cellulaire ou tissulaire.

#### 2.1.3.1 $p16^{\text{Ink4a}}$ biomarqueur et effecteur du vieillissement cellulaire:

##### a) Découverte et localisation du gène de la protéine p16

$p16^{\text{Ink4a}}$ , également appelé *cyclin dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A) ou *multiple tumor suppressor 1* (MTS-1), est encodée par le gène CDKN2A localisé sur le chromosome 9p21 chez l'humain. Ce dernier a été identifié en 1994 par Kamb comme un suppresseur de tumeur et encode deux protéines : la protéine  $p16^{\text{Ink4a}}$  et la protéine  $p14^{\text{ARF}}$  (Kamb, Gruis et al. 1994).

##### b) Fonctions de la protéine p16

La fonction de  $p16^{\text{Ink4a}}$  est d'inhiber la progression du cycle cellulaire (*cyclin dependant kinase inhibitor* : CDKI) en se liant aux cyclin dependent kinases 4 et 6 (CDK4 /6) inhibant l'interaction avec la cycline D (figure 4). La transition de la phase G1 à

S n'est donc pas réalisée. Le cycle cellulaire est ainsi stoppé. Les cellules sont alors dans un état non prolifératif.

### c) Rôle de la protéine p16 dans la sénescence

Krishnamurthy et al ont notamment montré que l'expression de p16<sup>Ink4a</sup> est augmentée dans la plupart des tissus chez les rongeurs à un âge avancé, en faisant ainsi un marqueur fiable de vieillissement chez les mammifères (Krishnamurthy, Torrice et al. 2004). Plus précisément, au niveau vasculaire, d'autres travaux ont également montré l'augmentation de l'expression de p16<sup>Ink4a</sup>, traduisant aussi la présence de cette protéine dans le vieillissement cellulaire au niveau de cellules musculaires lisses vasculaires (Rodriguez-Menocal, Pham et al. 2010).

Plus proche de notre modèle, il est également intéressant de noter que p16<sup>Ink4a</sup> est aussi significativement augmentée dans des modèles murins de vieillissement prématuré (vieillissement induit par un stress) (Sun, Lee et al. 2004), et que l'expression de p16<sup>Ink4a</sup> corrèle avec une prolifération altérée des cellules souches hématopoïétiques (Lewis, Chinswangwatanakul et al. 2001, Meng, Wang et al. 2003). Ce dernier point souligne également le fait que p16<sup>Ink4a</sup> peut être un effecteur du vieillissement en plus d'être un biomarqueur, en inhibant le renouvellement des cellules souches.

### 2.1.3.2 p53

#### a) Découverte et localisation du gène de la protéine p53

La protéine p53 a été identifiée par plusieurs groupes en 1979 comme interagissant avec l'antigène T du virus simien 40 (SV40) qui est un virus à ADN capable d'induire la

transformation tumorale des cellules infectées (Kress, May et al. 1979, Lane and Crawford 1979, Linzer and Levine 1979, Melero, Stitt et al. 1979). Le gène de p53 humain est localisé sur le bras court du chromosome 17 en 17p13.1. La protéine p53 code pour une protéine nucléaire de 53 kDa. Le domaine central (de l'acide aminé 102 au 292) est un domaine de *DNA-binding* et joue un rôle important dans la fonction de transcription. C'est le domaine de liaison privilégié des protéines et notamment celui de la protéine cellulaire appelée le suppresseur de tumeur p53 se liant à la protéine 1 (53BP1), dont il sera question dans le paragraphe 2.2.2.2.

#### b) Fonctions de la protéine p53

p53 est un facteur de transcription régulant l'expression de plusieurs gènes permettant de moduler la réponse p53 (Vousden and Prives 2009). L'activation de la transcription de CDKN1A/p21 est très sensible à de très faibles élévations de p53 et bloque le cycle cellulaire. Un arrêt prolongé du cycle activera alors la sénescence cellulaire. Ce mécanisme serait par ailleurs un des moyens d'élimination des cellules tumorales (Vousden and Prives 2009). Cependant, il apparaît que la réponse apoptotique n'est pas la seule possibilité de p53 pour cette activité suppresseur de tumeur. Par sa capacité à arrêter la prolifération cellulaire en bloquant le cycle et en activant la mort par apoptose, p53 est un gène suppresseur de tumeur. Il est d'ailleurs activé par différents stress cellulaires rencontrés lors de la progression tumorale tels que les dommages à l'ADN et l'hypoxie.



### c) Rôle de la protéine p53 dans la sénescence

Selon la situation, l'activation de p53 conduit soit à la mort cellulaire par apoptose, soit à l'entrée en sénescence. Dans le cas de l'apoptose, le rôle de p53 est d'induire l'activation transcriptionnelle de la protéine pro-apoptotique Bcl-2-associated X protein (Bax) (Miyashita and Reed 1995). Dans le cas de la sénescence, p53 active l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 (el-Deiry, Tokino et al. 1993). *In vitro*, une étude a montré que dans des fibroblastes infectés par le virus du papillomavirus humain (HPV) ou l'antigène T du SV40, l'inactivation de p53 empêchait l'entrée en sénescence (Shay, Pereira-Smith et al. 1991). De plus, une autre étude a montré que la restauration conditionnelle de l'activité de p53 dans des cellules p53-*null* entraînait un arrêt du cycle cellulaire (Baker, Markowitz et al. 1990, Michalovitz, Halevy et al. 1990). *In vivo*, il a également été montré, dans plusieurs études, qu'une activité trop importante de p53 pouvait induire un vieillissement prématuré chez la souris dans de multiples tissus (Artandi, Chang et al. 2000, Tyner, Venkatachalam et al. 2002).

#### 2.1.3.3 p21

##### a) Découverte et localisation du gène de la protéine p21

La protéine p21, également appelée :

- *Cyclin dependent kinase inhibitor 1* (CDK11),
- *CDK interacting protein 1* (CIP1),
- *Wildtype p53-activated fragment 1* (WAF1),
- *Senescent cell-derived inhibitor 1* (SDI1),

est encodée par le gène CIP1/WAF1/SDI1, localisé sur le chromosome 6p21.2 chez l'humain. Elle a été identifiée en 1993 dans deux articles publiés dans la même édition du journal *Cell*. Harper *et al.* ont identifié la protéine p21/CIP1 avec un double-hybride chez la levure (Harper, Adami et al. 1993). Le gène WAF1 a été parallèlement identifié par hybridation soustractive entre des cellules de glioblastome exprimant soit le gène TP53 sauvage, soit le gène muté, et traitées avec de la dexaméthasone pour activer p53 (el-Deiry, Tokino et al. 1993).

#### b) Fonctions de la protéine p21

p21 interagit *in vitro* avec les cyclines A, D1, E et la *cyclin dependent kinase 2* (CDK2). p21 est induit spécifiquement après l'expression de la protéine p53 sauvage et cette surexpression est liée à une inhibition de la croissance cellulaire.

#### c) Rôle de la protéine p21 dans la sénescence

p21 a été pour la première fois associée à la sénescence dans des fibroblastes sénescents comme un inhibiteur de la synthèse d'ADN. Dans ces cellules sénescents, p21 était surexprimée de manière permanente tandis que son expression était transitoire dans les cellules quiescentes (Noda, Ning et al. 1994). Ainsi, p21 a un rôle dans l'irréversibilité de la sénescence. Une autre étude a montré que son inactivation entraînait un retard de sénescence et permettait donc une augmentation de la durée de vie des fibroblastes en culture (Brown, Wei et al. 1997).

p21 se lie avec CDK2, ce qui empêche la formation du complexe Cycline E-CDK2 (figure 4) (Harper, Adami et al. 1993). P21 se lie aussi à CDK4. En l'absence de cycline,

les CDK n'exercent pas leur activité kinase. Ainsi, de par sa spécificité d'interaction avec CDK2 et CDK4, p21 est un inhibiteur spécifique de la transition G1-S (Figure 4). Cela explique le fait que les cellules qui entrent en sénescence s'accumulent principalement en phase G1 du cycle cellulaire.

#### 2.1.3.4 *pRb*

##### a) Découverte et localisation du gène de la protéine pRb

La *Retinoblastoma Protein* (pRb), également appelée RB ou RB1, est encodée par le gène RB1 localisé sur le chromosome 13q14 chez l'humain.

##### b) Mécanismes d'action de la protéine pRb

pRb est un régulateur négatif du cycle cellulaire. L'inhibition des complexes cycline/CDK par p21 a pour conséquence l'hypophosphorylation de la protéine pRb (Stein, Beeson et al. 1990) (Figure 4). Afin de permettre la progression des cellules en phase S du cycle cellulaire, pRb est inactivée par phosphorylation, empêchant ainsi son interaction avec le facteur de transcription *E2F transcription factor 1* (E2F1). E2F1 se lie alors aux cyclines D1 et E (Ohtani, DeGregori et al. 1995).

##### c) Rôle de la protéine pRb dans la sénescence

A l'inverse, en situation de sénescence, la voie p53/p21 sera activée et pRb est hypophosphorylée. Une augmentation de l'expression de pRb peut également traduire un état de sénescence au niveau vasculaire, comme il a été montré précédemment par immunohistochimie sur des aortes de rats hypertendus (Adijiang, Higuchi et al. 2010).

E2F1 se lie à pRb et ne peut ainsi activer les cyclines D1 et E. Le complexe pRb-E2F1 forme donc un répresseur transcriptionnel. Les protéines normalement exprimées lors de la transition G1/S ne le sont pas, le cycle cellulaire ne peut donc progresser (Zhang, Postigo et al. 1999).

Comme pour p53, le rôle de pRb dans la sénescence avait été mis en évidence à partir d'expériences impliquant l'antigène T de SV40, qui interagissait avec pRb (Shay, Pereira-Smith et al. 1991). Une autre étude a montré que la délétion du gène de pRb empêchait l'entrée en sénescence (Wei, Herbig et al. 2003).

#### 2.1.4 Résistance à l'apoptose

L'apoptose est un phénomène permettant de contrôler la destruction des constituants cellulaires (Ellis, Yuan et al. 1991). Comme la sénescence, l'apoptose est une réponse extrême à un stress et est un mécanisme suppresseur de tumeur (Green and Evan 2002). Cependant, tandis que la sénescence empêche la croissance des cellules endommagées ou stressées, l'apoptose les élimine. La plupart des cellules sénescents acquièrent des résistances aux signaux apoptotiques. La résistance à l'apoptose explique donc pourquoi les cellules sénescents sont si stables en culture et également pourquoi on assiste à une augmentation du nombre de cellules sénescents avec l'âge. Il n'est cependant pas encore clairement défini pourquoi une cellule choisira de rentrer soit en sénescence soit en apoptose et de récentes recherches indiquent que le type cellulaire pourrait influencer ainsi que la nature du stress (Seluanov, Gorbunova et al. 2001, Rebbaa, Zheng et al. 2003). Enfin, il sera important de noter que les systèmes de régulation des deux voies communiquent via le suppresseur de tumeur p53 (Seluanov, Gorbunova et al. 2001).

### 2.1.5 Augmentation de l'activité de la Senescence-associated $\beta$ -galactosidase

Un autre marqueur classiquement retrouvé est la Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) (Dimri, Lee et al. 1995). Les cellules sénescents présentent une augmentation en nombre et en volume des lysosomes (Lee, Han et al. 2006) qui sont des vésicules cytoplasmiques contenant une réserve d'hydrolases acides actives à un pH compris entre 3,5 et 5, et capables de dégrader les différents constituants cellulaires : nucléases, protéases, et lipases. La  $\beta$ -galactosidase est naturellement présente dans les lysosomes. L'activité optimale de cette enzyme se fait à pH 4, mais il a été proposé qu'une activité résiduelle existait à pH 6. Du fait de l'augmentation de la quantité de lysosomes, donc de  $\beta$ -galactosidase, cette activité résiduelle devient détectable dans les cellules sénescents. Ce marqueur est détectable par histochimie dans la plupart des cellules sénescents par un test enzymatique qui utilise du X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside), substrat de la  $\beta$ -galactosidase apparaissant bleu lorsqu'il est clivé (Dimri, Lee et al. 1995, Itahana, Campisi et al. 2007). Ainsi à pH 6, seules les cellules sénescents montrent une coloration bleue. Cependant, cette activité peut également être induite par une autre forme de stress comme une confluence prolongée en culture cellulaire (inhibition de contact) ou avec une faible concentration de sérum (Severino, Allen et al. 2000, Yang and Hu 2005). Néanmoins, il s'agit encore d'une méthode très largement acceptée et efficace pour détecter la présence de cellules sénescents dans une population cellulaire *in vitro* et *in vivo*.

## **2.2 Principaux mécanismes de déclenchement du programme de sénescence cellulaire**

### **2.2.1 Stress oxydant et sénescence cellulaire**

Un inducteur important de sénescence cellulaire est l'accumulation d'ERO (Matheu, Maraver et al. 2008). Quand les fibroblastes poussent dans un environnement riche en O<sub>2</sub> (supérieur à 50% O<sub>2</sub>), ces derniers subissent une sénescence prématurée (Chen, Fischer et al. 1995, Ohtani, Yamakoshi et al. 2004). A l'inverse, quand ces cellules poussent dans un environnement faible en O<sub>2</sub> (3% O<sub>2</sub>), elles ont une durée de vie augmentée. L'exposition de fibroblastes à une dose de 200µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant deux heures provoque l'entrée en sénescence prématurée (Chen and Ames 1994). De la même manière, quand les enzymes destructrices des ERO, telles que la superoxide dismutase (SOD), sont inhibées dans des fibroblastes humains, la concentration d'ERO intracellulaire augmente et de la sénescence prématurée est observée. Au niveau moléculaire, il a été montré que p53, p21 et la forme hypophosphorylée de pRb s'accumulent lors de la sénescence induite par un stress oxydant (Chen, Bartholomew et al. 1998).

Les ERO causent des dommages aux composants cellulaires via l'oxydation de l'ADN, des protéines et des lipides, mais ils peuvent aussi agir en tant que messagers secondaires directs influençant des voies de signalisation spécifiques (Sitte, Merker et al. 2000, Forman, Maiorino et al. 2010). Dans une population de fibroblastes humains pré-sénescents, la réduction de la concentration en O<sub>2</sub> (situation d'hypoxie sévère associée à une augmentation des EROs) ne réduit pas la proportion de cellules exprimant la protéine p16 mais plutôt la proportion de cellules exprimant p21 (Itahana, Zou et al. 2003). Ceci suggère que le stress oxydant déclenche la sénescence via la voie p53/p21. Cela pourrait

s'expliquer en considérant que le stress oxydant induit des cassures simples au niveau de l'ADN, ce qui active la réponse aux dommages à l'ADN et induit de la sénescence via la voie de signalisation de p53. Cependant, d'autres études ont montré que p16 peut aussi être activée en réponse au stress oxydant par la p38-MAPK (Iwasa, Han et al. 2003).

Dans un contexte cardiovasculaire, il a été montré que l'exposition chronique au stress oxydant associée à des facteurs de risque cardiovasculaire pouvait accélérer la sénescence de cellules endothéliales vasculaires (Voghel, Thorin-Trescases et al. 2007). Dans cet article, il a été démontré que des cellules endothéliales d'artères mammaires internes de patients atteints de maladies sévères de l'artère coronaire présentaient des marqueurs de sénescence. Cette étude met donc en évidence que l'atteinte de plusieurs facteurs de risque des maladies cardiovasculaires engendre de la sénescence cellulaire. Cela pouvant avoir un impact sur le développement des maladies cardiovasculaires.

## 2.2.2 Dommages à l'ADN

### 2.2.2.1 *Relation avec les protéines inhibitrices du cycle cellulaire*

Les dommages à l'ADN induisent en conditions normales une cascade de réponses cellulaires qui activent les points de contrôle d'arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN. Dès 1983, une étude a montré qu'une exposition de fibroblastes aux rayons X entraînait une accumulation des cellules en phase G1 du cycle cellulaire (Nagasawa and Little 1983, Nagasawa, Latt et al. 1985). Les dommages directs à l'ADN causés par un stress (irradiation, O<sub>2</sub>) sont donc un autre mécanisme par lequel les cellules peuvent entrer en sénescence (Wahl and Carr 2001). Il a également été montré que la délétion de p53 prévenait l'arrêt en G1 après irradiation (Kastan, Onyekwere et al. 1991,

Kastan, Zhan et al. 1992, Kuerbitz, Plunkett et al. 1992). L'irradiation induit donc l'activation de p53. De plus, les rayons X provoquent l'accumulation de la cycline A, et les CDK nécessaires au passage en phase S sont inactivées (Dulic, Kaufmann et al. 1994). Enfin, pRb n'est plus phosphorylée. Toutefois, la réponse cellulaire à ce type de dommages est plus souvent la mort de la cellule ou un arrêt réversible du cycle cellulaire. La manière dont les cellules choisissent entre ces différentes réponses (arrêt de croissance réversible, sénescence, ou apoptose) n'est pas encore parfaitement connue. Il a été montré que la sénescence est généralement induite par de plus faibles niveaux de dommages que ceux menant à l'apoptose (Ben-Porath and Weinberg 2005). La sénescence en tant que conséquence de dommages à l'ADN peut être induite aussi bien par les voies p16 et p21 (Robles and Adami 1998).

#### 2.2.2.2 *Relation avec le suppresseur de tumeur p53 se liant à la protéine 1 : 53BP1*

De sévères dommages à l'ADN apparaissent à diverses endroits dans le génome et créent des cassures doubles brins causant dans la plupart des cellules un état de sénescence (Di Leonardo, Linke et al. 1994, Parrinello, Samper et al. 2003). Des mécanismes cellulaires de réparation de l'ADN sont alors activés, dont la protéine 53BP1. Le 53BP1 a été identifié chez la levure comme interagissant avec le domaine central se liant à l'ADN de p53 (Iwabuchi, Bartel et al. 1994). Il est encodé par le gène 53BP1, localisé sur le chromosome 15q15-21 et qui produit une protéine constituée de 1972 acides aminés. Le 53BP1 augmente la transcription dépendante de p53 (Iwabuchi, Li et al. 1998) et contient le motif BRCT qui a été retrouvé dans un grand nombre de protéines intervenant dans



différents aspects du contrôle du cycle cellulaire, de recombinaison et de réparation à l'ADN (Koonin, Altschul et al. 1996, Bork, Hofmann et al. 1997, Callebaut and Mornon 1997). La présence du domaine BRCT dans la protéine 53BP1 permet de conclure qu'elle joue un rôle dans la réponse au dommage à l'ADN. Le 53BP1 se relocalise rapidement au niveau de l'ADN pour former des foci nucléaires après l'exposition de la cellule à un stress (Anderson, Henderson et al. 2001, Adams and Carpenter 2006). Ces foci représentent les sites où il y a eu une cassure des doubles brins de l'ADN, car ils colocalisent avec d'autres marqueurs comme le  $\gamma$ H2AX ou le complexe MRN (Schultz, Chehab et al. 2000, Xia, Morales et al. 2001). Il a par exemple été montré que dans des cellules U2OS (lignée cellulaire provenant d'une patiente atteinte d'ostéosarcome qui est classiquement utilisée pour des études sur les inhibiteurs du cycle cellulaire) la présence des foci apparaissait environs 5 minutes après le stress et le nombre maximal de foci était atteint après 15-30 minutes (Schultz, Chehab et al. 2000).

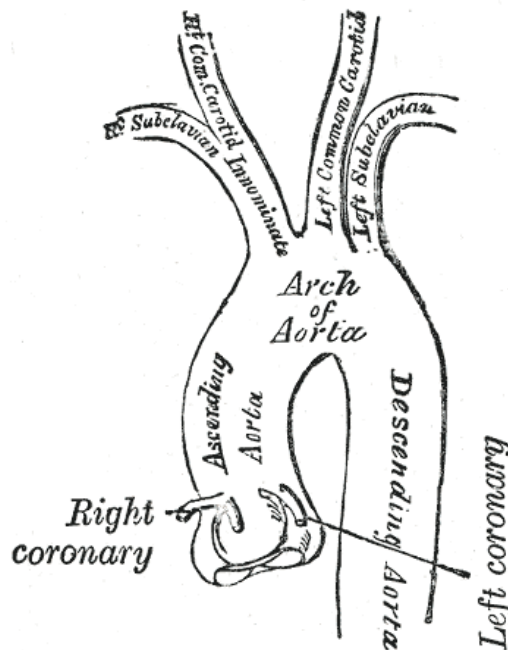
### 3. Effets du vieillissement précoce sur l'aorte

#### 3.1 Rappel sur l'aorte

##### 3.1.1 Anatomie

L'aorte est l'artère principale de l'organisme qui part du ventricule gauche du cœur, au niveau de la valve aortique. Après un court trajet ascendant, elle transite du thorax vers l'abdomen en donnant naissance à l'ensemble des collatérales artérielles du corps humain. Quatre segments aortiques sont habituellement décrits (Figure 5) : l'aorte thoracique ascendante (A), l'aorte thoracique horizontale (B), l'aorte thoracique descendante (C) et l'aorte abdominale (D). On notera qu'à la naissance de l'aorte ascendante, la racine aortique se trouve directement accolée au ventricule gauche. Au sein de la racine aortique sera retrouvé l'anneau aortique, dont la variation de diamètre influencera les calculs d'impédance utilisés pour les indices de rigidité, présenté dans le paragraphe 3.3.3.2. b.

Figure 5 : Anatomie de l'aorte



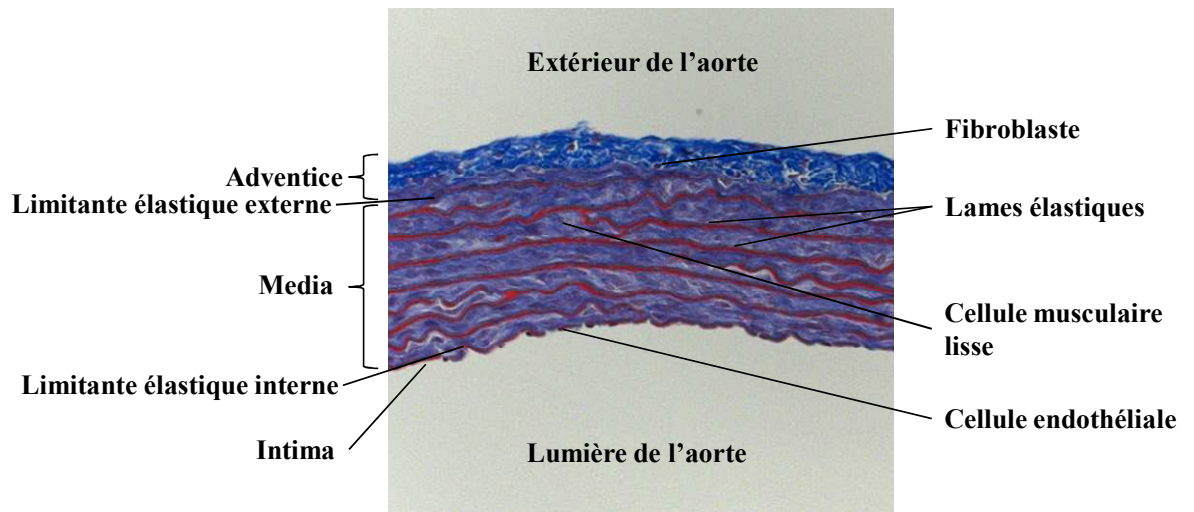
L'aorte est une artère élastique (ou de conductance). Les artères élastiques présentent une paroi dont la composition diffère de celle des autres artères et artérioles. Cette différenciation est le fait des conditions hémodynamiques auxquelles elles sont soumises.

### 3.1.2 Structure de la paroi artérielle

Afin d'appréhender au mieux la notion de rigidité artérielle, il paraît important de présenter les différents constituants et les mécanismes intervenant au sein de la paroi des vaisseaux. Il ne sera décrit ici que les concepts en rapport avec les artères de conduction (c'est-à-dire les gros troncs comme l'aorte), les vaisseaux de plus petit calibre ainsi que les veines ne seront pas abordés.

La paroi artérielle est constituée de trois tuniques morphologiquement distinctes disposées de manière concentrique. De la lumière du vaisseau à la périphérie on distingue : l'intima, la media et l'adventice, délimitées par deux lames élastiques interne et externe (figure 6). Chacune de ces tuniques est composée d'un type cellulaire particulier et d'une matrice extracellulaire (MEC) spécifique.

**Figure 6 : Section transversale d'aorte thoracique de rat Sprague-Dawley**



### 3.1.2.1 L'intima

L'intima représente la couche la plus interne de la paroi directement en contact avec le sang. Elle est constituée d'une couche monocellulaire de cellules endothéliales : l'endothélium, reposant sur une fine couche de tissu conjonctif appelée la lame basale. Cette dernière est particulièrement importante pour les artères élastiques puisqu'elle permet d'individualiser et donc de protéger l'endothélium des mouvements du reste de la paroi artérielle, en assurant ainsi l'intégrité. Quelque soit le diamètre du vaisseau concerné, l'endothélium ne présente toujours qu'une seule couche de cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales ont une forme caractéristique de losange et leur grand axe est orienté suivant l'écoulement sanguin. Cette orientation est déterminée par les forces de cisaillement appliquées à leurs surfaces.

### 3.1.2.2 *La média*

La media est la partie intermédiaire de la paroi artérielle qui est la plus épaisse. Elle est séparée de l'intima par la limite élastique interne et de l'adventice par la limite élastique externe (figure 6). Elle est constituée par l'empilement concentrique d'unités lamellaires de CMLV et d'une matrice de tissu conjonctif formée d'élastine, de collagène et de polysaccharides. Elle constitue la partie structurante de la paroi des vaisseaux et, de ce fait, est constituée de différentes fibres structurées en réseau stratifié et complexe où l'on peut distinguer :

- Les fibres d'élastine : présentées sous forme de lames élastiques concentriques et disposées en couches parallèles au sein de la média.
- Les fibres de collagène : disposées en boucles lâches quand la paroi n'est pas soumise à des forces d'étirement. Elles permettent de limiter la déformation du vaisseau lorsque celui-ci est soumis à une augmentation de pression. Les fibres de collagène jouent donc un rôle dans la rigidité artérielle.
- Les fibres musculaires lisses : très peu présentes dans les vaisseaux de conductance, permettent à la paroi vasculaire d'exercer sa fonction de tonus vasomoteur (dans le cas des vaisseaux de plus petit calibre).

Dans les gros vaisseaux, comme l'aorte, la média a essentiellement un rôle d'amortissement du flux. En effet le rôle de ce vaisseau est de transformer un flux pulsatile en flux continu, la matrice extra cellulaire, de part ses propriétés élastiques et l'état de contraction des CMLV, a un rôle de tampon vis-à-vis de l'écoulement du flux. Nous verrons dans le paragraphe 3.3.1 que ces propriétés d'amortissement peuvent être altérées dans le cas d'un vaisseau soumis au vieillissement.

#### a) Les CMLV des artères élastiques

Les CMLV sont des cellules allongées aux extrémités pointues (fusiformes) d'origine mésenchymateuse, retrouvées en grande quantité dans la paroi des artères élastiques. Leur diamètre varie de 2 à 5  $\mu\text{m}$ , pour des longueurs allant de 15 à 500  $\mu\text{m}$ . Elles sont mononuclées à la différence des cellules musculaires squelettiques, qui elles sont multinuclées.

#### b) Les CMLV au cours de l'angiogénèse

Pour plus de clarté, il conviendra de rappeler les définitions suivantes, d'après Carmeliet (Carmeliet 2000). La **vasculogénèse** se caractérise par la migration puis la différenciation de cellules souches embryonnaires, précurseurs de cellules endothéliales pour former des vaisseaux sanguins primitifs. La vasculogénèse se produit essentiellement pendant le développement embryonnaire. L'**angiogénèse** intervient après la vasculogénèse et se caractérise par la croissance et l'extension de l'arbre vasculaire à partir de vaisseaux préexistants pour former un réseau de type essentiellement capillaire. L'angiogénèse se produit aussi bien pendant le développement que pendant l'âge adulte dans des conditions physiologiques, telles que l'adaptation à l'exercice musculaire, qu'en pathologie lors des cancers, par exemple. Enfin l'**artériogénèse** se produit au niveau artériel et peut être considérée comme une étape ultérieure à l'angiogénèse. Elle se produit lors d'une augmentation des forces (shear stress) au sein de la paroi. Elle se traduit par un épaissement pariétal, une prolifération des CMLs pour former un réseau vasculaire mature. L'artériogénèse pouvant soit intervenir en condition physiologique (maturation de l'artériole en artère de plus gros calibre) ou pathologique (formation de collatérale).

Pendant l'angiogénèse, après disposition des futures cellules endothéliales, les CMLV, encore peu différenciées, se disposent de façon concentrique à leur périphérie. Entre ces différentes cellules, se forment des « GAP junctions » permettant la cohésion du tissu et assurant l'échange d'informations. Les CMLV prolifèrent ensuite de plus en plus et synthétisent l'ensemble des constituants formant la paroi vasculaire (élastine, collagènes, protéoglycanes, glycoprotéines, métalloprotéinases (MMPs), inhibiteurs tissulaires des metalloproteinases (TIMPs), etc...). Pendant le développement et l'angiogénèse, elles expriment un phénotype sécrétoire différent de celui rencontré chez les cellules matures et n'expriment pas le phénotype contractile (Owens, Kumar et al. 2004). Au fur et à mesure de la synthèse de la paroi vasculaire, les cellules s'engagent progressivement dans la voie les conduisant au phénotype contractile, pour atteindre, une fois matures et en situation physiologique normale, un taux de prolifération extrêmement faible (Owens 1995). Cependant, un grand nombre de ces cellules, phénotypiquement matures, garderont la possibilité de se redifférencier en cellules au phénotype sécrétoire avec un fort potentiel de prolifération. Cette plasticité interviendra par exemple en cas de réparation du tissu artériel après une plaie vasculaire ou une intervention chirurgicale. Elle pourra aussi être délétère dans certaines situations pathologiques comme dans l'HTA, l'athérosclérose ou encore l'hyperplasie néo-intimale (Schwartz, Campbell et al. 1986). Dans ces cas, en plus des modifications de phénotype et du fort potentiel de multiplication, les CMLV retrouvent la possibilité de migrer dans la paroi aortique du fait de la disparition des connections existantes entre elles et la MEC (cas de l'athérosclérose).

De plus, chez le rat spontanément hypertendu (SHR), afin d'expliquer l'augmentation de la masse des muscles lisses des aortes, Owens et al. ont montré qu'au

début de l'hypertension, les CMLs subissent de l'hypertrophie (augmentation de la taille des cellules) et non de l'hyperplasie (augmentation du nombre de cellules). Cette hypertrophie s'accompagnant également d'une augmentation de la ploïdie (hyperploïdie) (Owens and Schwartz 1982).

### c) Les CMLV matures

Une fois le phénotype sécrétoire acquis, les CMLV expriment dans leur cytoplasme, comme toutes cellules musculaires, des molécules d'actine et de myosine nécessaires à la contraction. *In vivo* et en culture, elles s'organisent en feuillets parallèles, séparés par les lames élastiques contenant des fibres de collagène, d'élastine ainsi que d'autres molécules matricielles. Elles sont séparées par la MEC et connectées entre elles via la fibronectine. Malgré un potentiel de prolifération qui persiste à l'état physiologique, le *turn-over* cellulaire au sein de la paroi aortique est lent. Cette faible régénération cellulaire est liée à la haute spécialisation de la cellule qui n'exprime plus que des molécules nécessaires à son activité contractile (chaîne lourde de myosine,  $\alpha$  actine, etc). Les CMLV à l'âge adulte et dans des conditions physiologiques n'ont donc plus qu'un rôle fonctionnel. C'est lors de l'angiogenèse et lors des processus pathologiques qu'elles redeviennent capables de proliférer.

#### 3.1.2.3 *L'adventice*

L'adventice représente la partie la plus externe du vaisseau. Son organisation est très semblable suivant les différents types de vaisseaux. Elle permet l'ancrage des vaisseaux dans les tissus avoisinants. Elle contient des fibroblastes, des cellules adipeuses,



un tissu conjonctif lâche formé de fibres de collagène et élastiques, mais aussi des vasa vasorum. Comme tout organe, les vaisseaux sont constitués de cellules devant recevoir de l'O<sub>2</sub> et des nutriments et rejeter les déchets. Les vasa vasorum, petits vaisseaux nourriciers des artères de gros diamètres permettent donc l'irrigation de la paroi des vaisseaux principaux.

### 3.1.3 Les différents types d'artères

Selon la proportion des constituants de la matrice, on peut distinguer deux types d'artères :

- les artères élastiques : représentées par les gros troncs comme l'aorte, et ses branches principales : les carotides, les artères iliaques. Elles possèdent une média riche en fibres élastiques assurant les propriétés de compliance artérielle ; les fibres d'élastines sont les principales responsables de cette caractéristique. Les artères élastiques ne possèdent pas de fonction vasomotrice. Elles sont également appelées artères de conductance.
- les artères musculaires : comprennent les coronaires, fémorales, brachiales... Elles sont dépourvues de fibres élastiques et ont une plus grande proportion de CMLVs que les artères de conduction. Elles possèdent essentiellement des propriétés vasomotrices. Elles sont également appelées artères de distribution.

### **3.2 Mécanismes cellulaires et moléculaires du vieillissement aortique : le remodelage vasculaire**

Les vaisseaux artériels, de part leur exposition directe au flux pulsé de la pompe cardiaque, supportent des modifications importantes au cours du temps. Au cours de la vie, il existe ainsi un phénomène normal de remodelage vasculaire lent, progressif et irréversible dû au vieillissement vasculaire. Ce processus se caractérise par un réarrangement des composants principaux de la paroi artérielle. Les fibres élastiques et l'accumulation de collagène induisent notamment une perte des propriétés vasomotrices des vaisseaux, mais surtout, et de façon directe, une perte des fonctions d'amortissement se traduisant par une augmentation de la rigidité de la paroi aortique (Lakatta, Mitchell et al. 1987). Les conséquences de ces changements aboutissent à une augmentation de la pression artérielle et à une diminution de la compliance.

La notion proprement dite de remodelage vasculaire est apparue avec les travaux de Baumbach et Heistad à la fin des années 1980 (Baumbach and Heistad 1989). Cette étude a montré les modifications de la structure des artérioles cérébrales, suite à des modifications hémodynamiques (rats hypertendus). La paroi vasculaire est donc capable de sentir des changements environnementaux, d'intégrer ces signaux et de changer sa structure (Gibbons and Dzau 1994). Cependant, le concept de remaniement au sein de la paroi artérielle des fibres élastiques avait été défini antérieurement par MF O'Rourke (O'Rourke 1971). Celui-ci indiquait notamment la présence d'un remaniement des fibres élastiques au niveau artériel en réponse à l'hypertension (O'Rourke 1976). Ce terme a ensuite été étendu par Mulvany et Heagerty (Mulvany 1992, Heagerty, Aalkjaer et al. 1993) aux artérioles

périphériques humaines, pour désigner toute augmentation du rapport épaisseur/rayon des artérioles survenant en l'absence d'augmentation de la surface de section pariétale.

### 3.2.1 Rappel sur la MEC du tissu aortique

La paroi aortique est majoritairement composée par une MEC complexe et dense, lui conférant ses propriétés visco-élastiques et sa résistance. L'élastine et le collagène sont les principaux constituants au sein de cette architecture fibrillaire (Jacob 2003). Tels que vu dans le paragraphe 3.1.2.2. a et b, les CMLV assurent, dès le début de la vie, la synthèse de la quasi totalité des constituants de la matrice extracellulaire. Ces constituants sont présentés dans les paragraphes suivants.

#### 3.2.1.1 *L'élastine*

##### a) La synthèse de l'élastine

C'est un processus complexe débutant dans la cellule et se terminant, après de nombreuses étapes, dans la MEC sous forme d'un polymère insoluble : l'élastine. La synthèse de l'élastine a lieu pendant la vie fœtale et atteint son pic au cours du 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse pour diminuer très rapidement à la naissance. Au cours de l'âge adulte, la synthèse de l'élastine est presque inexistante. En effet Powell et al ont mesuré la concentration de D-aspartate, et il a ainsi été calculé que la demi-vie de l'élastine dans le parenchyme pulmonaire et l'aorte est de 70 ans, en l'absence de toute pathologie (Powell, Vine et al. 1992). Comme pour toute protéine, la synthèse débute par une transcription puis une traduction dans la cellule musculaire lisse du gène codant pour l'élastine, situé sur le chromosome 7. Le produit de cette première étape est une protéine soluble : la

tropoélastine. Elle subira ensuite quelques modifications post-transcriptionnelles comme le clivage de sa séquence signal hydrophile, avant d'être prise en charge par une protéine chaperonne: l'Elastine Binding Protein (EBP). L'EBP protège la tropoélastine d'une agrégation prématurée et d'éventuelles dégradations enzymatiques précoces dans le cytoplasme de la cellule. L'EBP libère ensuite le monomère soluble de tropoélastine dans la matrice péri-cellulaire. Vient ensuite la formation de liaisons covalentes à l'aide de la lysyle oxydase (LOX). La LOX est une enzyme sécrétée par les CMLV ou les fibroblastes dans la MEC. Comme son nom l'indique, la LOX va permettre l'oxydation des résidus lysine dans un composé. Ainsi, au niveau de la molécule de tropoélastine, la LOX oxydera les lysines. Cette réaction permet la formation de liaisons covalentes rendant le polymère d'élastine insoluble (Arribas, Hinek et al. 2006).

#### b) La structure de l'élastine

L'élastine est une chaîne polypeptidique longue de 830 acides aminés. Elle est constituée majoritairement de prolines et de glycines. Cette protéine de 70 kDa est très hydrophobe : 95 % des acides aminés sont apolaires (35 % de glycine, 60 % d'alanine, valine, leucine et isoleucine, proline et hydroxyproline). Elle est constituée d'une alternance de séquences hydrophobes et de séquences riches en alanine et en lysine.

L'élastine est un polymère résultant de l'association de plusieurs molécules de tropoélastine, le précurseur soluble de l'élastine, et a la particularité de n'être élastique qu'en présence d'eau. Dans l'organisme, l'élastine se retrouve dans les tissus sujets à de continuelles déformations physiques, ou à des changements importants de pression. L'élastine est produite par les fibroblastes au niveau de la peau et par les cellules de la paroi

aortique et en particulier par les CMLV. Elle est donc tout naturellement retrouvée au sein des artères élastiques comme l'aorte. Elle confère à l'aorte son élasticité et permet d'absorber l'énergie de l'onde systolique et de la restituer pendant la diastole. Les travaux de Halloran (Halloran and Baxter 1995) ont montré que la quantité d'élastine par unité de surface diminue tout au long de l'aorte pour ne plus être que le cinquième de sa concentration initiale au niveau de l'aorte abdominale terminale. La partie la plus riche en élastine se situe donc en sortie du cœur au niveau de l'aorte ascendante, partie que nous avons étudiée dans la cohorte de jeunes adultes nés prématurément.

### 3.2.1.2 *Le collagène*

#### a) La synthèse du collagène :

Plusieurs cellules sont capables de synthétiser les molécules de collagène. Au sein des artères élastiques, cette synthèse est assurée par les *CMLV* et les *fibroblastes* ; qui appartiennent à la lignée embryonnaire des cellules mésenchymateuses (Bou-Gharios, Ponticos et al. 2004). Le collagène est soumis à un *turn-over* lent permettant, dans des conditions physiologiques, la stabilité de la résistance du tissu conjonctif.

#### b) Structure du collagène :

Le terme de collagène est un terme générique utilisé pour décrire des protéines formant une triple hélice caractéristique composée de trois chaînes polypeptidiques. Après leur sécrétion dans l'espace extracellulaire, les molécules de collagène s'assemblent en polymères fibrillaires ou non fibrillaires. Les trois chaînes qui constituent les collagènes possèdent plus de 1000 acides aminés, avec environ un tiers de résidus glycine et un quart

de résidus proline et d'hydroxyproline. La LOX catalyse les liaisons entre les hélices des différents collagènes (Canty and Kadler 2005). Dans tous les collagènes fibrillaires, les chaînes polypeptidiques sont composées dans leur région centrale d'une succession de triplets G-X-Y (avec le plus souvent en position X la proline et en position Y l'hydroxyproline) et par des domaines terminaux plus courts de composition différente.

Il a pour rôle d'assurer la résistance mécanique des vaisseaux. Il existe plus d'une vingtaine de types différents de collagènes numérotés en chiffres romains. A ce jour, le collagène XXVIII (principalement retrouvé au niveau des nerfs périphériques) est le dernier à avoir été identifié (Veit, Kobbe et al. 2006). Différentes familles peuvent être individualisées en fonction de l'arrangement tridimensionnel du collagène. On décrit par exemple, les collagènes formant des fibrilles : I, II, III, V, XI ; les collagènes associés aux fibrilles : IX, XII, XIV, XIX ; les collagènes constituant les membranes basales : IV ; ainsi que d'autres ayant leurs caractéristiques propres : VI, VII (Gelse, Poschl et al. 2003).

Au niveau de la paroi vasculaire, au sein de la MEC artérielle, les collagènes de type III et I sont les plus représentés. D'autres types de collagènes sont aussi retrouvés mais en plus faible quantité et dans des structures spécialisées ; c'est en particulier le cas des collagène IV, V et VI (Jacob 2003).

#### *i. Les fibres de collagène*

Les *fibres de collagène* de la paroi de l'aorte (principalement composées de collagène I et III ) sont très peu élastiques et très résistantes comparées à l'élastine. En dehors du tissu artériel, ces fibres sont aussi très abondantes dans les tendons. Ces derniers doivent transmettre l'énergie, parfois considérable, développée par le muscle au squelette,

sans se rompre. L'architecture de la molécule de collagène en triple hélice et son organisation au sein de fibres compactes lui confèrent cette résistance. Au niveau de l'aorte, la diastole cardiaque correspondant à l'état de repos. Les fibres de collagène forment alors des boucles lâches intimement liées aux fibres élastiques. Lors de la systole, la pression intravasculaire augmentent, les boucles s'étirent rapidement jusqu'à leur maximum les unes après les autres, formant un véritable "manchon" limitant la dilatation des fibres élastiques et donc du vaisseau.

*ii. Orientation et propriétés hémodynamiques des fibres de collagène:*

Les collagènes fibrillaires ont une organisation particulière au sein de la paroi aortique. Selon la topographie de la synthèse de ces fibres, on observe des orientations différentes.

Les fibres de collagène au sein de la media sont essentiellement orientées circonférentiellement, induisant une grande résistance aux forces radiales et limitant la compliance des vaisseaux élastiques (Kielty, Sherratt et al. 2002).

Les fibres de collagène de l'adventice aortique sont quant à elles principalement synthétisées par les fibroblastes. Ces cellules sont très semblables aux CMLV (phénotype sécrétoire) et produisent du collagène en grande quantité. L'orientation longitudinale de ces fibres de collagène permet de maintenir l'architecture des vaisseaux dans le temps.

L'enchevêtrement de ces différentes couches de collagène entre média et adventice, ainsi que leurs connexions aux autres composants de la paroi, permet la résistance des artères élastiques aux contraintes hémodynamiques.

### 3.2.1.3 *Les autres molécules de la MEC des artères élastiques*

L'élastine et les collagènes représentent la grande majorité des composants de la matrice extracellulaire. Il existe cependant d'autres molécules, présentes en plus faibles quantités, jouant également un rôle dans l'architecture de la paroi aortique. Ces molécules sont par exemple impliquées dans la synthèse, l'organisation et la stabilisation des fibres d'élastine et de collagène. Parmi elles sont retrouvées (Kielty, Sherratt et al. 2002) :

- **les glycoprotéines matricielles** : ont un double rôle au sein de la matrice : fixer les cellules à la MEC et lier les différents éléments de cette dernière entre eux. Elles interviennent dans la transmission des signaux cellulaires nécessaires à la synthèse et à la dégradation de la matrice extracellulaire. Elles regroupent les fibrillines (pouvant intervenir dans certaines pathologies, induites par leurs mutations comme le syndrome de Marfan (Dietz and Mecham 2000) et les syndromes associés, entraînant des anomalies des tissus élastiques : anévrysmes et dissections aortiques et atteintes des valves cardiaques,...), les glycoprotéines associées aux microfibrilles (Multifibrillar Associated GlycoProteins : MAGPs, présentes dans les microfibrilles), la fibronectine (molécule de liaison entre les cellules et la matrice extracellulaire), la fibromoduline (permettant les interactions entre les cellules et les fibres de collagène et jouant un rôle dans la régulation de la synthèse du collagène), ainsi que d'autres glycoprotéines comme la tensacrine, la laminine, la thrombospondine, l'ostéopontine...

- **les protéoglycanes** : présents en faible quantité dans les tissus élastiques comme l'aorte, mais retrouvés de façon abondante dans les tissus devant résister à des forces de compression importantes (ex : cartilages, disques intervertébraux etc...).



### 3.2.2 Altérations de la composition biochimique de la MEC

La MEC est une structure dynamique en perpétuel renouvellement. Le maintien de la paroi aortique subit une constante dégradation par des protéases des différents éléments de la MEC ainsi que des cellules, à l'exception de l'élastine qui présente un *turn-over* très faible voire nul, dans des conditions physiologiques. Cette dégradation ou protéolyse des composants de la MEC présente plusieurs fonctions : l'assemblage proprement dit de la MEC et son remodelage structurel. La synthèse permanente de constituants nécessite donc l'élimination des molécules âgées ou altérées. Ce rôle est attribué à différentes protéases allant hydrolyser les chaînes peptidiques des protéines. Elles sont classées en différentes catégories où l'on retrouve quatre familles d'endopeptidases. Celles-ci sont classées en fonction de leur mécanisme de dégradation et de leur site d'activité :

- Les aspartate-endopeptidases,
- Les MMPs,
- Les sérine-protéases,
- Les cystéine-protéases.

Suivant leurs familles, les endopeptidases utilisent différents mécanismes pour générer le nucléophile nécessaire à la dégradation et pour rapprocher le nucléophile de la cible. La dégradation de la liaison covalente entre les acides aminés de la protéine cible est due à une réaction acide-base hydrolytique.

Enfin, la dégradation des macromolécules comme l'élastine ou le collagène de la MEC produit des peptides qui peuvent avoir des propriétés biologiques propres et ainsi réguler l'ensemble des processus régissant la paroi vasculaire. Ces fragments de matrice sont appelés les matrikines du fait de leur origine matricielle et de leur rôle de cytokine.

Elles modulent la prolifération et la migration cellulaires, la production de protéases et peuvent être impliquées dans certaines pathologies (Maquart, Bellon et al. 2005).

Dans ce doctorat, nous ne nous intéresserons, qu'aux métallo-, et cystéine-protéinases. Seules ces endopeptidases peuvent agir de façon extracellulaire et donc dégrader la MEC.

### *3.2.2.1 Enzymes de dégradation de la MEC*

#### a) Les MMPs

Les MMPs représentent un groupe majeur d'enzymes jouant un rôle dans la composition de la MEC. Les MMPs sont synthétisées sous forme de pro-MMPs inactives. Leur activation nécessite l'intervention d'autres protéases ou, pour certaines, d'autres MMPs qui clivent la séquence signal masquant le site catalytique. La fonction catalytique de la plupart des MMPs dépend d'un ion zinc au niveau de leur site actif allant polariser une molécule d'eau. Le nucléophile nécessaire à la protéolyse est l'atome d'O<sub>2</sub> de la molécule d'eau. Elles expriment leur activité enzymatique à la température de 37°C, à pH neutre et en présence de zinc (Zn<sup>2+</sup>). La séquence d'acides aminés « HExGHxxGxxHS » (où x est un acide aminé indéterminé) est constante dans la structure primaire des MMPs et permet de lier le zinc.

Les MMPs sont synthétisées par un grand nombre de cellules dans le tissu vasculaire normal. Dans l'aorte, les CMLV, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les macrophages et les quelques lymphocytes présents sont capables de produire ces enzymes en quantité importante sous l'influence de divers stimuli. Un stress cellulaire ou des

contraintes mécaniques peuvent activer ces cellules qui, en réponse, vont sécréter des MMPs leur permettant de migrer au travers de la média et des limitantes élastiques.

Les variations au niveau du domaine catalytique permettent une spécificité de liaison avec un substrat particulier. Par exemple, les MMP-2 et -9 gélatinases A et B possèdent un domaine de liaison pour la gélatine. Les différents types de MMPs sont présentés dans le tableau 2.

La régulation de l'activité enzymatique des MMPs est le fait d'inhibiteurs spécifiques, les TIMPs, qui sont des régulateurs endogènes de l'activité des MMPs. Il existe 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 inhibiteurs TIMP-1 et TIMP-2 ont la possibilité d'inhiber l'ensemble des MMPs contenues dans la paroi artérielle.

**Tableau 2: MMPs de la paroi artérielle et principaux substrats**

Nom de l'enzyme	Type d'enzyme	Substrats	Activé par
<b>MMP-1</b>	Collagenase	Collagène types I, II, III, VII, X, gélatine, protéoglycanes	MMP-3, -10
<b>MMP-2</b>	Gélatinase A	Collagène types IV, V, VII, X, gélatine	Plusieurs MMPs
<b>MMP-3, -10, -11</b>	Stromélysine	Collagène types III, IV, V, IX, fibronectine, elastine, gélatine, laminine, protéoglycanes	Cathepsine G
<b>MMP-7</b>	Stromélysine	Collagène type IV, fibronectine, gélatine, laminine,	MMP-3, -10
<b>MMP-8</b>	Collagenase	Collagène types I, II, III, protéoglycanes	MMP-3, -10
<b>MMP-9</b>	Gélatinase B	Collagène types IV, V, VII, X, gélatine	MMP-2, -3
<b>MMP-12</b>	Stromélysine	Elastine	-

## b) Les Cystéine-protéases

Les cystéine-protéases utilisent la cystéine et plus particulièrement le groupement thiol afin de générer le nucléophile actif. Elles sont divisées en deux superfamilles : les enzymes reliées à l'enzyme de conversion de l'interleukine  $\beta 1$  et la superfamille des papaïnes (Berti and Storer 1995). Cette dernière regroupe les cathepsines B, H, L et S qui constituent les plus abondantes enzymes lysosomales. La cathepsine K appartient également à la famille des papaïnes. Ces enzymes fonctionnent de manière optimale à pH acide restreignant ainsi leur activité aux vésicules intra-cellulaires ou à la région péri-cellulaire de cellules capables de créer physiologiquement un pH acide comme les ostéoclastes.

La cathepsine K a été découverte en tant qu'ADNc dans des ostéoclastes de lapins (Tezuka, Tezuka et al. 1994). La découverte de mutations de la cathepsine K chez des individus atteints de pycnodysostose, une maladie caractérisée par une ostéosclérose, a permis de mettre en évidence l'importance des cathepsines dans le remodelage de la MEC. Ces individus présentaient une taille réduite des membres et une déformation du crâne (Gelb, Shi et al. 1996). Mais l'implication des cathepsines dans la dégradation de la MEC ne se limite pas à l'os. Même si les cathepsines sont instables à pH neutre, elles ont quand même un fort potentiel de dégradation de la MEC. Par exemple, à pH 7,4, la cathepsine K est plus efficace que la MMP-9 pour dégrader l'élastine (Chapman, Riese et al. 1997), et elle possède la valeur de 10, correspondant au pouvoir élastinolytique le plus fort chez les mammifères (Bromme, Okamoto et al. 1996) (Tableau 3).

**Tableau 3 : Efficacité elastinolytique des MMPs et des cathepsines, adapté de H. A. Chapman**

Nom de l'enzyme	Efficacité elastinolytique
MMP-2	2,5
MMP-9	1
Cathepsine K pH 5,5	10
Cathepsine K pH 7,4	6
Cathepsine S pH 5,5	7
Cathepsine S pH 7,4	2,5

Dans des contextes de dégradation de la MEC, comme l'athérosclérose (Sukhova, Shi et al. 1998) ou l'insuffisance cardiaque (Cheng, Obata et al. 2006), il a été montré chez l'homme une augmentation de l'expression et de la sécrétion de la cathepsine S. Il est par ailleurs intéressant de noter que les cathepsines K à la particularité d'être également une collagénase (clivant le collagène I et II) (Garnero, Borel et al. 1998) (Kafienah, Bromme et al. 1998).

### 3.2.2.2 *Les changements de la MEC*

Tel que vu dans les paragraphes 3.2.1.1a et 3.2.1.2a, lors de la description des différents constituants de la matrice extracellulaire, certaines molécules ont un taux de renouvellement faible voire nul tout au long de la vie (élastine), et d'autres un taux un peu plus élevé, notamment au cours du vieillissement (collagène).

Ceci implique un mécanisme permettant d'éliminer les molécules anciennes, altérées, et une signalisation spécifique permettant un renouvellement. Ce premier rôle est en partie assuré par les MMPs qui interviennent en association avec les CMLV, allant hydrolyser l'élastine, les collagènes et les glycoprotéines. Cependant avec le temps on

assiste à une accumulation de macromolécules âgées, fragmentées et dégradées (Jacob 2003). L'ensemble de ces phénomènes modifie profondément les caractéristiques physico-chimiques du tissu aortique ainsi que le comportement de l'aorte en réponse aux variations de pression.

#### a) Dégradation de l'élastine

L'élastine est caractérisée par une très grande résistance aux dégradations chimiques, physiques ou enzymatiques. Au cours du temps, l'organisation des fibres élastiques se dégrade cependant. Parallèlement à la dégénérescence des fibres élastiques, une augmentation du collagène et une déposition de calcium sur l'élastine altérée est observée (Nejjar, Pieraggi et al. 1990, Jiang and Avolio 1997). Ainsi l'élastine pourra être dégradée par des enzymes protéolytiques nommées élastases ou protéases de type élastase incluant diverses catégories de protéases, telles que des MMPs (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12) (Murphy, Murphy et al. 1991) et des sérines protéases (élastase leucocytaire, plasmine, cathepsine G) (Hornebeck, Emonard et al. 2002).

#### b) Augmentation de macromolécules au sein de la MEC

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. chez l'homme 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 (Spina, Garbisa et al. 1983), processus également observé chez l'animal (Michel, Heudes et al. 1994). Cette accumulation de molécules aux propriétés peu élastiques confère une rigidité au vaisseau et

peut s'expliquer par une diminution de leur dégradation et/ou une augmentation de leur synthèse. D'autre part, avec le vieillissement, l'activité des MMPs augmente. Ces enzymes ne dégradent pas que l'élastine, elles peuvent également catalyser l'hydrolyse de nombreux composés de la MEC. Les liaisons covalentes intermoléculaires confèrent aux protéines matricielles une protection contre l'hydrolyse. Au cours de leur maturation, tel que vu dans les paragraphes 3.2.1.1a et 3.2.1.2b, le collagène et l'élastine développent des pontages catalysés par la LOX et la transglutaminase. Ceci leur procure une résistance partielle à la protéolyse. Cependant, en vieillissant le nombre de liaisons covalentes diminue pour l'élastine (Nejjar, Pieraggi et al. 1990), 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 (monosaccharide) et un résidu lysine ou arginine, va former un produit d'Amadori. Ultérieurement, ce produit d'Amadori se transforme en AGE. Bruel et al ont montré l'accumulation des AGE dans la paroi artérielle avec l'âge (Bruel and Oxlund 1996). Ces liaisons, en plus de protéger le collagène de l'hydrolyse, augmentent sa résistance à l'étirement, (Jacob 2006) et donc sa rigidité. 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.

### c) Augmentation du phénotype sécrétoire des CML

Le vieillissement de la paroi artérielle engendre l'altération des constituants de la paroi aortique. Les CMLV migrent et changent de phénotype pour sécréter principalement du collagène. La co-localisation de ces CMLV sécrétant des MMPs et des fibres élastiques engendre l'altération irréversible des fibres élastiques de l'aorte. Irrémédiablement, ces

lésions soumises au stress pariétal induisent la fragmentation des fibres élastiques sans variation de quantité d'élastine. Cette fragmentation des fibres d'élastiques engendre un dépôt de lipides et de calcium qui suractive la production de MMPs et diminue l'élasticité des fibres. Lors du vieillissement, la production de collagène par les CMLV s'accroît de façon concomitante à une diminution de sa dégradation. Ainsi, le rapport collagène sur élastine augmente progressivement avec l'âge rendant l'aorte plus rigide et moins élastique.

Ces modifications aboutissent à la rigidification de la paroi artérielle qui s'accompagne de modifications hémodynamiques par défaut de compliance artérielle (hypertension et onde systolique réfléchie précoce).

### **3.3 Mécanisme hémodynamique du vieillissement aortique : altération des propriétés biophysiques**

Les altérations les plus retrouvées au cours du vieillissement dans les grandes artères sont l'augmentation de la lumière artérielle, l'épaississement de l'intima-média, l'augmentation du dysfonctionnement des cellules endothéliales et bien sûr la rigidité artérielle (Lakatta and Levy 2003). La diminution de la proportion d'élastine et l'augmentation de la proportion de collagène sont les principales causes de l'augmentation de la rigidité artérielle due au vieillissement. Cette augmentation de la rigidité artérielle est associée à une augmentation de la pression artérielle systolique, une diminution de la pression artérielle diastolique, et donc une augmentation de la pression pulsée (PP), traduite par la mesure de la vitesse de l'onde de pouls (Laurent, Boutouyrie et al. 2005). Par ailleurs, l'augmentation de la rigidité des vaisseaux due au vieillissement fait intervenir principalement les artères de conductance. Peu de changements de rigidité sont en revanche



retrouvés dans les artères musculaires. Des études cliniques ont ainsi montré qu'il n'y avait pas de relation entre la distensibilité de l'artère brachiale ou fémorale et l'âge, contrairement à l'aorte et à la carotide (Benetos, Laurent et al. 1993, van der Heijden-Spek, Staessen et al. 2000).

### 3.3.1 Définition de la rigidité artérielle

L'augmentation de la rigidité artérielle correspond à la perte de la capacité de l'artère à se dilater sous l'action de la pression artérielle et est aujourd'hui considérée comme un fort indicateur d'évènements cardiovasculaires futurs et de mortalité à l'âge adulte (Vlachopoulos, Aznaouridis et al. 2010). L'augmentation de la rigidité artérielle fait cependant partie du processus normal de vieillissement. La diminution de la compliance provoque une augmentation de la pression systolique caractéristique de l'hypertension systolique isolée retrouvée chez le sujet âgé. On peut distinguer deux types d'approches pour étudier la rigidité artérielle : l'approche dite locale, c'est à dire centrée sur un segment artériel particulier, et l'approche dite régionale, c'est à dire réalisée entre deux points de l'arbre artériel.

### 3.3.2 Mesure de la rigidité artérielle : principe de l'échocardiographie

Contrairement aux expérimentations animales, la mesure de la rigidité chez l'homme ne peut pas se faire par des méthodes invasives. L'utilisation des méthodes non-invasives a été développée au fil du temps. Dans le cadre de ce doctorat, les mesures de rigidité ont été effectuées au niveau aortique (approche locale), à l'aide de mesures échographiques et Doppler sur une machine d'échocardiographie utilisée pour la pratique

clinique (Sandor, Hishitani et al. 2003, Bradley, Potts et al. 2005). De part sa proximité avec le cœur, l'aorte est le vaisseau le plus exposé aux déformations du à la composante pulsatile du flux.

L'échocardiographie est une technique non invasive d'exploration morphologique et dynamique du cœur par les ultrasons. Elle est réalisée à l'aide d'un appareil échographique spécialement conçu pour la cardiologie, appelé échocardiographe, équipé d'une sonde à ultrasons. Cette sonde possède des propriétés piézo-électriques et émet des ultrasons selon une fréquence comprise entre 2 et 5 MHz chez l'adulte, et reçoit leurs échos qu'elle traduit en impulsions électriques amplifiées secondairement et visualisées sur un écran d'oscilloscope dit moniteur. Les documents échographiques sont analysés avec un tracé électrocardiographique servant de repère de temps dans le cycle cardiaque.

#### *3.3.2.1 Principe de l'imagerie ultrasonore :*

Le traitement des échos se fait par la mesure du temps de retour des échos permettant d'appréhender la distance séparant la sonde de l'interface explorée. Chaque structure cardiaque rencontrée par les ultrasons réfléchit un echo caractéristique par sa position et sa mobilité.

#### *3.3.2.2 Principe de l'effet Doppler :*

Le traitement des échos peut se faire également par l'étude des variations de fréquences des échos réfléchis par une interface mobile : ici le flux sanguin, permettant de mesurer la vitesse de déplacement des globules rouges et ainsi d'évaluer la vélocité. Au cours de ce doctorat pour l'évaluation des paramètres de rigidité vasculaire tels que la

vitesse d'onde de pouls (VOP) et l'impédance d'entrée ( $Z_i$ ), le Doppler pulsé a dû être utilisé pour la visualisation des vaisseaux profonds (par opposition au Doppler continu qui lui ne visualise que les vaisseaux plus superficiels).

Dans le cadre du Doppler pulsé, la sonde est alternativement émettrice et réceptrice. Elle émet de brèves salves d'ultrasons puis passe à l'écoute de l'écho sonore. Le temps de répétition des séries d'échos peut être ajusté et le moment où la sonde est en réception peut être modulé permettant de définir une zone exclusive d'examen, appelée la fenêtre d'exploration.

Un logiciel approprié intégré à l'échographe permet d'effectuer certaines mesures et des calculs échographiques. On notera que la visualisation correcte des structures cardiaques peut être parfois difficile voire impossible du fait des limites techniques dues en particulier à l'échogénicité du patient (ex : hypoéchogénicité des patients obèses), à une déformation thoracique ou à la distension aérique des poumons (emphysèmes, asthmes).

### 3.3.2.3 *Techniques d'enregistrement :*

Dans le cadre de ce doctorat, l'enregistrement de l'échocardiographie a été réalisé par la voie transthoracique. Le sujet était installé en décubitus dorsal, thorax légèrement surélevé ou en décubitus latéral gauche. La sonde ultrasonore est appliquée sur le thorax du patient examiné et dirigée vers son cœur selon des règles bien définies suivant les mesures à effectuer. Un gel hydrosoluble est appliqué sur la peau et facilite la transmission des ultrasons entre la sonde et le patient. L'examen échographique a été réalisé selon trois techniques principales : monodimensionnelle, bidimensionnelle et Doppler.

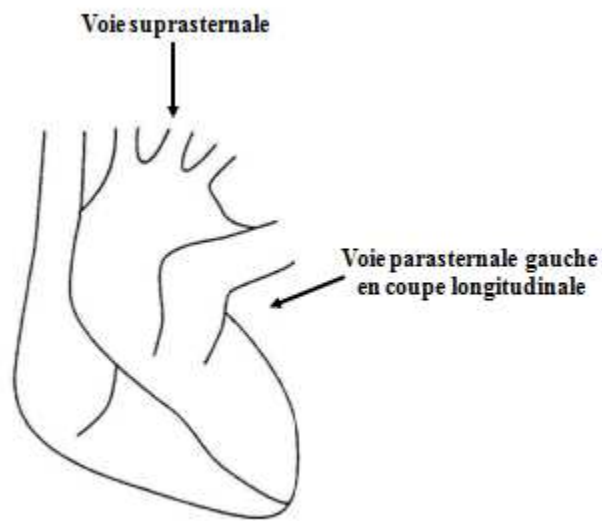
#### a) Echocardiographie monodimensionnelle (TM)

C'est une représentation graphique des mouvements des diverses structures cardiaques rencontrées par le faisceau d'ultrasons, en fonction du temps, d'où l'abréviation TM pour Temps-Mouvement ou Mode M. Le tracé TM comporte donc deux échelles : une verticale en profondeur et une horizontale de temps. L'exploration se fait selon l'axe du faisceau, donc dans une seule dimension.

#### b) Echocardiographie bidimensionnelle (2D)

Cette technique permet d'explorer le cœur en deux dimensions (2D) et en temps réel (fréquence d'image environ 50/seconde). Elle fournit une coupe anatomique du cœur en mouvement dans un plan donné. Il existe 4 voies principales d'exploration en 2D : la parasternale gauche, l'apicale, la sous costale et la suprasternale qui permettent d'obtenir les diverses coupes du cœur. Il ne sera détaillé ici que les deux voies utilisées lors de la mesure des paramètres de rigidité vasculaire, à savoir la voie parasternale gauche et la voie suprasternale (figure 7).

**Figure 7 : Deux voies d'exploration du cœur utilisées pour l'étude des paramètres de rigidité vasculaire en échographie bidimensionnelle 2D**



i. *Voie suprasternale :*

Cette voie de réalisation est la plus difficile. Elle permet notamment de visualiser la crosse de l'aorte dans un plan de coupe longitudinal et transversal, ainsi que l'origine des trois vaisseaux du cou.

ii. *Voie parasternale gauche :*

La sonde est placée au bord gauche du sternum (4 ou 5<sup>ème</sup> espace intercostal) chez le patient allongé en décubitus latéral gauche. Par cette voie, les structures cardiaques peuvent être explorées suivant deux axes du cœur : le grand axe, où le plan de la coupe orienté vers l'épaule droite est aligné avec le grand axe du cœur (coupe longitudinale), et le petit axe (coupe transversale). Pour les mesures des paramètres de rigidité vasculaire, la coupe longitudinale a uniquement été utilisée afin de visualiser la chambre de chasse du ventricule

droit, la racine de l'aorte ascendante avec ses deux sigmoïdes visibles en diastole, le septum interventriculaire, le ventricule gauche et la valve mitrale.

### 3.3.3 Paramètres de mesure de la rigidité artérielle

Les méthodes invasives utilisées en expérimentation animale ne pouvant être utilisées en clinique pour mesurer la rigidité vasculaire, des paramètres substitutifs liés à la rigidité vasculaire ont été développés. Plusieurs indices permettent cette étude (O'Rourke and Mancia 1999, O'Rourke, Staessen et al. 2002). Le tableau 4 synthétise les différents paramètres utilisés pour évaluer la rigidité artérielle. La plupart d'entre eux sont mesurés à l'aide de techniques d'écho Doppler et de tonométrie (pour mesurer la pression).

**Tableau 4 : Synthèse des différents paramètres de mesure de la rigidité artérielle**

Nom du paramètre	Explication du paramètre	Formule	Unités
<b>Compliance</b>	Rapport entre la variation de diamètre du vaisseau et le changement de pression	$\frac{AAoS - AAoD}{(PAS - PAD)}$	cm.mmHg <sup>-1</sup>
<b>Distensibilité</b>	Rapport entre la variation relative de diamètre du vaisseau et le changement de pression	$\frac{AAoS - AAoD}{AAoD} \times \frac{1}{(PAS - PAD)}$	mmHg <sup>-1</sup>
<b>Module élastique</b>	Inverse de la distensibilité	$(PAS - PAD) \times \frac{AAoD}{AAoS - AAoD}$	mmHg ou kPa
<b>VOP</b>	Vitesse de parcours de l'onde de pression le long d'un segment artériel	$VOP = \frac{AoL}{TT}$	m.s <sup>-1</sup>
<b>Zi</b>	Relation entre la distensibilité et les résistances périphériques	$\frac{PAS - PAD}{Peak\ Flow}$	dyne.s.cm <sup>-5</sup> ou mmHg.cm.s
<b>Zc</b>	Relation entre la variation de pression et le flux	$VOP \times \frac{\rho}{AoCSA}$	dyne.s.cm <sup>-5</sup> ou mmHg.cm.s
<b>βSI</b>	Rapport entre la pression et le changement relatif de diamètre du vaisseau	$\ln\left(\frac{PAS}{PAD}\right) \times \frac{AAoD}{AAoS - AAoD}$	-
<b>Pression pulsée</b>	Pression différentielle entre le pic de pression systolique et la pression minimale en fin de diastole	$(PAS - PAD)$	mmHg
<b>Index d'augmentation</b>	Proportion de la pression pulsée résultant de la réflexion de l'onde de pouls	$\frac{P2 - P1}{PAS - PAD}$	-

PAS = Pression Artérielle Systolique, PAD = Pression Artérielle Diastolique, AAoD = diamètre minimum de l'aorte ascendante en diastole, AAoS = diamètre maximum de l'aorte ascendante en systole, TT = temps de transit, AoL = longueur du parcours de flux dans l'arc aortique, ρ = masse volumique du sang (1,06 g.cm<sup>-3</sup>), AoCSA = surface de coupe de l'aorte, Peak Flow=Peak Aortic Velocity ×AoCSA, P1 = 1er pic de pression systolique, P2 = 2nd pic de pression systolique, Zi=Impédance d'entrée, Zc=Impédance caractéristique, βSI=Beta Stiffness Index

### 3.3.3.1 Les mesures directes de la rigidité aortique

Les mesures directes de la rigidité aortique incluent le module élastique de Peterson ( $E_p$ ) et le  $\beta$  stiffness index ( $\beta SI$ ). Ces deux variables évaluent la relation des changements du flux pulsatile dans l'aorte avec le diamètre artériel, en fonction des pressions aortiques où les dimensions de l'aorte ascendante seront mesurées sur le mode-M en diastole et en systole. La figure 10 présente un enregistrement en mode Temps Mouvement (TM), permettant d'extraire les diamètres minimum et maximum de l'aorte ascendante (AAoS et AAoD, respectivement trait vertical bleu et vert sur le tracé du vaisseau aortique), nécessaires pour les calculs du module élastique de Peterson, et du  $\beta$  stiffness index.

a) Module élastique de Peterson ( $E_p$ ) :

$$E_p = (PAS - PAD) \times \frac{AAoD}{AAoS - AAoD}$$

Où PAS = Pression Artérielle Systolique,

PAD = Pression Artérielle Diastolique,

AAoD = diamètre minimum de l'aorte ascendante en diastole,

AAoS = diamètre maximum de l'aorte ascendante en systole.

Afin d'interpréter  $E_p$ , il est important de définir la notion de distensibilité aortique. Celle-ci traduit la capacité de l'aorte à se déformer sous l'effet d'une variation de pression. Un vaisseau élastique aura donc des valeurs de distensibilité plus élevées qu'un vaisseau rigide.



En se référant à la formule de distensibilité suivante, on peut interpréter  $E_p$  comme l'inverse de la distensibilité. Une augmentation d' $E_p$  traduit donc une augmentation de la rigidité et signe ainsi une perte de distensibilité de l'aorte.

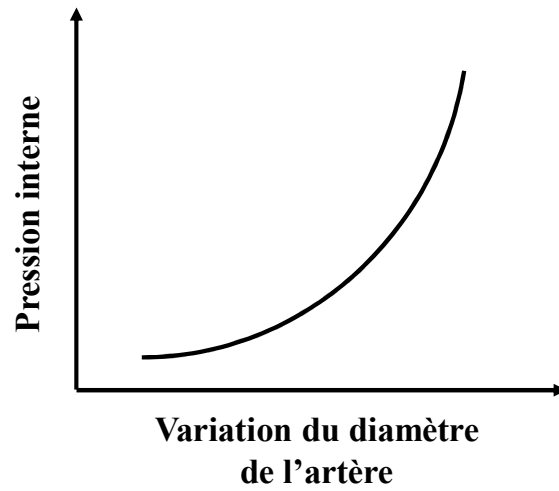
$$\text{Distensibilité aortique} = \frac{AAoS - AAoD}{AAoD} \times \frac{1}{(PAS - PAD)}$$

b)  $\beta$  stiffness index ( $\beta$ SI) :

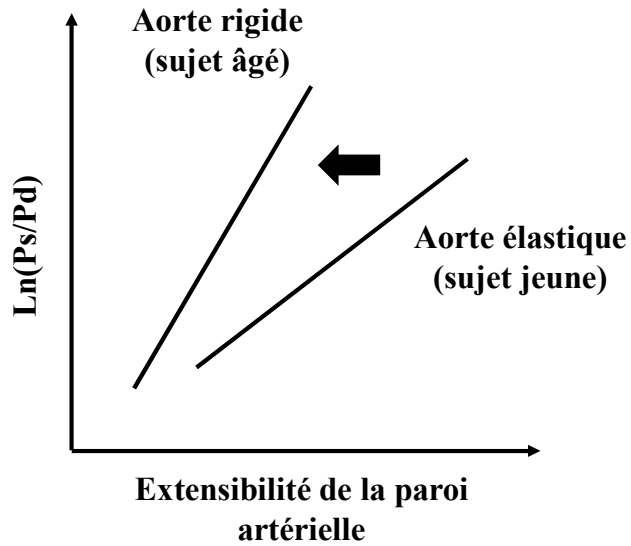
$$\beta SI = \ln\left(\frac{PAS}{PAD}\right) \times \frac{AAoD}{AAoS - AAoD}$$

Cet index sert à évaluer le degré de distensibilité d'une artère à partir de la variation du diamètre de l'artère et de la pression sanguine mesurée. Dans des conditions physiologiques stables, il y a un rapport exponentiel entre la pression intravasculaire et le diamètre de l'artère (voir Figure 8). En effectuant une transformation logarithmique du ratio de pression systolique-diastolique et de la distensibilité de la paroi artérielle, le rapport sera ensuite linéaire, comme indiqué dans la figure 9. La pente de la droite obtenue est l'indice  $\beta$ . Plus la valeur de  $\beta$  est élevée, plus basse est la distensibilité, et donc plus l'artère est rigide.

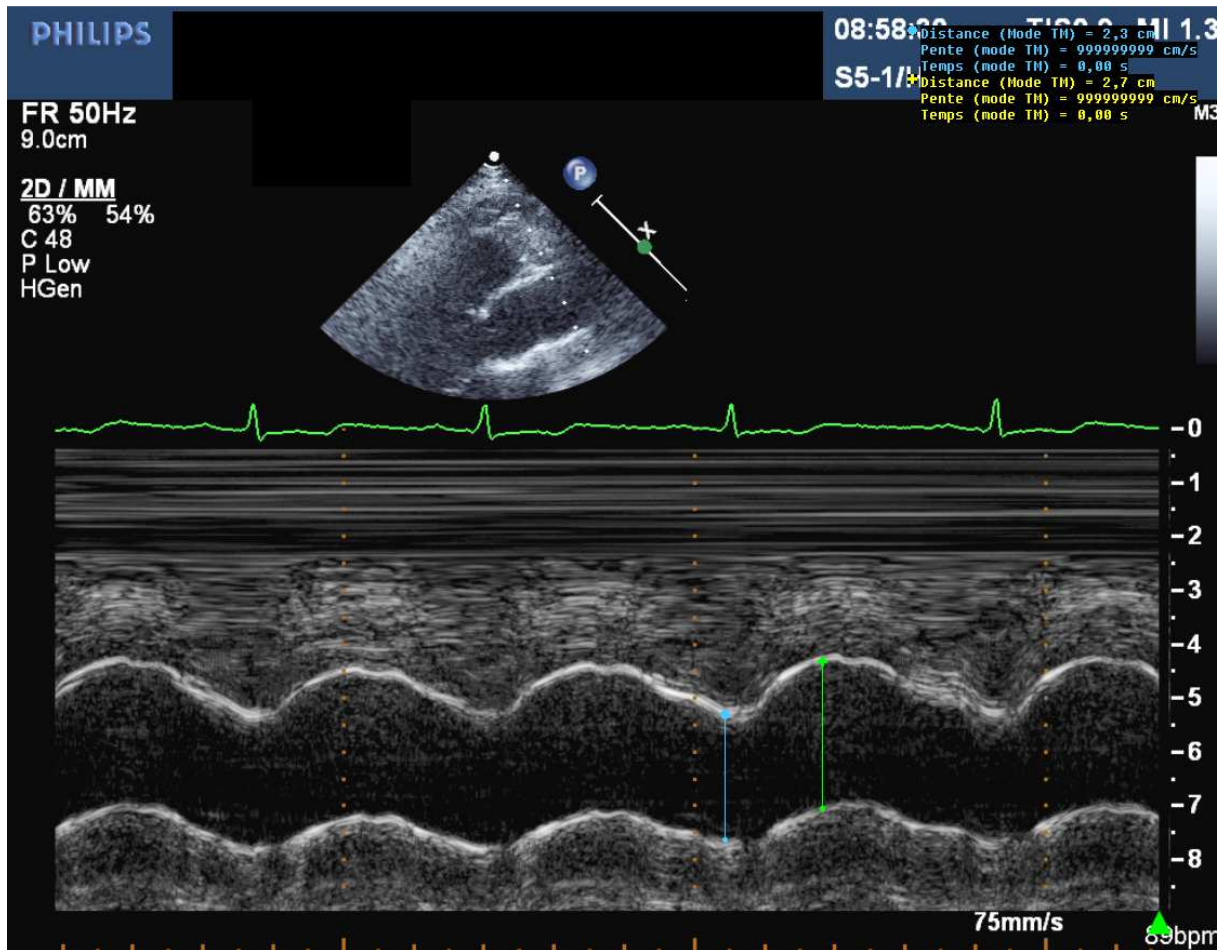
**Figure 8 : Pression intravasculaire et variation de diamètre**



**Figure 9 : Logarithme naturel du ratio de pression systolique-diastolique et extensibilité de la paroi artérielle**



**Figure 10 : Enregistrement en mode TM pour la mesure du AAOd et du AAOs pour les calculs de Ep et de  $\beta$ SI**



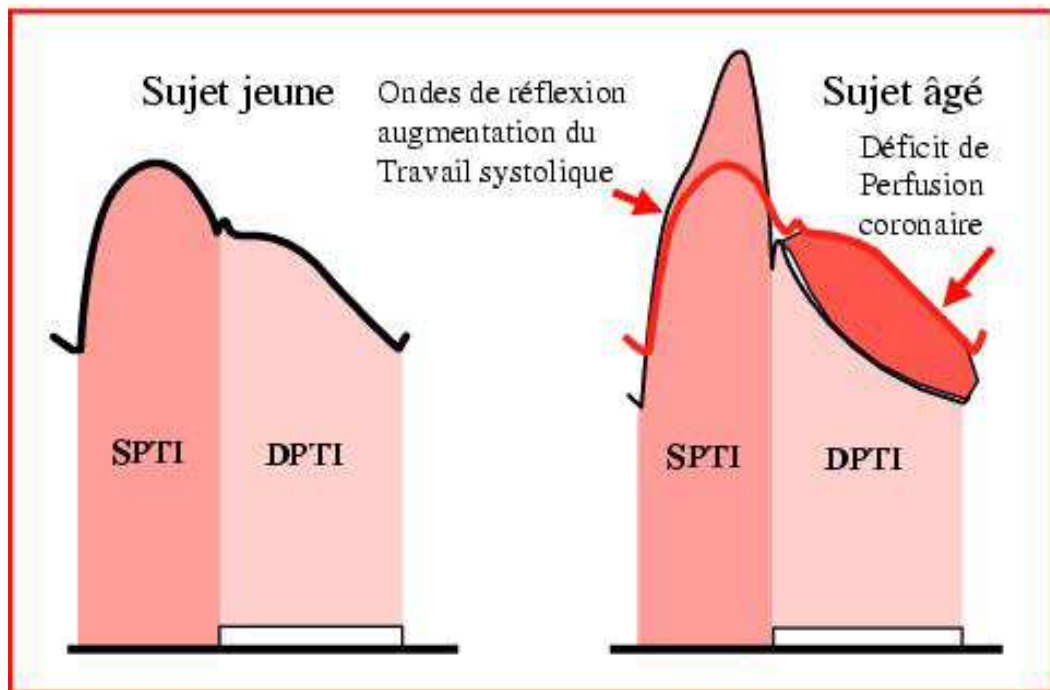
### 3.3.3.2 Les mesures indirectes de la rigidité aortique et de la réflexion des ondes

#### a) Vitesse de l'onde de pouls

Les propriétés élastiques de l'aorte normale agissent comme tampon en réponse au flux pulsatile de la circulation systémique. Plus l'aorte est rigide, plus la propagation de l'onde de pouls sera rapide (Dart and Kingwell 2001). Ainsi, la mesure de la VOP est une mesure indirecte de la rigidité aortique.

Cette augmentation de la valeur est expliquée par la superposition de l'onde de réflexion à l'onde incidente (changement d'épaulement du tracé droit de la figure 11). Cette superposition est due intrinsèquement à la structure même de la paroi aortique. Il est observé une perte d'élasticité (compliance) de l'aorte, due à un remaniement des fibres élastiques et de collagène. Pour le sujet jeune, les ondes de réflexion surviennent en diastole, et participent à générer la pression de perfusion coronaire. Chez le sujet âgé, à artères rigides, elles surviennent en systole, augmentent le travail du ventricule gauche, et génèrent un déficit de perfusion coronaire.

**Figure 11 : Représentation schématique de l'effet des ondes de réflexion sur la pression artérielle aortique. (SPTI : surface sous la courbe de pression systolique, DPTI, surface sous la courbe de pression diastolique) issue de (Boutouyrie 2004).**

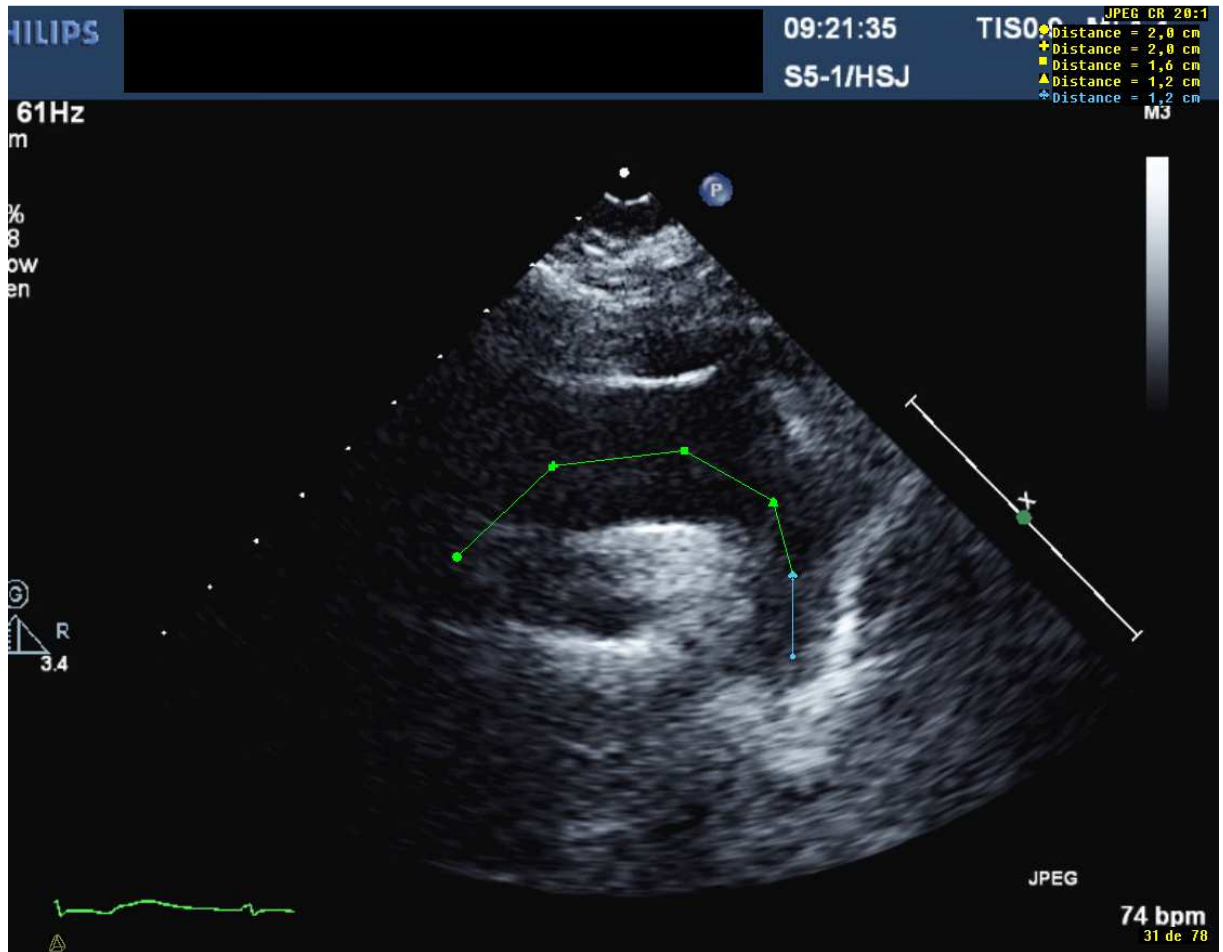


Pour le calcul de la VOP :

$$\text{VOP} = \frac{A_oL}{TT} \text{ en cm/sec}$$

Le temps de transit (TT) est calculé entre le temps entre le début du QRS (ondes de l'ECG) jusqu'au début de l'onde Doppler de l'aorte descendante soustrait du temps entre le début du QRS jusqu'au début de l'onde doppler de l'aorte ascendante. La longueur du parcours de flux dans l'arc aortique ( $A_oL$ ) est mesurée entre les deux points où les Doppler des vitesses aortiques ascendante et descendante ont été enregistrés. . La figure 11 présente une vue de la crosse de l'aorte où est tracée la longueur utilisée pour le calcul de la distance  $A_oL$ .

Figure 12 : Coupe 2D suprasternale longitudinale de la crosse de l'aorte utilisée pour le calcul de la vitesse de l'onde de pouls



b) Les mesures d'impédances aortiques caractéristique  $Z_c$  et d'entrée  $Z_i$

Les mesures d'impédances incluent l'impédance aortique caractéristique ( $Z_c$ ) :

$$Z_c = VOP \times \frac{\rho}{AoCSA} \text{ avec } AoCSA = \left( \pi \times \frac{\text{Aortic Annulus}}{2} \right)^2$$

Où  $\rho$  = masse volumique du sang ( $1,06 \text{ g.cm}^{-3}$ ),

AoCSA = surface de coupe de l'aorte,

Aortic annulus = anneau aortique

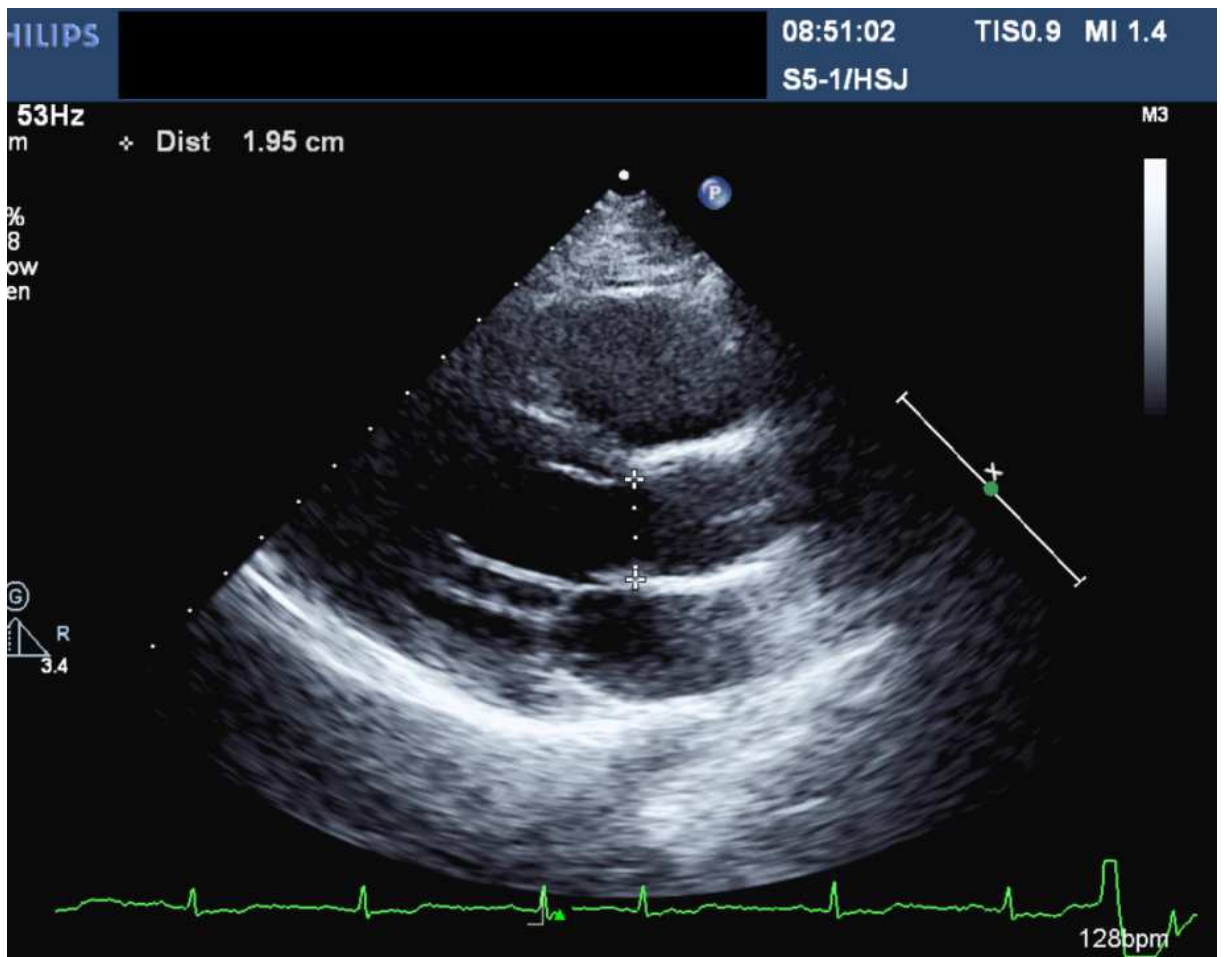
et l'impédance aortique d'entrée ( $Z_i$ ) :

$$Z_i = \frac{PAS - PAD}{Peak\ Flow} \text{ avec } Peak\ Flow = Peak\ Aortic\ Velocity \times AoCSA$$

Elles servent à évaluer les changements dans la structure aortique à un stade précoce d'athérosclérose et les changements dans les fonctions élastiques de l'aorte (London, Marchais et al. 2004). L'augmentation de la  $Z_c$  est un marqueur indirect de la rigidité aortique et de la réflexion des ondes. La  $Z_i$  est un marqueur de facteur artériel s'opposant à l'éjection du ventricule gauche, incluant la résistance périphérique totale et la distensibilité. Les pressions artérielles systoliques et diastoliques (PAS et PAD), nécessaires pour les calculs de l'élasticité, sont prises durant l'échocardiographie.

La figure 12 représente l'anneau aortique avec le tracé de son diamètre (aortic annulus) servant au calcul de la surface de coupe de l'aorte (AoCSA), nécessaire au calcul de la  $Z_c$ .

**Figure 13: Coupe 2D parasternale longitudinale du cœur utilisée pour le calcul de la surface de la coupe de l'anneau aortique pour le calcul des impédances**





## **CHAPITRE 2 : HYPOTHESES DE RECHERCHE ET BUTS DE L'ETUDE**

Le projet a pour but d'approfondir les connaissances concernant les mécanismes physiopathologiques au niveau vasculaire mis en cause dans le développement de l'HTA chez le nouveau-né soumis à une exposition à l'O<sub>2</sub> en période néonatale. Pour cela, nous avons utilisé un modèle cellulaire, un modèle animal et une cohorte de jeunes adultes nés prématurés.

Les mécanismes physiopathologiques responsables de la programmation développementale de l'HTA ne sont pas encore totalement expliqués, mais le stress oxydant (dû à l'exposition à l'O<sub>2</sub>) subi à ce moment clé du développement pourrait jouer un rôle déterminant dans le développement de la structure et de la fonction de l'arbre vasculaire. Plus précisément, nous postulons que des phénomènes de sénescence -au niveau cellulaire- et de vieillissement artériel prématuré -au niveau tissulaire- pourraient sous-tendre l'apparition des conséquences vasculaires délétères retrouvées à l'âge adulte.

Les objectifs de cette thèse de doctorat sont les suivants :

1. Au niveau cellulaire, à l'aide de cellules musculaire lisses d'aorte thoracique de rat embryonnaire, étudier les effets d'une brève exposition à l'O<sub>2</sub> (hyperoxie) en période néonatale sur les caractéristiques de vieillissement précoce (dommage à l'ADN, diminution de la prolifération cellulaire).
2. Au niveau tissulaire, plus précisément au niveau vasculaire, en utilisant l'aorte chez le rat, établir un lien entre l'exposition à l'O<sub>2</sub> et des caractéristiques connues de vieillissement précoce (dommage à l'ADN, diminution de la prolifération cellulaire et augmentation de l'expression de protéines de sénescence).

3. Démontrer au niveau aortique, avant l'apparition des dysfonctions vasculaires retrouvées à l'âge adulte, un remodelage vasculaire précoce.
4. Démontrer, à l'échelle humaine, à l'aide d'une cohorte de jeunes adultes nés prématurés, un vieillissement vasculaire précoce en étudiant les propriétés biophysiques au niveau aortique.

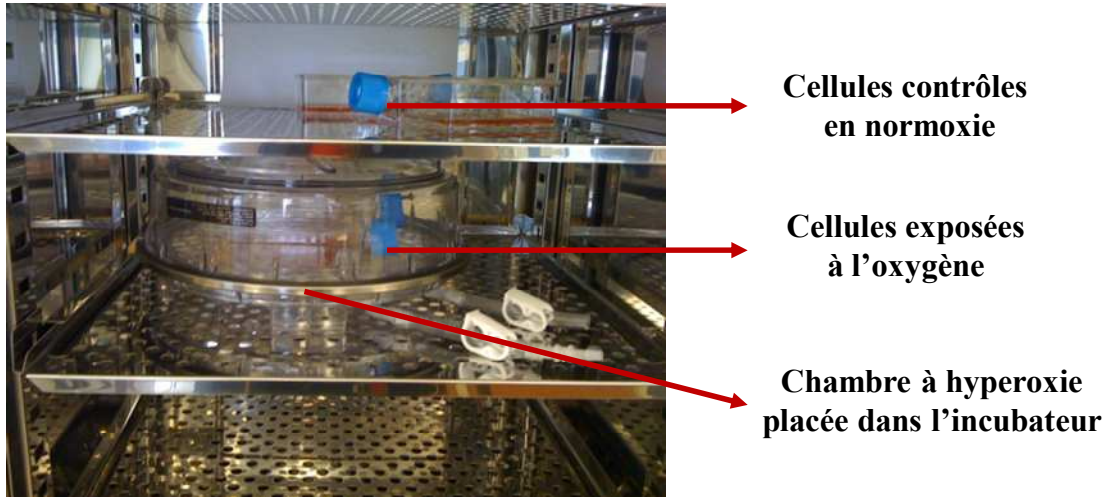
## **CHAPITRE 3 : MODÈLES UTILISÉS**

Un modèle expérimental permet de recréer une partie des aspects d'une pathologie dans un environnement connu et contrôlé. Il est également reproductible d'une expérience à l'autre. Un modèle expérimental est donc une simplification de la pathologie étudiée en clinique, où les variables biologiques d'intérêt peuvent être modulées une à une pour en analyser les conséquences. Le but est donc d'isoler un paramètre, ici l'O<sub>2</sub>, et d'en étudier les effets suivant la question de recherche posée. Dans les sections suivantes, seront présentées le modèle cellulaire et le modèle animal utilisés pour les hypothèses de cette thèse. La cohorte ayant permis d'intégrer les résultats retrouvés dans les modèles expérimentaux sera également présentée.

## **1. Modèle cellulaire**

Le modèle cellulaire utilisé a été développé au début de ce doctorat, spécifiquement pour cette étude. Le choix du type cellulaire reposait sur les objectifs de recherche et les expériences ultérieures prévues pour répondre à la question posée. Nous avons choisi d'utiliser des CMLV d'aortes thoraciques de rats embryonnaires d'origine commerciale (cellules A10 CRL-1476, ATCC, Manassas, VA) afin de respecter la thématique, à savoir une étude qui porte d'une part sur l'arbre vasculaire (CMLV d'aorte thoracique), et d'autre part sur la période néonatale (cellules d'origine embryonnaire) (Rao, Miano et al. 1997).

**Figure 14 : Chambre à hyperoxie utilisée pour le modèle cellulaire**



L'exposition à l'O<sub>2</sub> consiste en une injection de 40% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 55 % N<sub>2</sub> dans une chambre hermétique (Figure 13, Modular Incubator Chamber, Billups-Rothenberg, Del Mar, CA). Cette chambre est placée le temps de l'exposition (24h ou 48h) dans l'incubateur afin de maintenir la température classique de culture à 37°C. À la fin de l'exposition, la concentration en O<sub>2</sub> est vérifiée à l'aide d'un capteur (Oxygen Analyzer, Billups-Rothenberg, Del Mar, CA) pour s'assurer d'une exposition adéquate à l'hyperoxie. Une perte de 5% d'O<sub>2</sub> est considérée comme acceptable. De plus, la pO<sub>2</sub> a été mesurée dans les milieux de cultures à deux reprises à l'aide d'un oxymètre (ABL 800 FLEX, Radiometer, Brønshøj, Denmark) afin de s'assurer que le milieu de culture avec lequel les cellules sont en contact est bien hyperoxique (tableau 5).

**Tableau 5 : Valeurs de pO<sub>2</sub> (mmHg) dans le milieu de culture suivant l'exposition**

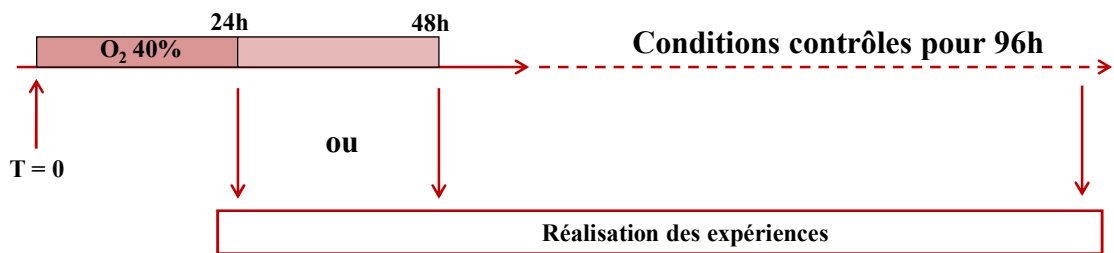
<i>Concentration en O<sub>2</sub></i>	<i>Mesure 1</i>	<i>Mesure 2</i>
Control – Air ambiant	160	159
40% O <sub>2</sub>	245	244

Les conditions contrôles sont les conditions classiques de culture de cette lignée cellulaire: 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, balance N<sub>2</sub> dans l'incubateur.

Les mesures prises dans ce modèle de culture cellulaire ont été réalisées à deux temps différents (voir figure 14):

- Immédiatement après 24 ou 48h d'exposition à l'O<sub>2</sub>,
- Après un temps de récupération de 96h en condition contrôle.

**Figure 15 : Déroulement des expériences du modèle cellulaire dans le temps**



## 2. Modèle animal

Le modèle animal choisi est classiquement utilisé pour l'étude à court terme des complications de la prématurité liées à une exposition à l'O<sub>2</sub>, dont la rétinopathie du prématuré (ROP) et la dysplasie bronchopulmonaire (DBP). Comme tout modèle animal, il ne peut prétendre reproduire exactement le stress subi par les nouveau-nés, notamment les prématurés. Ce stress peut, en effet, être modulé par de nombreuses conditions : les défenses antioxydantes du nouveau-né, l'AG, le sexe, le stress prénatal (tel que tabac, alcool, drogues, ou la prééclampsie), et les complications néonatales telles que les infections respiratoires.

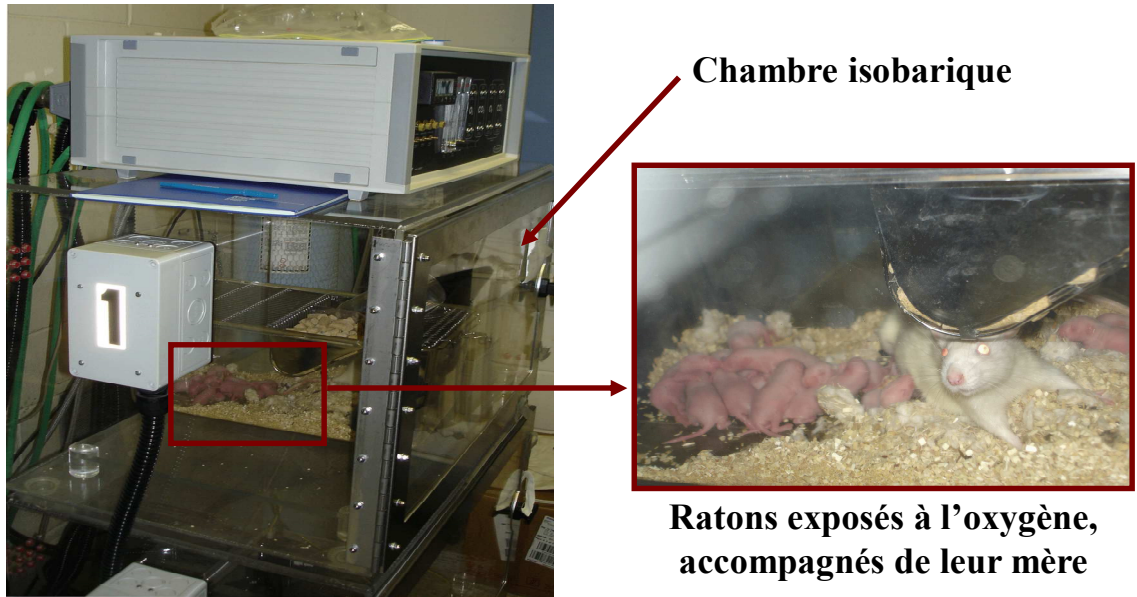
L'amplification d'un paramètre précis, à savoir ici l'exposition à l'O<sub>2</sub>, permet de mieux comprendre les conséquences à long terme d'un stress oxydant (dans ce cas-ci hyperoxique) néonatal ; situation à laquelle est soumise le prématuré dès sa naissance.

Des rats Sprague-Dawley (SD) nouveau-nés sont placés avec leur mère dans un environnement enrichi en O<sub>2</sub> (80 %) pendant 7 jours, entre le 3<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour de vie (P10) (oxycycler A820CV, Biosherix, figure 15). Ces animaux constituent le groupe exposé à l'O<sub>2</sub>, soit **l'hyperoxie : H**. Ils sont comparés à des portées restées à l'air ambiant sans changement de mère. Ce groupe contrôle est identifié dans le texte par le terme **contrôle**.

Il est important de préciser qu'un troisième groupe a été constitué afin d'éviter une morbidité maternelle. La mère dont la portée est exposée à l'O<sub>2</sub> est interchangée toutes les 12 heures avec une autre mère dont la portée est gardée à l'air ambiant. Ces animaux ont donc été nourris par une mère ayant été exposée à l'O<sub>2</sub> 12 heures par jour et constituent le groupe appelé **normoxie-hyperoxie : NH**. Ce groupe n' pas été utilisé pour établir des résultats au cours de ce doctorat.



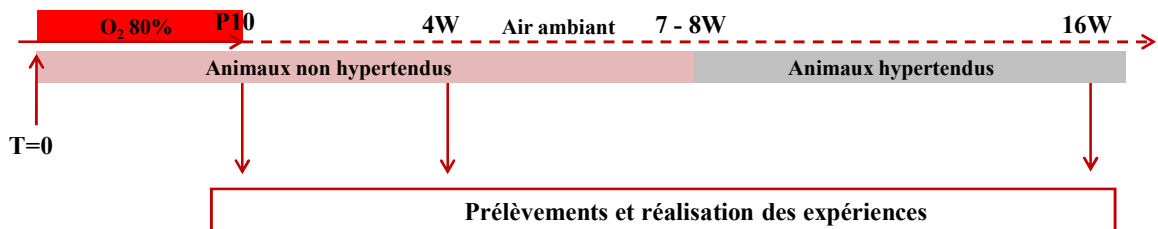
**Figure 16 : Chambre à hyperoxie utilisée pour le modèle animal**



Les mesures ont été réalisées suivant la figure 19 à trois temps différents :

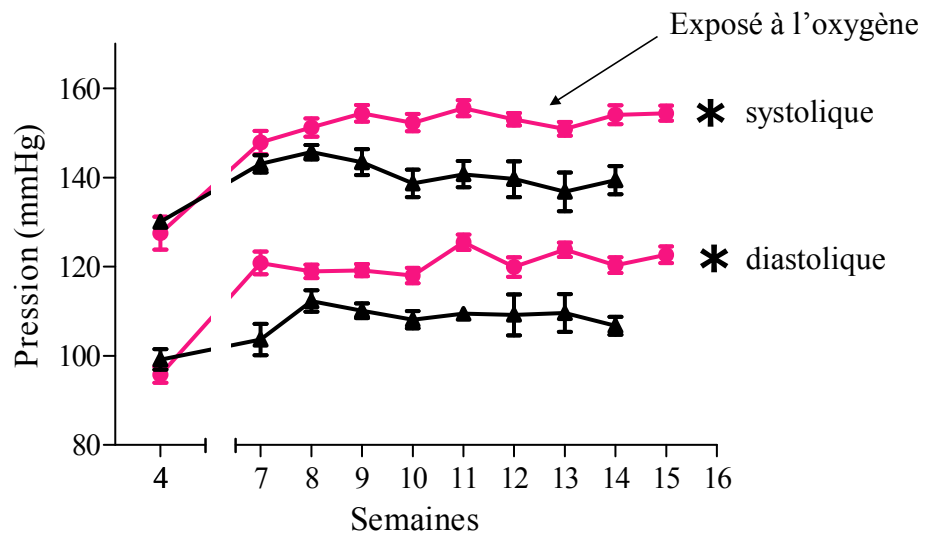
- Immédiatement après l'exposition à l' $O_2 = P10$
- Après 4 semaines de vie, animaux non hypertendus = **4W**
- Après 16 semaines de vie, animaux hypertendus = **16W**

**Figure 17 : Déroulement des expériences du modèle animal dans le temps**

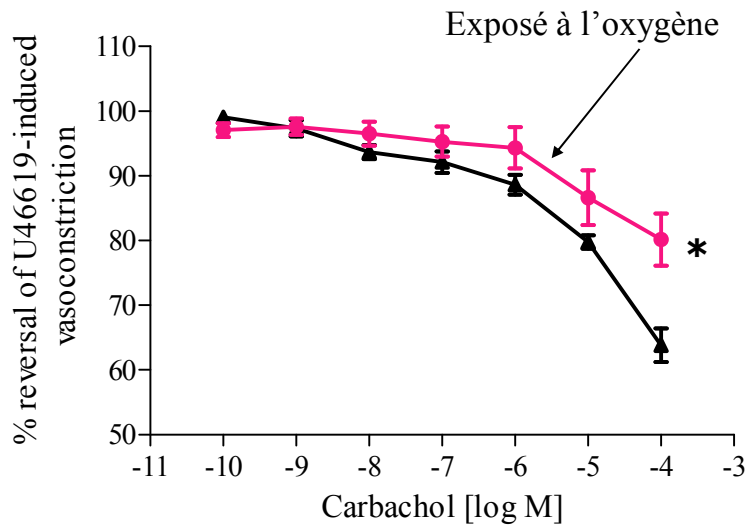


Afin de situer les données antérieures à ce doctorat développées dans le laboratoire avec le modèle animal, les résultats retrouvés à l'âge adulte au niveau vasculaire sont une élévation de la PAS et de la PAD, une dysfonction endothéliale, et une rigidité artérielle. Ces données sont présentées dans les figures 16, 17 et 18 et sous-tendent l'hypothèse de ce doctorat d'un vieillissement vasculaire précoce.

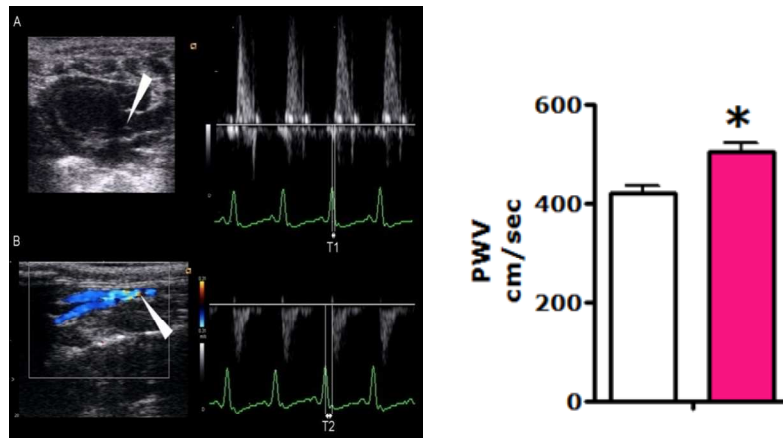
**Figure 18 : Elévation de la pression artérielle à l'âge adulte suite à un stress hyperoxique en période néonatale (Yzydorczyk, Comte et al. 2008)**



**Figure 19 : Dysfonction endothéliale à l'âge adulte suite à un stress hyperoxique en période néonatale (Yzidorczyk, Comte et al. 2008)**



**Figure 20 : Augmentation de la VOP à l'âge adulte suite à un stress hyperoxique en période néonatale (Mivelaz, Yzidorczyk et al. 2011)**



### 3. Etude clinique

Nous avons réalisé une étude de cohorte observationnelle.

Le **groupe exposé** correspond aux **sujets prématurés** et constitue donc la variable indépendante. Ils ont été recrutés à partir d'une cohorte existante qui comprenait initialement 254 enfants nés avant 29 SA et ayant survécu jusqu'au congé de l'hôpital (taux de survie de 55%). L'AG était calculé selon la date des dernières menstruations ou d'après l'échographie obstétricale effectuée avant 24 SA (réalisée en moyenne à  $16,4 \pm 4,1$  SA). L'âge estimé par échographie était en moyenne moins élevé de 3 jours par rapport à celui indiqué par la date des dernières menstruations (Lefebvre, Glorieux et al. 1996). Cette cohorte a été constituée au CHU Ste-Justine de Montréal entre Janvier 1987 et Septembre 1993. Ces enfants aujourd'hui sont devenus de jeunes adultes, ce qui correspond au moment où la capacité optimale des différentes fonctions physiologiques est habituellement atteinte, suite à quoi survient un déclin naturel lié à l'âge (Lakatta 2002).

Le **groupe non exposé** correspond aux **sujets non prématurés** (nés à terme entre 37 et 42 SA). Les contrôles à terme sont recrutés à partir d'une cohorte d'enfants également évalués dans le cadre de projets antérieurs (Nadeau, Tessier et al. 2009), nés au CHU Ste-Justine durant la même période avec un poids de naissance  $\geq 2500$ g. Le groupe était comparable à celui né extrêmement prématuré en termes de sexe, de niveau socio-économique et de structure parentale (mono- versus bi-parentale). Par ailleurs, nous avons également rencontré les contrôles à terme parmi la fratrie ou les amis de jeunes prématurés en suivant les mêmes critères d'inclusion et d'exclusion ci-haut mentionnés (McEniery, Bolton et al. 2011). Il a ainsi été demandé aux sujets prématurés de donner sur une base volontaire, les noms et coordonnées de sujets nés à terme. Ces sujets potentiels ont été

contactés et leur éligibilité à l'étude a été vérifiée suivant les critères définis. La sélection d'un contrôle provenant du même environnement social assure une meilleure comparabilité.

Concernant la population d'étude, les **critères d'inclusion** sont donc une naissance inférieure à 29 SA (groupe exposé) au CHU Sainte-Justine ou à terme (groupe non-exposé) entre 1987-1992. Les **critères d'exclusion** sont une grossesse actuelle étant donné le risque associé aux évaluations, et un handicap neuro-sensoriel sévère empêchant la réalisation des tests.

Ainsi pour l'ensemble de la cohorte, les participants ont été suivis par notre équipe à plusieurs reprises au cours de leur développement. Dans les études précédentes sur cette cohorte, les enfants témoins étaient équivalents aux prématurés quant au ratio garçon/fille, à leur âge, à l'âge des parents et au statut familial à la naissance (Nadeau, Boivin et al. 2001, Nadeau, Tessier et al. 2004, Nadeau, Tessier et al. 2009). Pour le présent projet, 20 prématurés ont été contactés parmi les 180 revus actuellement, ainsi que 20 témoins. Leurs caractéristiques néonatales sont comparables à la cohorte de base.

Enfin, ce projet de recherche a reçu l'approbation du comité d'éthique de la recherche du CHU Sainte-Justine. Les normes éthiques définies par la déclaration d'Helsinki ont été suivies pendant l'ensemble du déroulement de ce projet de recherche. Le consentement éclairé et écrit a été recueilli pour chaque patient de l'étude. Les dossiers de recherche et la base de données informatique étaient anonymisés. Notre travail a été réalisé dans le respect de la confidentialité. Les infirmières de recherche responsables du recrutement des patients dans l'étude, du recueil du consentement et du suivi des patients étaient toutes certifiées et expérimentées en recherche clinique.

Les variables dépendantes sont les paramètres de rigidité vasculaire étudiés, à savoir les marqueurs directs de rigidité ( $E_p$ ,  $\beta SI$ ) et les marqueurs indirects de rigidité (VOP,  $Z_i$  et  $Z_c$ ).

## **CHAPITRE 4 : RESULTATS : PRÉSENTATION DES ARTICLES**

**Premier Article :**

**Markers of vascular senescence in rats following transient neonatal high oxygen exposure.**



## **Contribution de chaque auteur aux travaux de recherche présentés dans cet article**

Fanny Huyard a réalisé les plans expérimentaux et exécuté la majorité des expériences ainsi que l'analyse des données. Le Dr Catherine Zydorczyk a contribué aux expériences d'angiogenèse et de raréfaction capillaire. Le Dr Frank Cloutier a mis au point les expériences de marquage du 53BP1. Le Dr Mariane Bertagnolli, Anik Cloutier, Catherine Fallaha et Zachary Anstey ont participé à la réalisation de certaines expériences animales et d'histologie, et à la discussion des résultats. Fanny Huyard a rédigé la totalité du manuscrit. Le Dr Nuyt a corrigé le manuscrit.

**Etat de publication : Resoumission prochaine (expériences complémentaires des protéines de sénescence)**

### **Contexte de l'étude**

Les bébés prématurés, environ 8% des naissances, ont des défenses antioxydantes diminuées par rapport aux nouveau-nés à terme et sont exposés à la naissance à des concentrations élevées en O<sub>2</sub> par rapport au milieu intra-utérin. Le laboratoire a précédemment démontré qu'un stress hyperoxique néonatal conduit chez le rat adulte à de l'HTA, une dysfonction endothéliale et une rigidité artérielle, qui sont des éléments caractéristiques de vieillissement vasculaire.

## **Objectifs**

L'objectif de cette étude est d'élucider les mécanismes pouvant être incriminés dans ces changements vasculaires en étudiant des indices de sénescence cellulaire après un stress hyperoxique comme la diminution du taux de prolifération cellulaire, la présence de dommage à l'ADN et le niveau d'expression de protéines de sénescence.

## **Méthodes**

Des rats Sprague-Dawley ont été exposés à 80% O<sub>2</sub> vs air ambiant du 3<sup>e</sup> au 10<sup>e</sup> jour de vie (P10). À P10, l'aorte et le muscle tibial ont été prélevés pour étudier l'angiogenèse (segments d'aorte en matrigel) et la densité microvasculaire. Des aortes ont été également prélevées pour étudier la prolifération cellulaire (incorporation de bromodeoxyuridine (BrdU) détectée par immunofluorescence à P10, les bris à l'ADN (suppresseur de tumeur p53 se liant à la protéine 1 (53BP1) par immunofluorescence et test des comètes), et la sénescence (p53, p16 et p21 par immunofluorescence) à P10, 4W et à 16W. Des Westerns Blots de Bax et Bcl2 ont également été effectués à P10 afin d'évaluer l'apoptose ainsi que des Western Blots des protéines de sénescence p16, p21, P53 et pRb à P10, 4W et 16W.

## **Résultats**

À P10, les rats exposés à 80% O<sub>2</sub> vs .contrôles ont un défaut d'angiogénèse, ainsi qu'une raréfaction microvasculaire et présentent également au niveau aortique une diminution de la prolifération cellulaire sans augmentation des niveaux d'expression de Bax et Bcl2. Ces animaux présentent également à P10, à 4W et à 16W une augmentation

des dommages à l'ADN (augmentation des foci nucléaires de 53BP1 et de la fréquence des comètes au niveau de l'ADN). De plus, l'expression de protéines de sénescence est significativement augmentée au niveau aortique immédiatement après l'exposition à l'O<sub>2</sub> en période néonatale et à long terme.

### **Conclusion**

Nous avons montré dans cette étude qu'une hyperoxie néonatale conduit à un des dommages persistant de l'ADN, ainsi qu'en une augmentation de protéines de sénescence au niveau aortique présents dès l'âge de P10 (immédiatement après l'exposition néonatale à l'O<sub>2</sub>). De plus, dans ce même modèle animal, une diminution de la prolifération cellulaire et de la capacité angiogénique au niveau aortique a été montrée ainsi qu'une raréfaction microvasculaire à l'âge de P10. Par conséquent, ces données suggèrent un vieillissement vasculaire prématuré, précédant l'hypertension et les dysfonctions vasculaires retrouvées à l'âge adulte dans notre modèle animal, et pourraient donc y contribuer.

**MARKERS OF VASCULAR SENESENCE IN RATS FOLLOWING TRANSIENT  
NEONATAL HIGH OXYGEN EXPOSURE**

Fanny Huyard, Catherine Zyzdorzcyk, Mariane Bertagnolli, Anik Cloutier, Catherine Fallaha, Frank Cloutier, Zachary Anstey, Anne Monique Nuyt

Department of Pediatrics, Ste-Justine University Hospital and Research Center, 3175 chemin de la Côte Sainte-Catherine, H3T 1C5 Montréal (Québec), Canada.

CY current address: UMR 7561 CNRS Université de Lorraine, "PPIA" Faculté de Médecine, 9, avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre lès Nancy, France

FC current address: Department of Biology, Moncton University, E1A 3E9 (New Brunswick), Canada

**Running head:** Neonatal Oxygen Exposure and Vascular Senescence

**Word Count:** 6183

**Abstract:** 256

**Figures:** 5

**Corresponding author and address for reprint requests:**

Anne Monique Nuyt, MD

Sainte-Justine University Hospital Research Center

3175 chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montreal (Quebec), Canada, H3T 1C5

Telephone number: [REDACTED]

Fax number: [REDACTED]

## **Abstract**

Objective: Preterm infants have decreased antioxidant defenses and are exposed upon birth and secondary to intensive care therapies, to high levels of oxygen (O<sub>2</sub>) compared to the intrauterine environment. We have shown that neonatal high-O<sub>2</sub> exposure leads to elevated blood pressure, endothelial dysfunction and arterial rigidity in adult rats, all characteristic of vascular ageing. The purpose of this study was to determine whether transient neonatal high-O<sub>2</sub> exposure leads to indices of premature vascular ageing.

Methods and Results: 10 day old pups exposed to 80% O<sub>2</sub> day 3-10 of life showed reduced aorta cell proliferation without increased apoptosis (Bax/Bcl2), reduced angiogenic capacity, and decreased peripheral microvascular density. Increased DNA damage (evaluated by Comet assay for DNA integrity and the tumour suppressor p53 binding protein 1 for DNA repair element) were present in aorta from O<sub>2</sub>-exposed vs. controls at P10, at 4 weeks and in adulthood (at 16 weeks). At P10, expression of p16 (by both immunofluorescence and western blot), p21 and pRb (by western blots) and p53 (by immunofluorescence) were significantly increased. At 4 weeks, expression of p16, p21 and p53 were slightly increased (by immunofluorescence) but no significant difference by western blots, whereas in adulthood, aortas from O<sub>2</sub>-exposed rats showed increased expression of p16 (immunofluorescence), p53 (both immunofluorescence and western blot) and pRb (western blot).

Conclusion: Current data demonstrates that a transient neonatal O<sub>2</sub> exposure leads to persistent vascular senescence markers. These phenomena of premature ageing could contribute to the development of cardiovascular diseases in later life, particularly in susceptible individuals such as subjects born preterm.

Key words: Vessels, Ageing, Oxygen, Hypertension, Preterm birth, DNA damage

## **Introduction**

Conditions during early life (pre- and early postnatal) can significantly impact adult health and disease, particularly the cardiovascular system with increased incidence of hypertension (63)(27)(6)(44). This concept of “developmental programming” of hypertension is described in various populations and seems to amplify with age (34). Among the many factors implicated in adverse perinatal conditions and later life hypertension, oxidative stress is an important common denominator. Preterm infants, who represent 8% of newborns, have decreased antioxidant defenses compared to babies born at term (56) and are exposed to high levels of oxygen (O<sub>2</sub>) both in intensive care and as compared to the intrauterine environment (54).

We have previously shown that O<sub>2</sub> exposure of newborn rats, a well-established model of prematurity-related oxygen injury, has long term systemic vascular consequences leading in early adulthood to elevated blood pressure, endothelial dysfunction and increased vascular stiffness in addition to microvascular rarefaction (41, 65, 67). The cellular mechanisms whereby brief neonatal oxidative injury results in long term vascular functional and structural changes are unknown but the spectrum of these cardiovascular manifestations evokes characteristic elements of vascular ageing. Vascular ageing is characterized by functional and structural impairment, increased vascular stiffness and endothelial dysfunction (42). Accelerated (early) vascular ageing contributes significantly to the increasing incidence of cardiovascular diseases in the younger adult population.

Oxygen levels play key roles in vascular development (20). Consequences of *hypoxia* (low oxygen tension) on vascular growth have been widely studied (38). Impact of *hyperoxia* on short term vascular development has been examined mostly in the eyes (retina) and the

lungs, whereas few studies have addressed long term systemic vascular consequences of hyperoxic stress during the neonatal period (38, 57, 66). The fact that O<sub>2</sub> can be toxic has been recognized in the late 19<sup>th</sup> century and the formal demonstration that O<sub>2</sub> toxicity results from an increase in the rate of reactive oxygen species (ROS) generation in living cells was reported in 1954 (19). Subsequently, Harman has proposed the broadly known theory that ageing is a process characterized by accumulation of oxidant-related damage (24). ROS, particularly superoxide anions ( $\bullet\text{O}^{2-}$ ) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) can directly cause DNA strand breaks and DNA base modifications (13, 25, 45, 49, 62), a hallmark of cellular ageing.

Following DNA damage, a DNA-damage response is activated which initially arrests cell-cycle progression and cell division, and triggers DNA repair elements. How a cell “chooses” between a transient and a permanent arrest (senescence) state is not known. Recognized markers of senescent cells include multiplication arrest and lack of DNA replication, DNA-damage, and increased gene expression of cell cycle inhibitors (12). We hypothesized that a transient neonatal hyperoxic stress leads to premature vascular ageing, with impaired vascular cell proliferation, DNA damage and expression of senescence proteins which persist beyond the neonatal period into adulthood.



## **Methods**

### **Animals**

Animals were used according to a protocol approved by the Animal Care Committee of Ste-Justine University Hospital and Research Center in accordance with the principles in the Guide for the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care and 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). Sprague-Dawley rat pups (Charles River, St-Constant, QC, Canada) were maintained (with dam) either in a hyperoxic environment (80% O<sub>2</sub> by a mixture of medical grade 100% O<sub>2</sub> and room air, oxycycler ProOx model 110, Biosherix, Lacona, NY 13083) from the 3<sup>rd</sup> (P3) to the 10<sup>th</sup> (P10) day of life (O<sub>2</sub>-exposed group, n=3 litters), or in room air (control group, n=3 litters). Animals were weaned at 4 weeks; survival of the pups, their growth and food intake were similar between groups. Male rats were sacrificed and studied at P10 (immediately after O<sub>2</sub> exposure), at 4 weeks (before blood pressure elevation (66)) and at 16 weeks (adults). No more than 2-3 animals per litter were used for each series of studies.

### **Experimental Protocol for *in vivo* proliferation assay in vascular cells**

BromodeoxyUridine (BrdU; 100mg/kg IP of body weight; Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) was administered to the pups of O<sub>2</sub>-exposed and control groups (n=2 additional litters each) at P9 (24 hours before sacrifice). Four different pictures (x40) from each artery were randomly selected, and the number of BrdU-labeled nuclei and DAPI-labeled nuclei were counted in each field by a single blinded observer. Vascular cells proliferation was measured by calculating positive BrdU nuclei as follows: (BrdU-labeled nuclei)/(total nuclei) x 100 (17).

### **Apoptosis assay on aorta**

Proteins from P10 aortic lysates were used to perform these assays (please see in the supplement available online at the *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* website).

### **Rat aortic ring assay**

To examine angiogenic potential, the microvascular network arising from P10 aortic rings cultured in three-dimensional matrix gel (in room air) was studied as previously described (7) (please see in the supplement available online at the *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* website).

### **Microvascular density**

Morphological measurements of microvascular density were performed on tibialis anterior muscle sections from P10 O<sub>2</sub>-exposed vs. control male pups, as previously described (47). These studies were designed to evaluate whether capillary rarefaction is present very early or prior to the blood pressure elevation process, as reported in another model of developmental programming of elevated blood pressure (11, 47).

### **DNA damage assessment in aorta of P10, 4- and 16 weeks animals**

***DNA integrity assessment by Comet Assay (43):*** DNA integrity in aorta of P10, 4- and 16 weeks animals was examined by “single-cell electrophoresis Comet assay” (OxiSelect Comet Assay kit; Cell Biolabs, Inc, San Diego, CA) using the manufacturer’s protocol. DNA integrity was quantified by adapting the method described by Guo *et al.*(21) At least fifty cells were analyzed from each aorta.

***Immunostaining for DNA repair element p53-binding protein-1(53BP1):*** A recognized marker of senescent cells is DNA-damaged foci, which associates with proteins such as

(53BP1) (12) evaluated by immunohistofluorescence on aorta sections (Please see in the supplement available online at the *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* website).

### **Senescence-associated proteins expression**

Increased gene expression of cell cycle inhibitors, such as p16, p21, p53 and pRb (10, 12) are characteristic elements of senescent cells. Expression of p16, p21 and p53 in aorta of O<sub>2</sub>-exposed vs. control animals were evaluated by immunofluorescence of aorta sections and western blotting, and of pRb by Western blotting (please see in the supplement available online at the *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* website).

### **Statistical analysis**

Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Analyses of differences between groups were performed with two-tailed Student's *t* test using the Prism 4 program (GraphPad, San Diego, CA). Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## **Results**

### **Effect of high O<sub>2</sub> exposure on developing vascular cells proliferation**

At P10, BrdU incorporation (indices of cell proliferation rate) in aorta of O<sub>2</sub>-exposed pups was significantly reduced compared to control (Figure 1B). Aortic expressions of Bax (pro-apoptotic protein) and Bcl2 (anti-apoptotic protein), as well as their ratio, were not different between groups (Figure 1C, 1D).

### **Effect of high O<sub>2</sub> exposure on angiogenic capacity and on microvascular density**

Angiogenic capacity was investigated using the aortic ring assay (Figure 2A). In this assay, vessel-like structures grow over a four day culture period in control conditions (normoxia). The area of new vessels sprouting from the aortic rings from O<sub>2</sub>-exposed P10 animals was significantly decreased compared to aorta from control animals (Figure 2A). Capillary density in the tibialis anterior muscle was significantly reduced (by  $\approx 30\%$ ) in P10 O<sub>2</sub> exposed vs. control pups (Figure 2B).

### **Effect of high O<sub>2</sub> exposure on vascular cell DNA damage**

At P10, aorta from O<sub>2</sub> exposed rats showed an increase in 53BP1 nuclear foci density; in 4- and 16 weeks old animals, immunostaining for 53BP1 nuclear foci remained elevated vs. controls (Figure 3A). The effect of high O<sub>2</sub> exposure on DNA integrity was further examined at P10, 4 weeks and 16 weeks using the Comet single cell electrophoresis assay. Figure 3C presents representative microphotographs of nuclei with Class I, II and III DNA double strand breaks. Nuclei without “comet tail” (Class I) are considered with none or few DNA double strand breaks. When DNA damage is present, small DNA fragments can migrate from the nuclei creating a fluorescence tail along the electric field. The length of the tail (i.e. reflection of the extent of the DNA damage) defines class II and class III (see

Figure 3C and (21)). At P10, characteristic images of comets were observed in vascular cells from aorta of O<sub>2</sub>-exposed animals but very few in cells from control animals. At 4 and 16 weeks, images of comets were detected in both groups, but markedly more prominent in cells from O<sub>2</sub>-exposed animals (Figure 3B). Table 1 shows the percentages of class I, class II and class III nuclei at P10, 4- and 16 weeks in both groups. Class III were significantly more prevalent among cells obtained from aorta of O<sub>2</sub>-exposed animals at P10; the significantly increased proportion of Class III cells remained at 4W and 16W.

#### **Effect of high O<sub>2</sub> exposure on vascular expression of senescence-associated proteins**

Immediately after O<sub>2</sub> exposure (P10), expression of p16 (by both immunofluorescence, Figure 4A and western blot, Figure 5A), p21 and pRb (by western blots, Figure 5B and 5D) and p53 (by immunofluorescence, Figure 4 B) were significantly ( $p < 0.05$ ) increased. At 4 weeks, expression of p16, p21 and p53 were slightly increased (by immunofluorescence, Figure 4A, B, and C; no significant difference by western blots, Figure 5A, B, and C) whereas in adulthood (at 16 weeks), aortas from O<sub>2</sub>-exposed rats showed increased expression of p16 (immunofluorescence, Figure 4A), p53 (both immunofluorescence and western blot, Figure 4B and 5C) and pRb (western blot, Figure 5D).

## **Discussion**

Findings from the current study demonstrate that a transient neonatal exposure to high O<sub>2</sub> results in persistent DNA damage, increased expression of senescence-associated markers in aorta, decreased vascular cell proliferation and angiogenic capacity, and in microvascular rarefaction. These elements suggest that premature vascular ageing precedes the blood pressure elevation and vascular dysfunction reported in this model (66), and may contribute to their development. Even though the association between oxidative stress and ageing is not novel (23), the fact that a brief transient exposure to oxidative conditions in neonatal life can lead to accelerated vascular senescence preceding the blood pressure elevation observed in this model and sustained into adulthood had not, to our knowledge, been demonstrated.

To verify whether decreased proliferation rate of vascular cells induced by hyperoxic conditions were not associated with apoptosis, Bax and Bcl2 aortic protein expression was examined. Our results show that O<sub>2</sub> exposure at the concentration/duration used in the current experimental design did not induce significant apoptosis. This observation suggests that reduced proliferation rate in vascular cells exposed to O<sub>2</sub> results rather from significantly slower or arrested growth, a hallmark of senescence. Supporting these findings, Uno *et al.* report disruption of retinal vasculature development and arrested endothelial cell proliferation with minimal apoptosis immediately following neonatal exposure to hyperoxia (57). Decreased proliferation rate after exposure to high concentration of O<sub>2</sub> has also been reported in respiratory system cells (tracheal smooth muscle cells (1) and human lung fibroblasts in culture (32)); in the latter study by Klimova *et al.*, cell death was not significantly increased by hyperoxic conditions, comparable to

current data. Alternatively, high levels of O<sub>2</sub> can halt vascular growth through inhibition of hypoxia inducible factor/vascular endothelial growth factor-induced pathway *in vivo*, which could underlie the capillary rarefaction observed at P10. However, the differences observed in the aortic ring assay rather indicate impaired angiogenic capacity as the culture conditions including growth factors were identical in both groups.

As apoptosis was likely not responsible for the decreased cell proliferation observed after O<sub>2</sub> exposure, we carried out further experiments to examine characteristic elements of senescence. In addition to decreasing cell proliferation rate, stress-induced senescence was associated with DNA damage. The latter can be directly induced by DNA-damaging agents and oxidative (i.e. in current experiment high O<sub>2</sub> conditions) stimuli (16, 61). Following DNA damage, a senescence program can be activated with expression of DNA repair elements and induction of so-called “senescence proteins”. DNA repair factors such as the tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) (46, 50), present in the cytoplasm and the nucleus(28), form discrete nuclear foci discernible by immunofluorescence (48). Both “comet assay” (assessing DNA integrity) and 53BP1 foci indicate that transient neonatal high O<sub>2</sub> exposure lead to DNA damage which was still detected at 4 weeks (prior to blood pressure increase) and into adulthood.

53BP1 can enhance p53-mediated transcriptional activation, which can trigger cellular senescence (permanent growth arrest) or apoptosis when damage is more pronounced. Senescent vascular cells express negative cell cycle regulators p16<sup>INK4a</sup> (p16), and p21(40), regulated by p53 protein(12). Current results show an increase in the expression of p16 and p53 in aorta immediately following high O<sub>2</sub>-exposure (P10). Immunohistology data indicate that p16 and p53 remained significantly increased at 4 weeks and in adults (16

weeks). p21 expression however was not different compared to control at P10 and at 16 weeks, and slightly increased at 4 weeks; this could be related to the fact that the magnitude of the p21 expression increase in cells from ageing tissues is reported not as important as that of p16 and normalizes rapidly after DNA damage(33). Persistent DNA damage foci and increased p16 expression are considered two highly reliable hallmarks of ageing (33, 36, 68) and both were present in aorta from O<sub>2</sub>-exposed vs. control animals at all ages studies. Therefore, these results suggest that neonatal exposure to high O<sub>2</sub> induces premature senescence markers in vascular cells through DNA damage, p53 signalling, and persistent up-regulation of p16, associated with a decreased cell proliferation. Expression of pRb is also increased in aorta from O<sub>2</sub>-exposed vs. control animals as reported in a previous study of vascular senescence in aorta of hypertensive rats (2).

Along with elevated blood pressure, vascular dysfunction and increased stiffness observed in O<sub>2</sub>-exposed animals (41, 65, 67), this supports the postulate that neonatal high O<sub>2</sub>-exposure could lead to premature vascular ageing. Supporting the current results, increased immunostaining for DNA damage was shown in the brain of 5-day old mice exposed to a brief period of hyperoxia (22) and a recent study reports that neonatal high O<sub>2</sub>-exposure can reduce life span (64), consistent with premature/accelerated ageing. In another model of developmental programming of hypertension (associated with exposure to a low protein diet during gestation), low birth weight pups demonstrate increased renal immunostaining for p16 from weaning to adulthood (37); interestingly for current results, we reported in the later model that neonatal oxidative stress plays also a key role in programming elevated blood pressure and vascular dysfunction (11).



Infants are exposed upon birth to relatively high concentrations of O<sub>2</sub> compared to intrauterine life. Indeed, under physiologic conditions the fetus is hypoxic compared with the adult. While human maternal arterial pO<sub>2</sub> is approximately 90 mmHg, the highest arterial or venous pO<sub>2</sub> in the late gestation foetus rarely exceeds 30 mmHg. In the fetal to neonatal transition blood O<sub>2</sub> content and O<sub>2</sub> availability abruptly increase in the first few minutes after birth to adult values eliciting the generation of a burst of O<sub>2</sub> free radicals (14)(26)(58). Premature and small for gestational age infants have lower and less inducible antioxidant defences because it is only during the last trimester of a normal pregnancy that antioxidant enzyme levels increase (3, 4, 18, 29, 35, 52, 54). Therefore the combination of immature antioxidant system to face this surge in pO<sub>2</sub> plus the need for therapy with O<sub>2</sub> supplementation because of lung immaturity, unstable lung dynamics, sepsis etc. altogether can lead to significant oxidative stress in the immediate neonatal period (59)(60)(5). In immature newborns, exposure to supplemental O<sub>2</sub> can halt microvessel growth in the lung and retina leading to serious short term complications such as bronchopulmonary dysplasia and retinopathy of prematurity (53, 55). The possible long term vascular consequences of preterm birth are only starting to be explored: former preterm adolescents and young adults display higher systolic blood pressure than controls (8, 15, 30, 31), endothelial dysfunction (9) and increased arterial stiffness (39, 51) , a vascular phenotype compatible with premature ageing.

**Perspectives:**

Our data demonstrate that a neonatal hyperoxic stress induces a decreased proliferation rate, DNA damage and expression of senescence markers in vascular cells. The association between oxidative stress and ageing is well recognized in the literature, but the fact that a brief-transient exposure to oxidative conditions in neonatal life can lead to accelerated vascular cell senescence, perpetuated into adulthood and associated with cardiovascular changes such as elevated blood pressure (66) and arterial rigidity (41) had not been previously demonstrated. The current data builds on our understanding of the mechanisms underlying major health issues: the impact of O<sub>2</sub>-related damage in prematurity on cardiovascular risks in adulthood and the overall concept of developmental programming of hypertension.

**Sources of funding**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (106554) and the Heart and Stroke Foundation of Canada. Fanny Huyard was supported by a fellowship from the- Quebec Training Network in Perinatal Research (Canadian Institutes of Health Research). Anne Monique Nuyt was supported by a salary award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

**Disclosure**

None.

**Contributors:**

Fanny Huyard contributed to the major conception and design of the study. Dr. Yzydorczyk realized angiogenic experiments and capillary rarefactions. Dr Cloutier set up experiments with 53BP1 staining. Fanny Huyard wrote all the manuscript and Anne Monique Nuyt corrected the article. Fanny Huyard, Catherine Yzydorczyk, Mariane Bertagnolli, Anik Cloutier, Catherine Fallaha, Frank Cloutier, Zachary Anstey, Anne Monique Nuyt contributed to the analysis and interpretation of data and revised the article critically for important intellectual content and approved the final version of the manuscript submitted for publication.

## References

1. **Absher M, Makrides W, Shapiro P, and Evans JN.** Hyperoxia inhibits proliferation of cultured rat tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 267: L101-105, 1994.
2. **Adijiang A, Higuchi Y, Nishijima F, Shimizu H, and Niwa T.** Indoxyl sulfate, a uremic toxin, promotes cell senescence in aorta of hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 399: 637-641, 2010.
3. **Asikainen TM, Heikkila P, Kaarteenaho-Wiik R, Kinnula VL, and Raivio KO.** Cell-specific expression of manganese superoxide dismutase protein in the lungs of patients with respiratory distress syndrome, chronic lung disease, or persistent pulmonary hypertension. *PediatrPulmonol* 32: 193-200, 2001.
4. **Asikainen TM, Raivio KO, Saksela M, and Kinnula VL.** Expression and developmental profile of antioxidant enzymes in human lung and liver. *AmJRespirCell MolBiol* 19: 942-949, 1998.
5. **Asikainen TM and White CW.** Pulmonary antioxidant defenses in the preterm newborn with respiratory distress and bronchopulmonary dysplasia in evolution: implications for antioxidant therapy. *AntioxidRedoxSignal* 6: 155-167, 2004.
6. **Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, and Wadsworth ME.** Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298: 564-567, 1989.
7. **Blacher S, Devy L, Burbridge MF, Roland G, Tucker G, Noel A, and Foidart JM.** Improved quantification of angiogenesis in the rat aortic ring assay. *Angiogenesis* 4: 133-142, 2001.

8. **Boivin A, Luo ZC, Audibert F, Masse B, Lefebvre F, Tessier R, and Nuyt AM.** Pregnancy complications among women born preterm. *CMAJ* 184: 1777-1784, 2012.
9. **Bonamy AK, Bendito A, Martin H, Andolf E, Sedin G, and Norman M.** Preterm birth contributes to increased vascular resistance and higher blood pressure in adolescent girls. *Pediatr Res* 58: 845-849, 2005.
10. **Bringold F and Serrano M.** Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 35: 317-329, 2000.
11. **Cambonie G, Comte B, Zydorczyk C, Ntimbane T, Germain N, Le NL, Pladys P, Gauthier C, Lahaie I, Abran D, Lavoie JC, and Nuyt AM.** Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1236-R1245, 2007.
12. **Campisi J and d'Adda di Fagagna F.** Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology* 8: 729-740, 2007.
13. **Chen Q and Ames BN.** Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4130-4134, 1994.
14. **Comporti M, Signorini C, Leoncini S, Buonocore G, Rossi V, and Ciccoli L.** Plasma F2-isoprostanes are elevated in newborns and inversely correlated to gestational age. *Free Radic Biol Med* 37: 724-732, 2004.
15. **de Jong F, Monuteaux MC, van Elburg RM, Gillman MW, and Belfort MB.** Systematic review and meta-analysis of preterm birth and later systolic blood pressure. *Hypertension* 59: 226-234, 2012.

16. **Farhat N, Thorin-Trescases N, Voghel G, Villeneuve L, Mamarbachi M, Perrault LP, Carrier M, and Thorin E.** Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers. *CanJPhysiol Pharmacol* 86: 761-769, 2008.
17. **Gennaro G, Menard C, Giasson E, Michaud SE, Palasis M, Meloche S, and Rivard A.** Role of p44/p42 MAP kinase in the age-dependent increase in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23: 204-210, 2003.
18. **Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Varga IS, Kovacs A, Kovacs L, and Laszlo A.** Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *EurJ ObstetGynecolReprodBiol* 103: 136-139, 2002.
19. **Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, and Fenn WO.** Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119: 623-626, 1954.
20. **Giaccia AJ, Simon MC, and Johnson R.** The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes & development* 18: 2183-2194, 2004.
21. **Guo Z, Van Remmen H, Yang H, Chen X, Mele J, Vijg J, Epstein CJ, Ho YS, and Richardson A.** Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21: 1131-1138, 2001.
22. **Handley S, Sola, A., Wang, X., Wen, T.C., Genetta, T., Moore, J., and Rogido, M.** Hyperoxia causes oxidative stress and increases neural stem cells proliferation in the murine developing brain. *Pediatric Research* 5168, 2006.

23. **Harman D.** Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* 11: 298-300, 1956.
24. **Harman D.** The biologic clock: the mitochondria? *JAmGeriatrSoc* 20: 145-147, 1972.
25. **Honda S, Hjelmeland LM, and Handa JT.** Oxidative stress--induced single-strand breaks in chromosomal telomeres of human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Invest OphthalmolVisSci* 42: 2139-2144, 2001.
26. **House JT, Schultetus RR, and Gravenstein N.** Continuous neonatal evaluation in the delivery room by pulse oximetry. *JClinMonit* 3: 96-100, 1987.
27. **Ingelfinger JR and Woods LL.** Perinatal programming, renal development, and adult renal function. *AmJHypertens* 15: 46S-49S, 2002.
28. **Iwabuchi K, Li B, Massa HF, Trask BJ, Date T, and Fields S.** Stimulation of p53-mediated transcriptional activation by the p53-binding proteins, 53BP1 and 53BP2. *J Biol Chem* 273: 26061-26068, 1998.
29. **Jankov RP, Negus A, and Tanswell AK.** Antioxidants as therapy in the newborn: some words of caution. *PediatrRes* 50: 681-687, 2001.
30. **Keijzer-Veen MG, Dulger A, Dekker FW, Nauta J, and van der Heijden BJ.** Very preterm birth is a risk factor for increased systolic blood pressure at a young adult age. *Pediatr Nephrol* 25: 509-516, 2010.
31. **Kistner A, Jacobson L, Jacobson SH, Svensson E, and Hellstrom A.** Low gestational age associated with abnormal retinal vascularization and increased blood pressure in adult women. *Pediatr Res* 51: 675-680, 2002.

32. **Klimova TA, Bell EL, Shroff EH, Weinberg FD, Snyder CM, Dimri GP, Schumacker PT, Budinger GR, and Chandel NS.** Hyperoxia-induced premature senescence requires p53 and pRb, but not mitochondrial matrix ROS. *FASEB J* 23: 783-794, 2009.
33. **Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, and Sharpless NE.** Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *JClinInvest* 114: 1299-1307, 2004.
34. **Law CM, de SM, Osmond C, Fayers PM, Barker DJ, Cruddas AM, and Fall CH.** Initiation of hypertension in utero and its amplification throughout life. *BMJ* 306: 24-27, 1993.
35. **Ledo A, Arduini A, Asensi MA, Sastre J, Escrig R, Brugada M, Aguar M, Saenz P, and Vento M.** Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants. *AmJClinNutr* 89: 210-215, 2009.
36. **Liu Y, Sanoff HK, Cho H, Burd CE, Torrice C, Ibrahim JG, Thomas NE, and Sharpless NE.** Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell* 8: 439-448, 2009.
37. **Luyckx VA, Compston CA, Simmen T, and Mueller TF.** Accelerated senescence in kidneys of low-birth-weight rats after catch-up growth. *AmJPhysiol Renal Physiol* 297: F1697-F1705, 2009.
38. **Maltepe E and Simon MC.** Oxygen, genes, and development: an analysis of the role of hypoxic gene regulation during murine vascular development. *J Mol Med (Berl)* 76: 391-401, 1998.



39. **McEniery CM, Bolton CE, Fawke J, Hennessy E, Stocks J, Wilkinson IB, Cockcroft JR, and Marlow N.** Cardiovascular consequences of extreme prematurity: the EPICure study. *J Hypertens* 29: 1367-1373, 2011.
40. **Minamino T and Komuro I.** Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ Res* 100: 15-26, 2007.
41. **Mivelaz Y, Zyzdorzcyk C, Barbier A, Cloutier A, Fouron JC, de Blois D, and Nuyt AM.** Neonatal oxygen exposure leads to increased aortic wall stiffness in adult rats: a Doppler ultrasound study. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 2: 184-189, 2011.
42. **Nilsson PM, Boutouyrie P, and Laurent S.** Vascular aging: A tale of EVA and ADAM in cardiovascular risk assessment and prevention. *Hypertension* 54: 3-10, 2009.
43. **Olive PL and Banath JP.** Radiation-induced DNA double-strand breaks produced in histone-depleted tumor cell nuclei measured using the neutral comet assay. *Radiat Res* 142: 144-152, 1995.
44. **Osmond C, Barker DJ, Winter PD, Fall CH, and Simmonds SJ.** Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ* 307: 1519-1524, 1993.
45. **Passos JF, Saretzki G, and von ZT.** DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Res* 35: 7505-7513, 2007.
46. **Peterson CL and Cote J.** Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev* 18: 602-616, 2004.
47. **Pladys P, Sennlaub F, Brault S, Checchin D, Lahaie I, Le NL, Bibeau K, Cambonie G, Abran D, Brochu M, Thibault G, Hardy P, Chemtob S, and Nuyt AM.** Microvascular rarefaction and decreased angiogenesis in rats with fetal programming of

hypertension associated with exposure to a low protein diet in utero. *Am J Physiol RegulIntegrComp Physiol* 289: R1580-R1588, 2005.

48. **Rappold I, Iwabuchi K, Date T, and Chen J.** Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *JCell Biol* 153: 613-620, 2001.

49. **Richter T and von ZT.** A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *ExpGerontol* 42: 1039-1042, 2007.

50. **Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, and Bonner WM.** DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *JBiol Chem* 273: 5858-5868, 1998.

51. **Rossi P, Tauzin L, Marchand E, Boussuges A, Gaudart J, and Frances Y.** Respective roles of preterm birth and fetal growth restriction in blood pressure and arterial stiffness in adolescence. *J Adolesc Health* 48: 520-522, 2011.

52. **Saik LA, Hsieh HL, Baricos WH, and Shapira E.** Enzymatic and immunologic quantitation of erythrocyte superoxide dismutase in adults and in neonates of different gestational ages. *PediatrRes* 16: 933-937, 1982.

53. **Saugstad OD.** Optimal oxygenation at birth and in the neonatal period. *Neonatology* 91: 319-322, 2007.

54. **Saugstad OD.** Oxidative stress in the newborn--a 30-year perspective. *Biol Neonate* 88: 228-236, 2005.

55. **Thebaud B, Ladha F, Michelakis ED, Sawicka M, Thurston G, Eaton F, Hashimoto K, Harry G, Haromy A, Korbitt G, and Archer SL.** Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents

alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization. *Circulation* 112: 2477-2486, 2005.

56. **Thibeault DW.** The precarious antioxidant defenses of the preterm infant. *Am J Perinatol* 17: 167-181, 2000.

57. **Uno K, Merges CA, Grebe R, Luty GA, and Prow TW.** Hyperoxia inhibits several critical aspects of vascular development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236: 981-990, 2007.

58. **Vento M, Asensi M, Sastre J, Lloret A, Garcia-Sala F, Minana JB, and Vina J.** Hyperoxemia caused by resuscitation with pure oxygen may alter intracellular redox status by increasing oxidized glutathione in asphyxiated newly born infants. *SeminPerinatol* 26: 406-410, 2002.

59. **Vento M, Moro M, Escrig R, Arruza L, Villar G, Izquierdo I, Roberts LJ, Arduini A, Escobar JJ, Sastre J, and Asensi MA.** Preterm Resuscitation With Low Oxygen Causes Less Oxidative Stress, Inflammation, and Chronic Lung Disease. *Pediatrics*, 2009.

60. **Vina J, Vento M, Garcia-Sala F, Puertes IR, Gasco E, Sastre J, Asensi M, and Pallardo FV.** L-cysteine and glutathione metabolism are impaired in premature infants due to cystathionase deficiency. *AmJClinNutr* 61: 1067-1069, 1995.

61. **Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Nguyen A, Villeneuve L, Mamarbachi AM, Fortier A, Perrault LP, Carrier M, and Thorin E.** Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *MechAgeing Dev* 128: 662-671, 2007.

62. **von Zglinicki T, Pilger R, and Sitte N.** Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 28: 64-74, 2000.
63. **Warner MJ and Ozanne SE.** Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *The Biochemical journal* 427: 333-347, 2010.
64. **Yee M, White RJ, Awad HA, Bates WA, McGrath-Morrow SA, and O'Reilly MA.** Neonatal hyperoxia causes pulmonary vascular disease and shortens life span in aging mice. *The American journal of pathology* 178: 2601-2610, 2011.
65. **Zydorczyk C, Comte B, Cambonie G, Lavoie J, Germain N, Ting Shun Y, Wolff J, Deschepper C, Touyz R, Lelièvre-Pegorier M, and Nuyt A.** Neonatal oxygen exposure in rats leads to cardiovascular and renal alterations in adulthood. *Hypertension* 52: 889-895, 2008.
66. **Zydorczyk C, Comte B, Cambonie G, Lavoie JC, Germain N, Ting SY, Wolff J, Deschepper C, Touyz RM, Lelievre-Pegorier M, and Nuyt AM.** Neonatal oxygen exposure in rats leads to cardiovascular and renal alterations in adulthood. *Hypertension* 52: 889-895, 2008.
67. **Zydorczyk C, Comte B, Huyard F, Cloutier A, Germain N, Bertagnolli M, and Nuyt AM.** Developmental programming of eNOS uncoupling and enhanced vascular oxidative stress in adult rats after transient neonatal oxygen exposure. *J Cardiovasc Pharmacol* 61: 8-16, 2013.
68. **Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, and Sherr CJ.** Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 15: 203-211, 1997.

### Figure Legends:

**Figure 1:** Decreased aorta cell proliferation without apoptosis after O<sub>2</sub> exposure of newborn rats.

**A:** Effect of high oxygen (O<sub>2</sub>) exposure (80% O<sub>2</sub> day 3 to 10 of life) of newborn rats on aortic cell proliferation *in vivo*. Photographs (X40 magnification) of histological sections with anti-BrdU labelling (green dots) of aortas from high O<sub>2</sub>-exposed vs. control animals are shown. Nuclear distribution was confirmed using 4,6-diaminido-2 phenylindole (DAPI). **B:** Bcl-2 and Bax protein expression in aorta from P10 O<sub>2</sub>-exposed vs. control pups assessed by Western blotting (see Methods). **C:** Expression of Bax protein bands divided by corresponding densities for Bcl-2 protein bands. Data are mean ± SEM of n=6, NS: No significant difference between O<sub>2</sub>-exposed vs. control using unpaired t-test.

**Figure 2:** Decreased angiogenic capacity and capillary density after neonatal high O<sub>2</sub> exposure.

**A:** Representative illustrations of neovessels arising from aortic rings after 4 days of culture in three-dimensional matrix gel (X2 magnification). Rings were obtained at P10 from O<sub>2</sub>-exposed vs. control pups. Compiled analysis of the angiogenic potential of aortic rings from O<sub>2</sub>-exposed and control pups (n=6 each group), cultured simultaneously under the same experimental conditions. **B:** Representative illustration of the capillary supply in the tibialis anterior muscle at P10 control and O<sub>2</sub>-exposed male pups (X20 magnification). Capillary endothelial cells were stained with fluorescent tetramethylrhodamine B isothiocyanate-labeled lectin. Compiled capillary density (per mm<sup>2</sup>) in tibialis anterior muscle (n=5 each group). \*: p<0.05 O<sub>2</sub>-exposed vs. control using unpaired t-test. NS: Not significant. †: p<0.01 O<sub>2</sub>-exposed vs. control using unpaired t-test.

**Figure 3:** Neonatal high O<sub>2</sub>-exposure lead to persistent DNA damage in aorta.

**A:** 53BP1 (green) immunostaining of aorta sections from 10 days (P10), 4 weeks (4W) and 16 weeks (16W) old O<sub>2</sub>-exposed (80% from day 3 to 10 of life) vs. control rats. Nuclear localization was confirmed using 4,6-diaminido-2 phenylindole (DAPI) (blue, merged images presented). The microphotographs (X40 magnification) are representative of experiments performed using n=6 animals per group, compiled in the bar graph (see Methods). \*: p<0.001 and †: p<0.05 O<sub>2</sub>-exposed vs. control using unpaired t-test. **B:** Representative microphotographs of Comet single cell electrophoresis assay performed in cells from aortas from O<sub>2</sub>-exposed vs. control P10, 4W and 16W old rats. Arrow heads indicate non-damaged DNA. Arrows indicate DNA fragments (Comet). **C:** Representative Comet images of rat aortic vascular cells (see Methods). Examples of nuclei with class I, class II and class III comet tail are shown.

**Figure 4:** Neonatal high O<sub>2</sub>-exposure increased p16 and p53 senescence-associated proteins expression.

Immunohistochemical staining for senescence proteins p16 (**A**), p53 (**B**), and p21 (**C**) of aorta sections from 10 days (P10), 4 weeks- (4W) and 16 weeks (16W) old rats exposed to O<sub>2</sub> (80% from day 3 to 10 of life) vs. control. The microphotographs (X40 magnification) are representative of experiments performed using n=5-7 animals per group, compiled in the bar graph \*: p<0.05 and †: p<0.01 O<sub>2</sub>-exposed vs. control, using unpaired t-test. NS: No significant difference between groups.

**Figure 5:** Impact of neonatal high O<sub>2</sub> exposure on p16, p21, p53 and pRb senescence-associated proteins expression by Western blots.

Immunoblotting for senescence proteins p16 (A), p21 (B), p53 (C) and pRb (D) of aorta tissue from 10 days (P10), 4 weeks (4W) and 16 weeks (16W) old rats exposed to O<sub>2</sub> (80% from day 3 to 10 of life) vs. control. The microphotographs are representative of immunoblots performed using n=5-7 animals per group, compiled in the bar graph \*: p<0.05 and \*\*: p<0.01 and \*\*\*: p<0.001 O<sub>2</sub>-exposed vs. control, using unpaired t-test.

**Table:**

**Table 1.** DNA damage in vascular cells from aorta of P10, 4 weeks and 16 weeks rats after transient neonatal high O<sub>2</sub>-exposure

	<i>Vascular cells nuclei with DNA fragmentation, %</i>					
	<i>Control</i>			<i>O<sub>2</sub>-exposed</i>		
	<i>Class I</i>	<i>Class II</i>	<i>Class III</i>	<i>Class I</i>	<i>Class II</i>	<i>Class III</i>
<b>P10</b>	93±2	5±2	1±1	71±9*	8±5	21±6*
<b>4W</b>	85±6	6±3	2±2	76±8	4±3	19±6*
<b>16W</b>	89±1	10±2	1±1	68±6*	15±4	17±6*

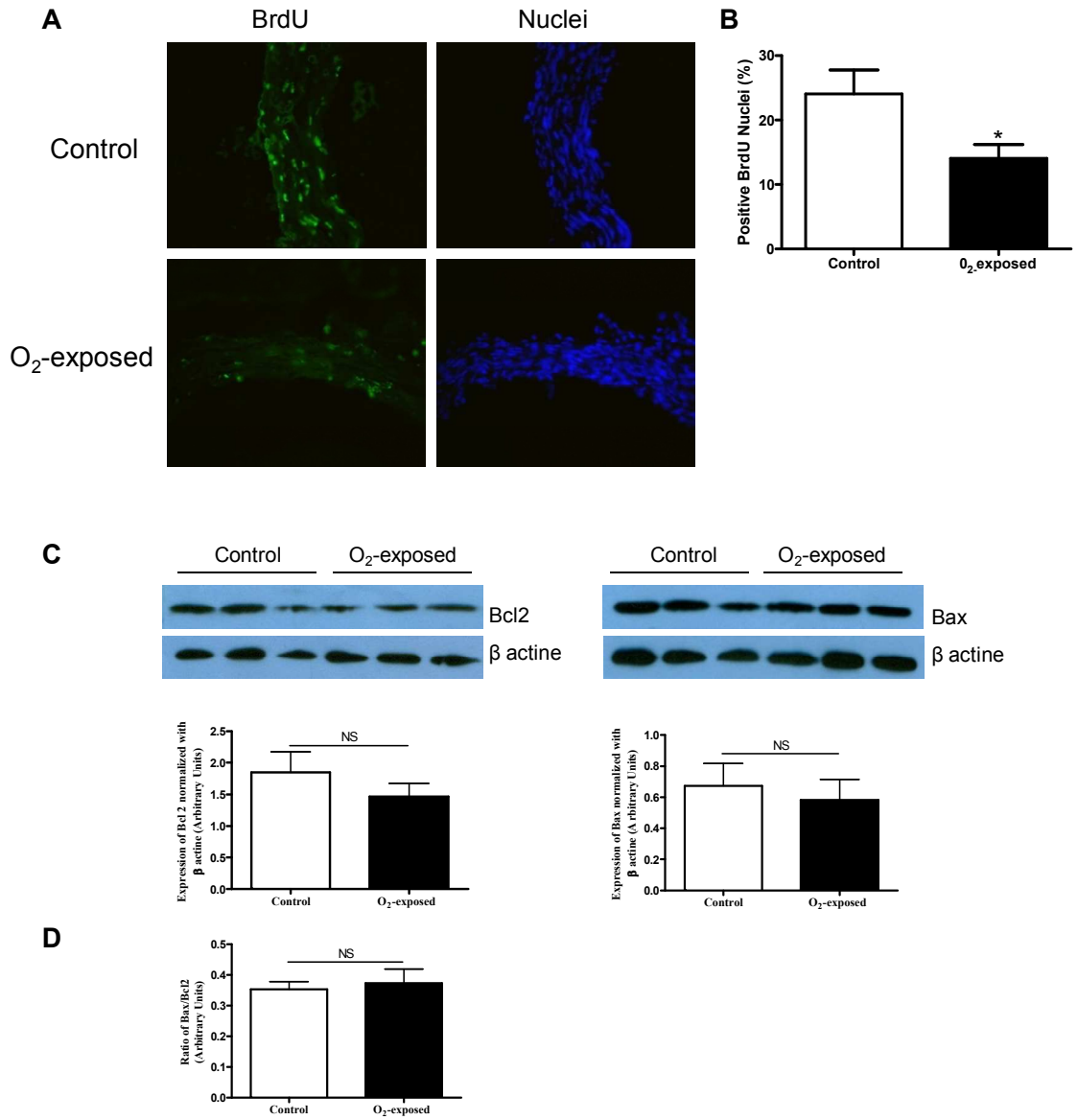
P10 = 10 day-old rats, 4W = 4 week-old rats, 16W = 16 week-old rats.

Class I = cells that possess no or few DNA double-strand breaks, Class II = cells with intermediate level of DNA double-strand breaks, Class III = cells with high level of DNA double-strand breaks.

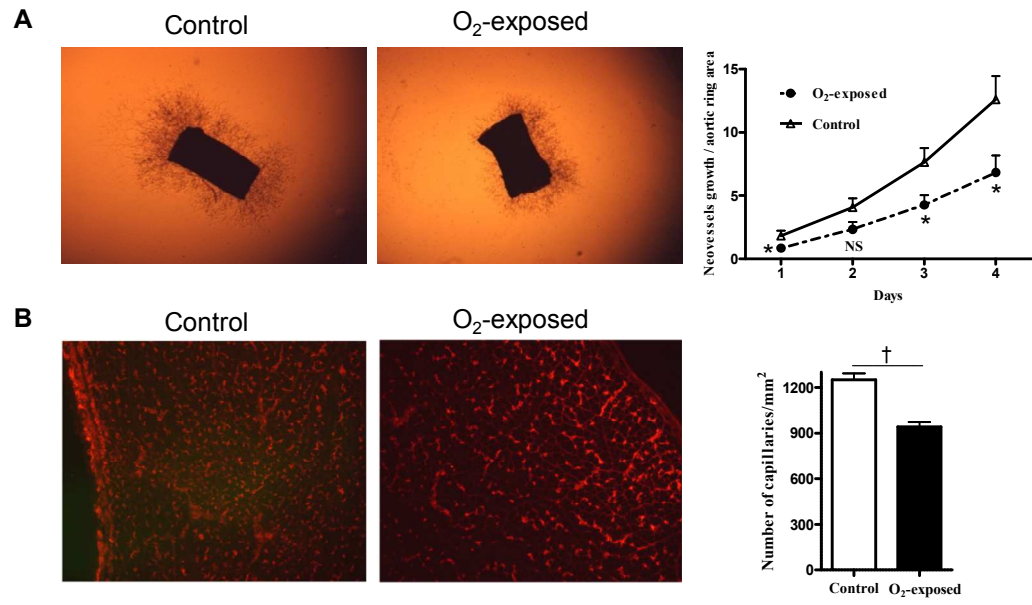
Data are presented as mean ± SEM of 5-7 rats for each group. \*P < 0.05 vs. corresponding values for Control.



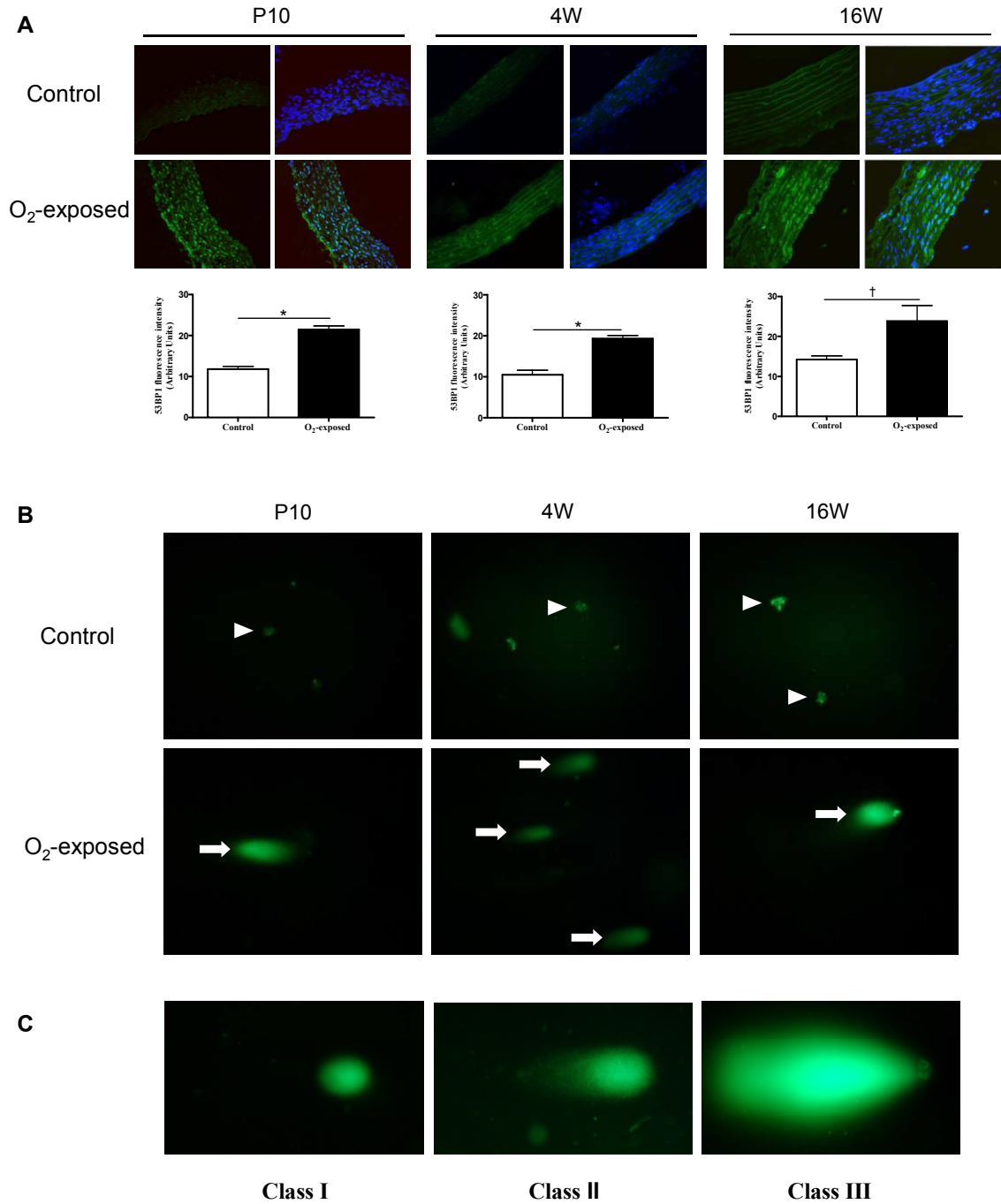
**Figure 1:**



**Figure 2:**

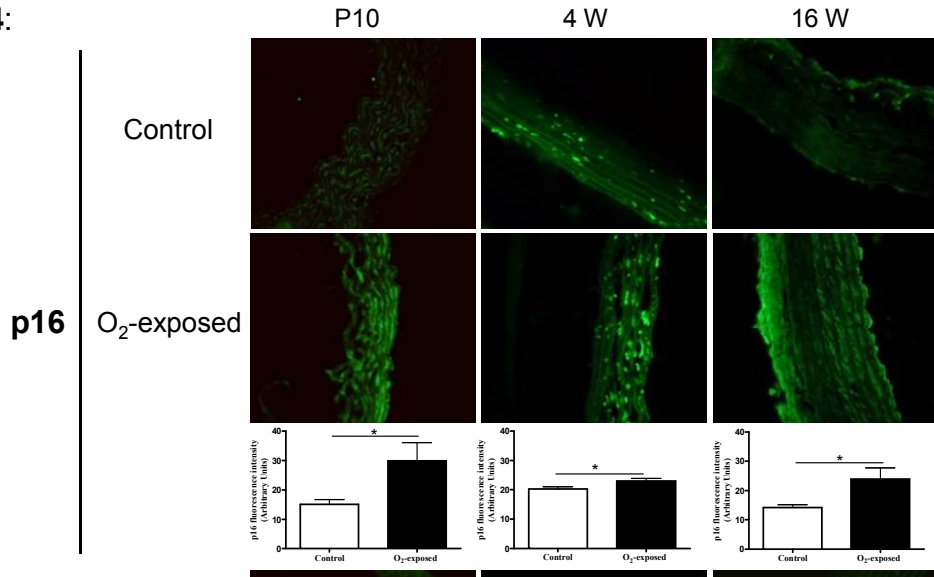


**Figure 3:**

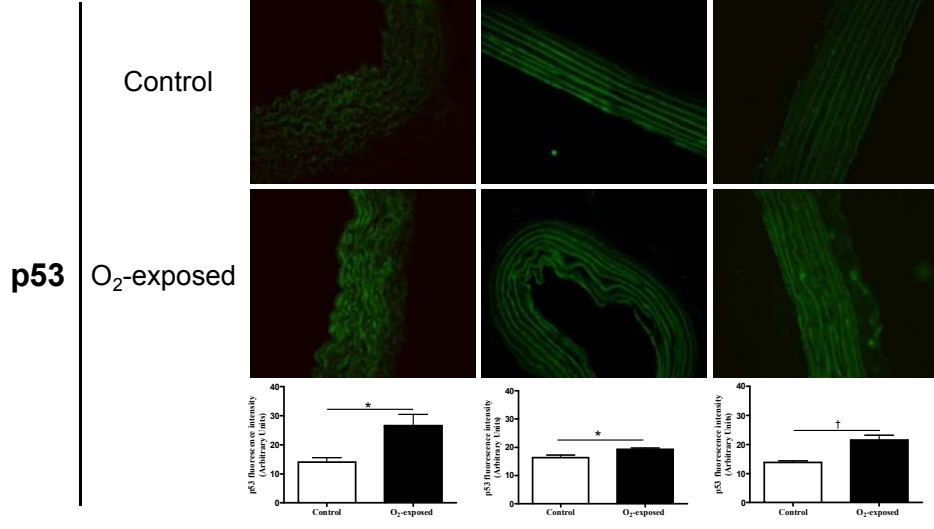


**Figure 4:**

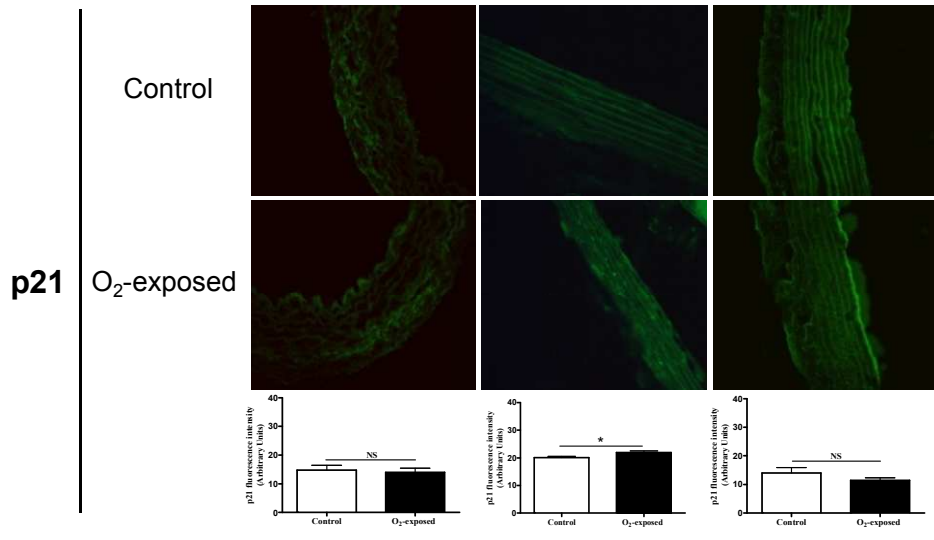
**A**



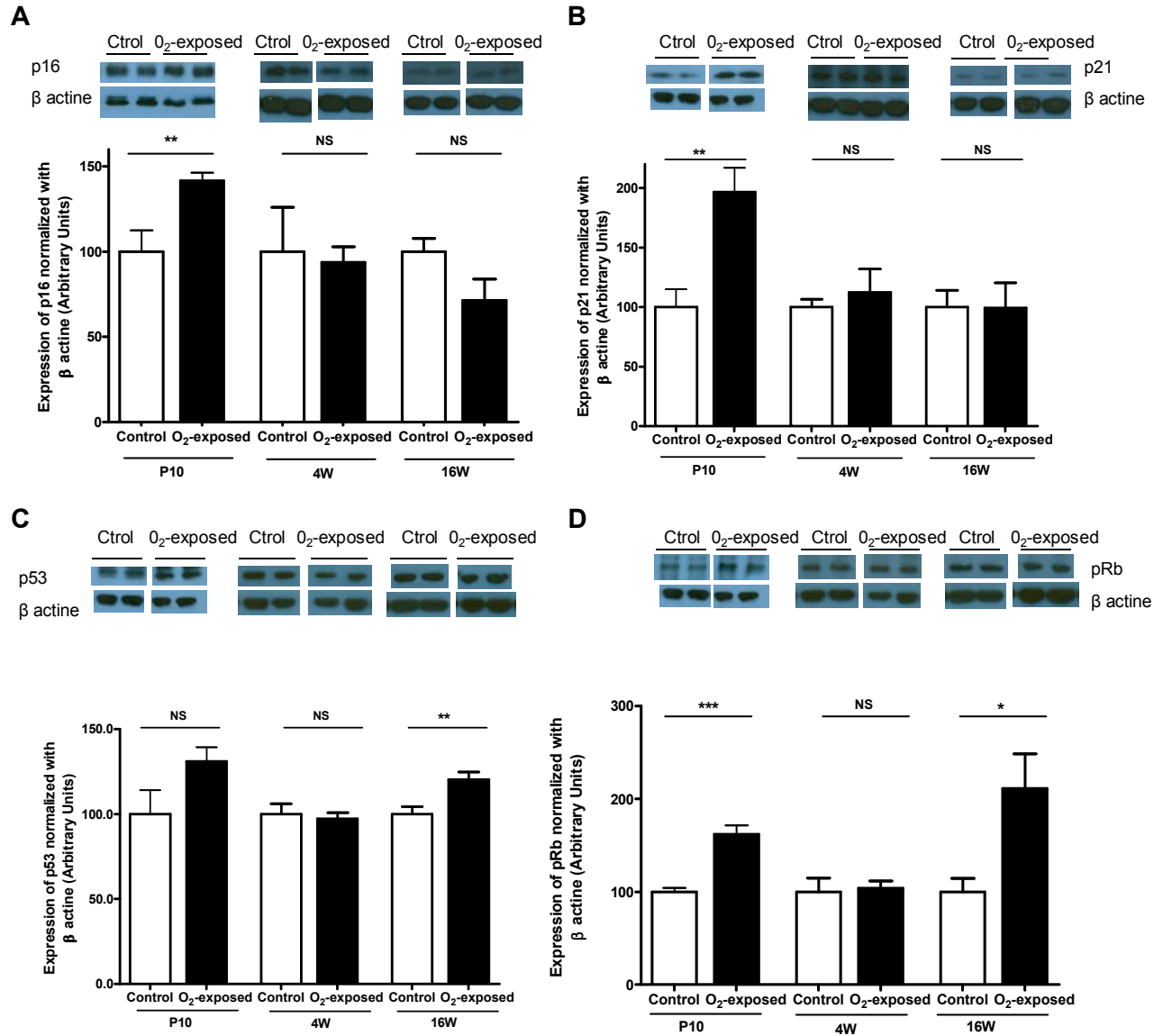
**B**



**C**



**Figure 5:**



**Deuxième Article :**

**Transient neonatal high oxygen exposure leads to remodelling of aorta extracellular matrix perpetuated to adulthood in rats.**

## **Contribution de chaque auteur aux travaux de recherche présentés dans cet article**

Fanny Huyard a participé à la réalisation des plans expérimentaux. Le Dr. Yzydorczyk a réalisé les expériences d'immunohistochimie. Fanny Huyard a réalisé la majeure partie de la rédaction de l'article et le Dr Yzydorczyk a participé à la rédaction du manuscrit. Le Dr Nuyt à corrigé le manuscrit.

**Etat de publication : En révision PlosOne**

### **Contexte de l'étude**

Ce deuxième article étudie les conséquences d'une exposition brève à l'O<sub>2</sub> en période néonatale dans le modèle animal sur des rats âgés de 4 semaines, soit avant l'apparition des troubles retrouvés à l'âge adulte, au niveau des composants de la structure des vaisseaux.

### **Objectifs**

L'objectif de cette étude est d'élucider les mécanismes fonctionnels pouvant être incriminés dans ces changements vasculaires en étudiant des modifications de la structure comme la contractilité ou le remodelage, également compatible avec une situation de vieillissement prématuré ( cf. Article 1).

## **Méthodes**

La production d'anions superoxide au niveau vasculaire a été mesurée par marquage à la dihydroéthidine. Afin d'étudier la contractilité vasculaire (ou vasomotricité) nous avons effectué des études *ex vivo* en chambre d'organe sur l'aorte et avons évalué la réactivité vasculaire à l'Angiotensine II (induisant une vasoconstriction) et au carbachol (induisant une vasodilatation) chez les animaux âgés de 4W. Le nombre de CML a été quantifié, ainsi que leur taille, afin d'évaluer respectivement si une hyperplasie ou une hypertrophie était présente. L'élastine (coloration de Verhoeff) au niveau de la média a été quantifiée, ainsi que le collagène par marquage au trichrome de Masson et par Western Blot afin de caractériser quel type de collagène était mis en jeu (collagène I et III). Enfin des immunomarquages des cathepsines K et S, des MMPs 2 et 9 et de leurs inhibiteurs respectifs TIMPs 2 et 1 ont été effectués, ainsi que des zymographies des MMPs 2 et 9 pour en évaluer l'activité.

## **Résultats**

La production vasculaire au niveau aortique d'anions superoxide n'est pas différente entre le groupe H et le groupe contrôle. La réactivité vasculaire à l'AngII et au carbachol chez les animaux âgés de 4W est similaire entre les groupes. Il n'y a pas d'hypertrophie de la média et le nombre de CML est inchangé dans le groupe H à 4W. En revanche, la proportion de fibres de collagène est significativement augmentée chez les animaux ayant été exposés à l'O<sub>2</sub>, comparés aux contrôles. La proportion de fibres d'élastine est significativement diminuée chez les animaux ayant été exposé à l'O<sub>2</sub>, comparés aux contrôles. Le ratio élastine/collagène est de plus significativement diminué chez ces mêmes



animaux, traduisant un remodelage vasculaire et une rigidification artérielle déjà présente à 4W. De plus, l'étude des MMPs et des cathepsines (enzymes intervenant dans la modification de la matrice extra-cellulaire) dans la paroi aortique montre des indices de remodelage vasculaire présents chez ces animaux.

### **Conclusion**

Ces données suggèrent la présence d'un remaniement au niveau de la structure vasculaire présent dès l'âge de 4W ainsi qu'un remodelage. Ces troubles précèdent l'hypertension et les dysfonctions vasculaire retrouvées à l'âge adulte dans notre modèle animal, et pourraient donc y contribuer.

**Transient neonatal high oxygen exposure leads to remodelling of aorta extracellular matrix perpetuated to adulthood in rats.**

Fanny Huyard\*<sup>1</sup>, Catherine Yzydorczyk\*<sup>1;2</sup>, Michele Castro<sup>3</sup>, Hervé Sartelet<sup>2</sup>, Nathalie Germain<sup>1</sup>, Anik Cloutier<sup>1</sup>, Blandine Comte<sup>4</sup>, Richard Schulz<sup>3</sup>, Denis DeBlois<sup>5</sup> and Anne Monique Nuyt<sup>1</sup>.

Sainte-Justine University Hospital Research Center, Departments of <sup>1</sup>Paediatrics, and <sup>2</sup>Pathology, Université de Montréal, Montreal, Québec, Canada; <sup>3</sup>Cardiovascular Research Group, 4-62 Heritage Medical Research Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2S2, Canada; <sup>4</sup>Unit of Human Nutrition, UMR 1019, INRA, Research Centre of Clermont-Ferrand/Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France; <sup>5</sup>Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

\* FH and CY are co-first authors

**Short title:** Neonatal high oxygen exposure and vascular wall matrix changes

**Word Count:** 6027

**Abstract:** 290 words

**Figures:** 6

**Corresponding author:**

Anne Monique Nuyt, MD

Sainte-Justine University Hospital Research Center

3175 chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montreal (Quebec), Canada, H3T 1C5

Telephone number: XXXXXXXXXX

Fax number: [REDACTED]

CY current address: UMR 7561 CNRS Université de Lorraine, "PPIA" Faculté de Médecine, 9, avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre lès Nancy, France

FC current address: Department of Biology, Moncton University, E1A 3E9 (New Brunswick), Canada

## **ABSTRACT**

Neonatal high-oxygen exposure leads to elevated blood pressure, microvascular rarefaction, vascular dysfunction and arterial rigidity in adult rats. Whether changes are present in the wall matrix of conduit vessels is unknown. Considering that elastin synthesis peaks in late fetal life in humans, and early postnatal life in rodents, we postulated that transient neonatal high-oxygen exposure would trigger vascular remodelling, prior to the onset of elevated blood pressure and vascular dysfunction in this model. Sprague Dawley rat pups were exposed from day 3 to day 10 after birth to 80 % oxygen (vs. room air control) and were studied at 4 weeks, before the elevation of blood pressure. Blood pressure and vasomotor response of the aorta to angiotensin II and to the acetylcholine analogue carbachol were not different between groups. Vascular superoxide anion production was similar between groups. There was no difference between groups in aortic cross sectional area, smooth muscle cell number or media/lumen ratio. In oxygen-exposed rats aortic elastin/collagen content ratio was significantly decreased, the expression of elastinolytic cathepsin S was increased whereas collagenolytic cathepsin K was decreased. MMP-2 was increased (immunostaining; zymography) and TIMP-2 decreased (immunostaining), indicating a shift in the balance towards degradation of the extra-cellular matrix. MMP-9 expression was decreased (immunostaining) and no activity was detected by zymography; TIMP-1 was increased, suggesting that the MMP-9/TIMP-1 pathway is not involved in the observed degradation of the extra cellular matrix. Overall, these findings indicate that transient neonatal high oxygen exposure leads to changes to the vascular wall which are associated with increased rigidity. Importantly, these changes were present prior to the elevation of blood pressure and vascular dysfunction in this model, and therefore may be contributory.

## INTRODUCTION

Changes in vasculature structure and increased arterial stiffness have been linked to adverse perinatal conditions such as intrauterine growth restriction and preterm birth [1] but the pathophysiology of these observations is unknown. We have previously shown that transient neonatal high-oxygen (O<sub>2</sub>) exposure leads to elevated blood pressure, microvascular rarefaction, vascular dysfunction, enhanced superoxide production, and increased pulse wave velocity (indicative of arterial rigidity) in adult rats [2-4].

The proportion of elastin vs. rigid collagen is a major determinant of arterial stiffness, [5] a well-established- and independent marker of cardiovascular risk. Stiffening of large central arteries, particularly the aorta, occurs during physiological processes such as aging as well as during pathological processes such as hypertension [6]. Elastin synthesis in the vessels peaks in late fetal life in humans [7] (and in the first postnatal days in rodents), decreases rapidly after birth and is minimal in the adult aorta. Elastin has a very long half-life and a slow turnover. Elastin content of the aortic wall and other large conduit arteries is therefore determined relatively early during development, with a low capacity for synthesis thereafter. Collagen synthesis increases during intrauterine life and persists after birth; the proportion of collagen in vessels therefore increases with age and synthesis can be accelerated in pathological conditions such as hypertension [8]. In models of developmental programming of high blood pressure associated with intra-uterine growth restriction, offspring exhibit lower elastin content, increased arterial stiffness and remodeling of the extracellular matrix in both conduit and resistance vessels [9-11]; the triggering mechanism is unknown. Interestingly, we have shown that antioxidant supplementation of low protein fed dams prevents elevation of blood pressure and vascular dysfunction in the offspring

[12]. Taken together these studies support a role for perinatal oxidative stress in programming of high blood pressure and vascular changes.

In conduit vessels, vascular smooth muscle cells are surrounded by the highly structured extracellular matrix consisting largely of collagens types I and III, elastin, and proteoglycans[13]. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) are known to play a crucial role in the vascular wall changes associated with aging, or conditions such as hypertension, by regulating extracellular matrix turnover and collagen metabolism [6,14-18]. Moreover, they are thought to be involved during embryonic development [19]. MMP-2 and MMP-9, also known as gelatinase A and B, cleave gelatin, collagen and elastin; TIMP1 and TIMP2 has been shown to cleave MMP-9 and MMP-2 [20]. Along with MMPs, cysteine protease cathepsins S and K can contribute to the degradation of extracellular matrix proteins such as elastin and collagen, respectively [21].

The current study aimed to examine the impact of transient neonatal high-O<sub>2</sub> exposure on aortic wall composition and remodelling, with the postulate that an imbalance in favor of vascular stiffening elements would prevail and be present early in life, prior to the blood pressure increase and vascular dysfunction observed in this model.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

As previously published [2], animals were used according to the protocol of the Animal Care Committee of the CHU Sainte-Justine in accordance with the principles of the Guide for the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care.

Briefly, Sprague-Dawley rat pups (Charles River, St.-Constant, Québec, Canada) were maintained in a hyperoxic environment (H group, 80% O<sub>2</sub> by a mixture of medical grade 100% O<sub>2</sub> and room air measured with an oxycycler A82OCV, Biospherix) or in room air (control group) from postnatal day 3 (P<sub>3</sub>) to 10 (P<sub>10</sub>) of life. At 4 weeks, male rats were sacrificed after anaesthesia with intraperitoneal ketamine (Ayerst, Montreal, QC, Canada; 65 mg/kg) and xylazine (Bayer, Montreal, QC, Canada; 7 mg/kg) and used for this study.

### **Experimental procedures**

#### **Blood pressure measurement**

After habituation for 1 week to the equipment and holder, systolic blood pressure (SBP) was assessed in rats at 4 weeks by tail-cuff plethysmography (50-001 Rat Tail Blood Pressure System, Harvard Apparatus, Holliston, MA).

#### ***Ex vivo* vascular reactivity studies**

Freshly excised aortic rings in H and control groups were studied as described [22]. Briefly, aortas were placed in ice cold modified Krebs bicarbonate solution of the following composition (in mM): 118 NaCl, 4.7 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 11 dextrose. Aortas were cleaned of fat and precisely cut into rings of equal length (4 mm). Four to eight rings from each rat were used per experiment; the *n* value presented with each figure represents the number of animals studied. Rings were suspended

horizontally between two stainless-steel wires in organ chambers that contained 20 ml of Krebs maintained at 37 °C and aerated continuously with 95 % O<sub>2</sub> and 5 % CO<sub>2</sub>. The tension of the preparations was recorded with a linear force transducer on a computerized data acquisition system (Kent Scientific, Litchfield, CT). The rings were progressively stretched to a preload tension of 19.0 mN and allowed to equilibrate for 30 min with frequent washing and tension adjustments. After stabilization, rings were repeatedly exposed to KCl (80 mM) to test their viability and to determine a standard contractile. Then, cumulative concentration-response curves were generated with the addition of angiotensin II (AngII, Sigma Chemical, St Louis, MO) (1 pM to 1 µM) to induce vasoconstriction. For the determination of carbachol (Sigma Chemical, St Louis, MO; 100 nM to 100 µM) vasorelaxant response, rings were precontracted with U46619 (Sigma Chemical, St Louis, MO; 0.3 µM; 15 minutes pre-incubation).

### **Vascular (aorta) superoxide production**

Aortic superoxide levels were evaluated in H and control groups at 4 weeks of age using the oxidative fluorescent dye hydroethidine (2 µM) as reported previously [2].

### **Thoracic aorta wall composition and structure**

#### *Elastin and collagen*

Thoracic aortas were dissected, fixed in 10% neutral buffered formalin and paraffin-embedded. Sequential 5 µm sections were stained by the Verhoeff-Van Gieson or the Masson's trichrome protocols for elastin and collagen fibres respectively. Aortic circumference was measured on the histological sections by tracing the internal elastic lamina, and the total area to fibres area ratio was also calculated. Collagen staining and elastin staining of the aortic media were quantified using image analysis software



(Microscope Leiss Imager M1, Zeiss Germany. Axiovision 4.6, Zeiss Germany) and media fibre area to total media area ratio was calculated.

#### *Cross sectional area and smooth muscle cell number*

Fixed aortas were embedded in paraffin blocks. Aortic cross-sectional area and smooth muscle cell (SMC) number were evaluated in 3- $\mu$ m sections of aorta, stained with hematoxylin and eosin. The tridimensional dissector method was used to evaluate the number of SMCs per unit of vessel length, using the adapted method of Mulvany et al [23] as described previously by DeBlois et al [24]. Three consecutive sections were photographed at 400X magnification and analyzed as described [24]. Digital images were analyzed using National Institutes of Health Image J software 1.32 (public domain software, available at: <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/index.html>).

#### **Immunohistochemistry**

Frozen sections of aorta (8  $\mu$ m) were immunostained with: cathepsin S (goat anti-cathepsin S 1:100, ab18822, Abcam Ltd, Cambridge, UK), cathepsin K (rabbit anti-cathepsin K 1:100, ab19027, Abcam Ltd, Cambridge, UK), MMP-2 (rabbit anti-MMP-2 1:50, ab37150, Abcam Ltd, Cambridge, UK), MMP-9 (rabbit anti-MMP-9 1:50, ab7299, Abcam Ltd, Cambridge, UK), TIMP-1 (rabbit anti-TIMP-1 1:100, ab770, Millipore, Billerica, MA, USA) or TIMP-2 (mouse anti-TIMP2 1:100, ab1828, Abcam Ltd, Cambridge, UK), overnight at 4 °C. The sections were then washed with PBS and incubated 1 h with Alexa Fluor-488 (donkey anti-goat IgG 1:200 for cathepsin S; goat anti-rabbit IgG 1:200 for cathepsin K, MMP-2, MMP-9, and TIMP-1, goat anti-mouse IgG 1:200 for TIMP-2). For each antibody, all sections from H and control rats were processed in parallel (same conditions). In order to quantify pixel fluorescence intensity on pictures, digital images

were collected on at least four aortic sections per animal under the same conditions and the average value from all sections from each animal was used for comparison between groups, as previously published [3]. Digital images analysis software as described above.

### **Measurement of MMP activity by gelatin zymography [25]**

Frozen aortas were crushed using a stainless steel piston that was cooled to liquid nitrogen temperature. The resulting powder was diluted 1:4 w/v in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer containing 3.1 mM sucrose, 1 mM dithiothreitol, 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL soybean trypsin inhibitor, 2 µg/mL aprotinin and protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma Chemical, St Louis, MO). This solution was then homogenized by hand on ice using a motorized pellet pestle (Kontes-Sigma Aldrich, St Louis, MO) for 2 minutes. The homogenate was centrifuged at 10,000g for 5 minutes at 4°C and the supernatant was kept on ice for biochemical analysis. Aortic protein content was determined by the bicinchoninic acid method (Sigma Chemical, St Louis, MO) using bovine serum albumin as a standard.

Non-heated samples were diluted with water in order to load a constant amount of protein per lane (10 µg from aorta homogenate). These samples were then subjected to electrophoresis on 8% polyacrylamide gels co-polymerized with gelatin (2 mg/mL, type A from porcine skin, Sigma Chemical, St Louis, MO). After 1.5h of electrophoresis, the gels were incubated for 1h at room temperature in a 2.5 % Triton X-100 solution, and incubated at 37°C for 20h in incubation buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.05% NaN<sub>3</sub>). The gels were stained with 0.05% Coomassie Brilliant Blue G-250 in a mixture of methanol: acetic acid: water (2.5:1:6.5 v/v), and then destained in aqueous 4% methanol and 8% acetic acid. Gelatinolytic activities were detected as unstained bands against the background of Coomassie blue-stained gelatin, assayed by densitometry using

ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, USA). Intergel analysis was possible after normalization of gelatinolytic activity with an internal standard (supernatant of phorbol ester activated HT-1080 cells, American Type Culture Collection).

### **Statistical analysis**

Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. *Ex vivo* concentration-response curves to AngII and carbachol were analyzed by computer fitting to a four-parameter sigmoid curve using GraphPad Prism 5 software (GraphPad, San Diego, CA) to evaluate the EC50 and Emax, the maximum asymptote of the curve. Analyses of differences within and between groups were performed using Student's t test for unpaired observations. Statistical significance was accepted at  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Blood pressure, aortic vasomotor response, and vascular superoxide production**

Systolic blood pressure (tail cuff;  $132 \pm 2$  mmHg vs.  $133 \pm 2$  mmHg), cumulative dose-response curves to angiotensin II (vasoconstriction) (Figure 1A) and carbachol (vasodilatation) (Figure 1B), and vascular superoxide production (Figure 1C) were not different between O<sub>2</sub>-exposed and control groups, indicating that there is no evidence of increased blood pressure or vascular dysfunction at 4 weeks of age.

### **Aortic wall structure, and collagen and elastin content**

No difference was observed in aortic cross-sectional area (Figure 2A), in aortic smooth muscle cell number (Figure 2B) or in media/lumen ratio (Figure 2C) between groups.

Elastin fiber density (Figure 3A and C; Verhoeff staining), however, was significantly decreased whereas collagen fiber density (Figure 3B and D; Masson's trichrome) was significantly increased in O<sub>2</sub>-exposed vs. control animals, with a significant reduction in the elastin/collagen ratio (Figure 3E) in the O<sub>2</sub>-exposed. Immunoblotting for collagen I was not different between O<sub>2</sub>-exposed vs. control animals (Figure 3F) but collagen III was significantly increased in O<sub>2</sub>-exposed vs. control animals (Figure 3G).

### **Expression of vascular extra cellular matrix synthesis and degradation enzymes.**

Immunohistochemical analysis showed that the expression of elastinolytic cathepsin S (Figure 4A) was significantly increased whereas expression of collagenolytic cathepsin K (Figure 4B) was significantly decreased in aorta from O<sub>2</sub>-exposed vs. control animals. Immunostaining for MMP-2 (Figure 5A) was significantly increased in aorta from O<sub>2</sub>-exposed vs. control animals. Using zymography, a trend towards an increase in 72 kDa MMP-2 activity was observed in O<sub>2</sub>-exposed rats ( $p=0.33$ , Figure 5B). Immunostaining for

TIMP-2 (inhibitor enzyme of MMP-2; Figure 5C) was significantly decreased in aorta from the O<sub>2</sub>-exposed H group compared to control group  $p < 0.001$ .

Expression of MMP-9 (immunostaining; Figure 6A) was significantly decreased and no enzyme activity was detected in aorta from O<sub>2</sub>-exposed animals (zymography, vs. low level activity present in control; 92 kDa MMP-9 (Figure 6B)). Immunostaining for TIMP-1 (inhibitor enzyme of MMP-9; Figure 6C) was significantly increased in O<sub>2</sub>-exposed vs. control animals.

## **DISCUSSION**

In this study, we have demonstrated that high-oxygen exposure during the neonatal period alters aorta wall structure through the accumulation of collagen, decreased elastin, and modifications of other extracellular matrix components (cathepsin S and cathepsin K), which are an important aspect of extracellular matrix remodeling. The basal expression of MMPs and TIMPs was also affected. These vascular wall changes are present prior to blood pressure elevation and vascular dysfunction associated with this experimental model of neonatal (high) oxygen related stress, as encountered in preterm born individuals.

### **1) Structural proteins modification: Elastin and Collagen**

The mechanical properties of blood vessels are derived from elastin and collagen fibres [26], which are thought to participate in the elastic properties at low and moderated blood pressures and high pressures, respectively [27,28]. Elastinolysis and collagenolysis play crucial roles in arterial remodeling and diseases[29]. Elastin is the dominant extracellular matrix protein deposited in the arterial wall, and enables many tissues in the body to resume their shape after stretching or contracting[30]. Proteolytic degradation of elastic fibers leads to loss of tissue elasticity, which is associated with the development of different pathological conditions. The proportion of elastin vs. rigid collagen is a major determinant of arterial stiffness, which is a key mediator of increased systolic and pulse pressure in adults[5]. Intrinsic modifications of the arterial wall may also contribute to the increased stiffness of arteries [31]. Because of the slow turnover of collagen, it is difficult to evaluate the contribution of collagen changes to the viscoelastic properties of arterial wall in cases of hypertension by *in vivo* measurement [32]. Conduit arteries represent a low resistance

system and are not considered to be involved with blood flow regulation. The majority of research into hypertension has been focused on small arteries and resistance arterioles [33]. However, some studies of the pathology and physiology of large arteries suggest that these vessels may play an important role in the pathophysiology of hypertensive vascular disease [34]. In the current study, we evaluated the density of collagen and elastin fibers by histological measurements in the media of the thoracic aorta. The media is composed of numerous layers of smooth muscle cells separated by collagen, ground substance and elastic fibres. As elastin synthesis in the vessels peaks in the prenatal period, decreases rapidly after birth and is minimal in the adult aorta [7], we hypothesized that it would be susceptible to modification due to adverse conditions during the neonatal period. Our data show that neonatal oxygen exposure leads to an increase in collagen and decrease in elastin fibres in the aorta. These findings are in accordance with a previous review where Grossman concluded that oxidative stress promotes collagen deposition leading to thickening of the vascular media [35]. Bruce et al. [36] demonstrated that hyperoxic exposure in the developing rat lung altered the total length and structure of elastic fibers in the alveolar parenchyma. Also, in another model of Sprague-Dawley rats, elastin fiber length density has been showed to be altered in developing lung alveoli by hyperoxic exposure during the first postnatal weeks [37]. In this study, we observed that neonatal hyperoxia exposure leads to a decreased density of elastin fibers and an increased density of collagen fibers, in the aortic media at 4 weeks of age. Moreover, in other animal models, in which tissues such as lung and osteoblasts have been examined, exposure of newborn rats to high concentration of O<sub>2</sub> increases type I collagen synthesis and decreases elastin deposition [38,39]. In humans, it was shown that newborn babies who suffered from growth

restriction have a higher aortic intima-media thickness [40,41]. We can hypothesise that the fragmentation of the elastic fiber network, without changes of arterial pressure, can lead to distension of the arterial wall and premature recruitment of collagen fibres.

## **2) Structural changes in terms of hyperplasia and hypertrophy**

Matrix proteins, like collagen and elastin, can affect vascular smooth muscle cell activities such as, as phenotypic modulation, migration and proliferation [31,42]. In our study, examination of the aortic cross-sectional area indicated no vascular hypertrophy. Similarly, aortic smooth muscle cell number indicated no hyperplasia, and no difference in the media/lumen ratio was observed between groups.

## **3) Cathepsins elastolytic and collagenolytic activities**

Cathepsin S plays a major role in atherosclerosis[43] and angiogenesis[44] through its actions on the extracellular matrix. Pathological elastin degradation by cysteine cathepsins has also been implicated in diseases of the pulmonary system. Based on the elastolytic activity of the cathepsin S, our initial hypothesis was that increased cathepsin S expression would interfere with vessel structure by degrading elastin. In our study, immunohistochemistry showed that immunostaining of cathepsin S was significantly more abundant in aorta from the H group than the control group. Similarly, other studies have shown that smooth muscle cells appear to predominantly express and secrete cathepsin S in order to specifically degrade elastin; in the absence of cathepsin S, markedly less elastin is degraded [43,45]. Cathepsin K is a member of the lysosomal cysteine and aspartic proteinase family, and has been shown to possess unique collagenolytic activity [46,47].



With the ability to cleave collagen at multiple sites, Cathepsin K will bind to any collagen molecule irrespective of its conformation. Thus, cathepsin K alone can both depolymerize collagen fibers and cleave triple helices. We have shown that decreased expression of cathepsin K was accompanied by the increased deposition of extracellular collagen, which may therefore explain the development of structural change in aortas. In accordance with our findings, Cathepsin K expression levels are known to be significantly lower in the lungs of premature infants with bronchopulmonary dysplasia [48]. In comparison, cathepsin K is upregulated in fibrotic adult lungs, suggesting a protective role against excessive collagen deposition in chronically diseased lungs [49].

#### **4) MMPs activities and their role in vascular remodelling**

In order to understand the mechanisms involved in the changes into vascular wall structure, we also studied MMPs. Vascular remodelling implies changes in vascular structure (elastin, collagen and their ratio) and the MMPs play a crucial role in the regulation of vascular remodelling. We measured MMP levels by immunohistochemistry and assessed the activity by zymography. MMPs have been shown to play important roles in a number of both physiological and pathological processes[50]. Among MMPs, MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) have emerged as important players in a number of cardiovascular diseases, including atherosclerosis, stroke, heart failure, ischaemic heart disease and aneurysm [51]. We hypothesized that as MMP-2 and MMP-9 mediate arterial remodelling, changes in MMP expression may explain the alteration in elastin and collagen fibers density observed in the current study. MMP-2, a 72-kd type IV collagenase, has elastase activity [52] and so may have a role in fragmentation of the elastic laminae. Another

explanation could be that the increase in ROS may be associated with a defect in elastin synthesis. It has been demonstrated that ROS accelerates tropoelastin (elastin precursor) degradation. Furthermore some tropoelastin sequences may be highly sensitive to hydroxyl radicals [53]. Hyperoxia has been shown to alter pulmonary MMPs, and increased metalloprotease activity has been reported after hyperoxic injury [54]. Adult rats exposed to 85 % O<sub>2</sub> had increased levels of MMP-2 and MMP-9 activity in both bronchoalveolar lavage fluid and type II cells [54]. However, in our study, we observed an increase in MMP-2 and a decrease in MMP-9 expression in the aortic media from rats aged 4 weeks. This decrease of MMP-9 expression has been also reported by Hosford et al. where rat pups from the hyperoxic environment expressed significantly lower levels of MMP-9 mRNA than the normoxic pups[55].

#### **5) MMPs Inhibition with TIMPs**

Another way to assess the potential involvement of MMPs in vascular remodelling is to study their related inhibitor. Because MMPs are tightly regulated by the tissue inhibitor of MMPs, TIMP, we performed immunostaining of related TIMPs; to MMP2 : TIMP-2 and to MMP9: TIMP-1. Immunostaining of TIMP-2 was significantly decreased in aorta from H group compared to control group. Immunostaining of TIMP-1 was significantly increased in aorta from H group compared to control group. These results are consistent with the MMPs results shown above.

## **CONCLUSION**

We have shown that a neonatal oxidative insult results in early modification of vascular architecture, independent of an elevation in blood pressure. At 4 weeks of age, neither vascular dysfunction, or aortic oxidative stress tissue, or hyperplasia/hypertrophy of smooth muscle cells was present. However, there was evidence of systemic oxidative stress, which can trigger modifications in elastin and collagen fibre density. The elastin/collagen ratio was therefore modified. The expression of key extracellular matrix degradation enzymes such as the cathepsins, MMPs and TIMPs were also changed, and could explain, at a vascular level, the onset of hypertension in early adulthood we have previously shown to occur following neonatal exposure to oxidative stress.

## **FUNDING**

This work was supported by grants from the Hospital for Sick Children Foundation, the Canadian Institutes of Health Research and the Heart and Stroke Foundation of Canada. Anne Monique Nuyt was supported by a fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. We also acknowledge the help of Quebec's Cardiovascular Health Network.

## **CONFLICT OF INTEREST/DISCLOSURE STATEMENT**

None

## **RERERENCES**

1. Tauzin L, Risso F, Buffat C, Serra G, Simeoni U (2005) Vascular mechanisms in the developmental programming of cardio-vascular disease. *Pediatrics Medica e Chirurgica* 27: 18-23.
2. Yzidorczyk C, Comte B, Cambonie G, Lavoie J, Germain N, et al. (2008) Neonatal oxygen exposure in rats leads to cardiovascular and renal alterations in adulthood. *Hypertension* 52: 889-895.
3. Yzidorczyk C, Comte B, Huyard F, Cloutier A, Germain N, et al. (2012) Developmental programming of enos uncoupling and enhanced vascular oxidative stress in adult rats after transient neonatal oxygen exposure. *J Cardiovasc Pharmacol*: in press.
4. Mivelaz Y, Yzidorczyk C, Barbier A, Cloutier A, Fouron JC, et al. (2011) Neonatal oxygen exposure leads to increased aortic wall stiffness in adult rats: a Doppler ultrasound study. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 2: 184-189.
5. O'Rourke MF, Staessen JA, Vlachopoulos C, Duprez D, Plante GE (2002) Clinical applications of arterial stiffness; definitions and reference values. *Am J Hypertens* 15: 426-444.
6. McNulty M, Mahmud A, Spiers P, Feely J (2006) Collagen type-I degradation is related to arterial stiffness in hypertensive and normotensive subjects. *Journal of Human Hypertension* 20: 867-873.
7. Berry CL, Looker T, Germain J (1972) Nucleic acid and scleroprotein content of the developing human aorta. *Journal of Pathology* 108: 265-274.
8. Nissen R, Cardinale GJ, Udenfriend S (1978) Increased turnover of arterial collagen in hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 451-453.

9. Khorram O, Momeni M, Desai M, Ross MG (2007) Nutrient restriction in utero induces remodeling of the vascular extracellular matrix in rat offspring. *Reprod Sci* 14: 73-80.
10. Armitage JA, Lakasing L, Taylor PD, Balachandran AA, Jensen RI, et al. (2005) Developmental programming of aortic and renal structure in offspring of rats fed fat-rich diets in pregnancy. *J Physiol* 565: 171-184.
11. Berry CL, Looker T (1973) An alteration in the chemical structure of the aortic wall induced by a finite period of growth inhibition. *Journal of Anatomy* 114: 83-94.
12. Cambonie G, Comte B, Zydorczyk C, Ntimbane T, Germain N, et al. (2007) Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1236-1245.
13. Stegemann JP, Hong H, Nerem RM (2005) Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. *Journal of Applied Physiology* 98: 2321-2327.
14. Libby P, Lee RT (2000) Matrix matters. *Circulation* 102: 1874-1876.
15. Ota R, Kurihara C, Tsou TL, Young WL, Yeghiazarians Y, et al. (2009) Roles of matrix metalloproteinases in flow-induced outward vascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 1547-1558.
16. Ishikawa J, Kario K, Matsui Y, Shibasaki S, Morinari M, et al. (2005) Collagen metabolism in extracellular matrix may be involved in arterial stiffness in older hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *Hypertension Research* 28: 995-1001.

17. Querejeta R, López B, González A, Sánchez E, Larman M, et al. (2004) Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis. *Circulation* 110: 1263-1268.
18. Laviades C, Varo N, Fernández J, Mayor G, Gil MJ, et al. (1998) Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation* 98: 535-540.
19. Vu TH, Werb Z (2000) Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 14: 2123-2133.
20. Nagase H, Visse R, Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69: 562-573.
21. Chapman HA, Riese RJ, Shi GP (1997) Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 59: 63-88.
22. Zyzdorczyk C, Gobeil FJ, Cambonie G, Lahaie I, Lê N, et al. (2006) Exaggerated vasomotor response to ANG II in rats with fetal programming of hypertension associated with exposure to a low-protein diet during gestation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R1060-1068.
23. Mulvany MJ, Baandrup U, Gundersen HJ (1985) Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional disector. *Circ Res* 57: 794-800.
24. deBlois D, Tea BS, Than VD, Tremblay J, Hamet P (1997) Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 29: 340-349.

25. Cena JJ, Lalu MM, Cho WJ, Chow AK, Bagdan ML, et al. (2010) Inhibition of matrix metalloproteinase activity in vivo protects against vascular hyporeactivity in endotoxemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H45-51.
26. Kassab GS (2006) Biomechanics of the cardiovascular system: the aorta as an illustratory example. *J R Soc Interface* 3: 719-740.
27. Berry CL, Greenwald SE, Rivett JF (1975) Static mechanical properties of the developing and mature rat aorta. *Cardiovasc Res* 9: 669-678.
28. Silver FH, Christiansen DL, Buntin CM (1989) Mechanical properties of the aorta: a review. *Crit Rev Biomed Eng* 17: 323-358.
29. Tyagi SC, Simon SR (1993) Regulation of neutrophil elastase activity by elastin-derived peptide. *J Biol Chem* 268: 16513-16518.
30. Basu P, Sen U, Tyagi N, Tyagi SC (2010) Blood flow interplays with elastin: collagen and MMP: TIMP ratios to maintain healthy vascular structure and function. *Vasc Health Risk Manag* 6: 215-228.
31. Safar ME, Levy BI (1993) Mechanical function and histological structure of the arterial wall. The response to antihypertensive treatment. *Drugs* 46 Suppl 2: 68-74.
32. Safar ME, London GM, Asmar R, Frohlich ED (1998) Recent advances on large arteries in hypertension. *Hypertension* 32: 156-161.
33. Folkow B (1982) Physiological aspects of primary hypertension. *Physiological Reviews* 62: 347-504.
34. Safar ME, Simon AC, Levenson JA (1984) Structural changes of large arteries in sustained essential hypertension. *Hypertension* 6: III117-121.

35. Grossman E (2008) Does increased oxidative stress cause hypertension? *Diabetes Care* 31 Suppl 2: S185-189.
36. Bruce MC, Pawlowski R, Tomashefski JF, Jr. (1989) Changes in lung elastic fiber structure and concentration associated with hyperoxic exposure in the developing rat lung. *Am Rev Respir Dis* 140: 1067-1074.
37. Blanco LN, Frank L (1993) The formation of alveoli in rat lung during the third and fourth postnatal weeks: effect of hyperoxia, dexamethasone, and deferoxamine. *Pediatr Res* 34: 334-340.
38. Lopez E, Boucherat O, Franco-Montoya ML, Bourbon JR, Delacourt C, et al. (2006) Nitric oxide donor restores lung growth factor and receptor expression in hyperoxia-exposed rat pups. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 738-745.
39. Chen CM, Wang LF, Chou HC, Lang YD, Lai YP (2007) Up-regulation of connective tissue growth factor in hyperoxia-induced lung fibrosis. *Pediatr Res* 62: 128-133.
40. Gunes T, Koklu E, Yikilmaz A, Ozturk MA, Akcakus M, et al. (2007) Influence of maternal smoking on neonatal aortic intima-media thickness, serum IGF-I and IGFBP-3 levels. *Eur J Pediatr* 166: 1039-1044.
41. Skilton MR, Evans N, Griffiths KA, Harmer JA, Celermajer DS (2005) Aortic wall thickness in newborns with intrauterine growth restriction. *Lancet* 365: 1484-1486.
42. Raines EW (2000) The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. *International Journal of Experimental Pathology* 81: 173-182.



43. Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA, Libby P (1998) Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest* 102: 576-583.
44. Wang B, Sun J, Kitamoto S, Yang M, Grubb A, et al. (2006) Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J Biol Chem* 281: 6020-6029.
45. Hirakawa H, Pierce RA, Bingol-Karakoc G, Karaaslan C, Weng M, et al. (2007) Cathepsin S deficiency confers protection from neonatal hyperoxia-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 778-785.
46. Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, et al. (1998) The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem* 273: 32347-32352.
47. Kafienah W, Bromme D, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP (1998) Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J* 331 ( Pt 3): 727-732.
48. Knaapi J, Lukkarinen H, Kiviranta R, Steiner A, Lassus P, et al. (2006) Cathepsin K expression is diminished in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Acta Paediatr* 95: 1298-1300.
49. Buhling F, Rocken C, Brasch F, Hartig R, Yasuda Y, et al. (2004) Pivotal role of cathepsin K in lung fibrosis. *Am J Pathol* 164: 2203-2216.
50. Chow AK, Cena J, Schulz R (2007) Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol* 152: 189-205.

51. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM (1995) Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 77: 863-868.
52. Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, et al. (1991) Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol Chem* 266: 7870-7875.
53. Hayashi A, Ryu A, Suzuki T, Kawada A, Tajima S (1998) In vitro degradation of tropoelastin by reactive oxygen species. *Arch Dermatol Res* 290: 497-500.
54. Pardo A, Barrios R, Maldonado V, Melendez J, Perez J, et al. (1998) Gelatinases A and B are up-regulated in rat lungs by subacute hyperoxia: pathogenetic implications. *Am J Pathol* 153: 833-844.
55. Hosford GE, Fang X, Olson DM (2004) Hyperoxia decreases matrix metalloproteinase-9 and increases tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 protein in the newborn rat lung: association with arrested alveolarization. *Pediatr Res* 56: 26-34.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1. Impact of neonatal oxygen exposure on vascular ROS production and vasomotricity in 4 wks-old rats**

**A:** Vasoconstrictor response to angiotensin II in aortic rings from control and H rats at 4 weeks. Constriction is expressed relative (percentage) to the response elicited by KCl (80 mM). Data are mean  $\pm$  SEM. **B:** Vasodilatory response to carbachol in aortic rings from 4 week old control and H rats. Vasodilatation is expressed as percent reversal of U46619 (0.3  $\mu$ M)-induced vasoconstriction. Data are mean  $\pm$  SEM. **C:** Representative sections of aorta (X20 magnification) after treatment with hydroethidine (2  $\mu$ M) in control and H rats at 4 weeks of age.

### **Figure 2. Neonatal oxygen exposure does not lead to hyperplasia or hypertrophy in aortic media.**

Aortic cross-sectional area (**A**), aortic smooth muscle cell number (**B**) and Media/Lumen ratio (**C**) in control and H rats at 4 weeks of age, data are mean  $\pm$  SEM.

### **Figure 3. Neonatal oxygen exposure increased collagen and decreased elastin content in aortic media.**

Representative photomicrographs (X10 magnification) of aorta with elastic fibers stained using Verhoeff staining (**A**) and aorta with collagen fibers stained using Masson Trichrome staining (**B**). The density of elastic fibers (**C**) and collagen fibers (**D**) in control and H groups at 4 weeks of age, data are mean  $\pm$  SEM, NS : non significant, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p <$

0.01,\*\*\*  $p < 0.001$ . Density is expressed relative (percentage) to media area. **E**: Density of elastic fibers / Density of collagen fibers ratio in control and H groups. **F**: Collagen I immunoblotting in aortas from control and H rats at 4 weeks of age, data are mean  $\pm$  SEM. **G** : Collagen III immunoblotting in aortas from control and H rats at 4 weeks of age, data are mean  $\pm$  SEM.

**Figure 4. Neonatal oxygen exposure increased cathepsin S and decreased cathepsin K in aortic media.**

Cathepsin S (**A**) and Cathepsin K (**B**) immunostaining in aortas (magnitude X20) from control and H rats at 4 weeks of age, data are mean  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Figure 5. Neonatal oxygen exposure increased MMP-2 and decreased TIMP-2 in aortic media.**

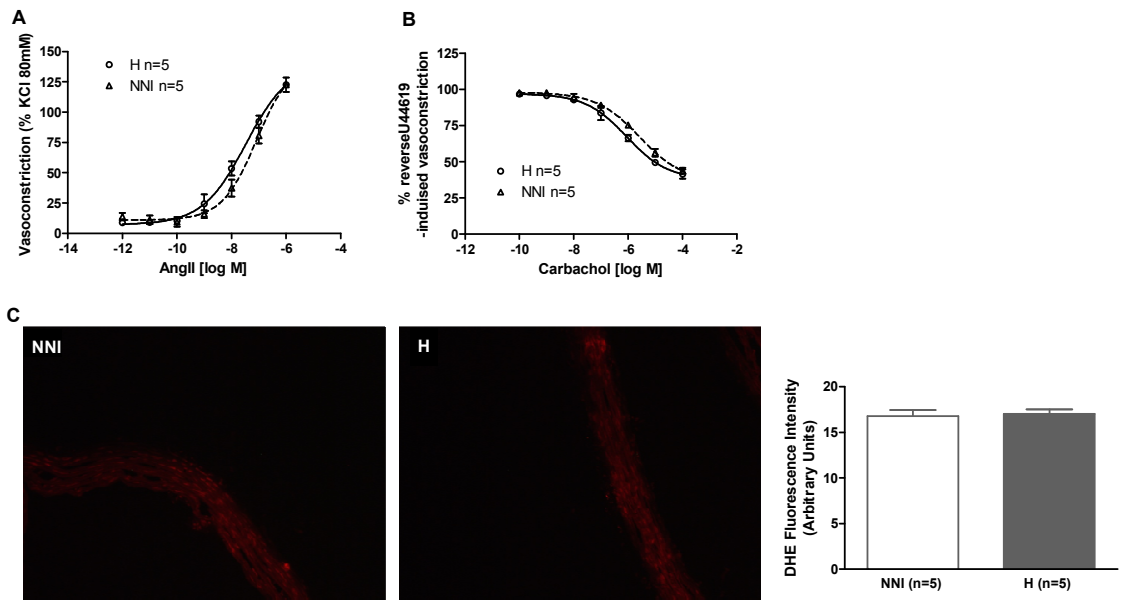
**A**: MMP-2 immunostaining in aortas (magnitude X20) from control and H rats at 4 weeks of age, data are mean  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ . **B**: Zymography analysis for 72 kDa MMP-2 in aortas from control and H rats at 4 weeks of age, data are mean  $\pm$  SEM.  $p < 0.001$ . **C**: TIMP-2 immunostaining in aortas (magnitude X20) from control and H rats at 4 weeks of age, data are mean  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Figure 6. Neonatal oxygen exposure decreased MMP-9 and increased TIMP-1 in aortic media.**

**A**: MMP-9 immunostaining in aortas (magnitude X20) from control and H rats at 4 weeks of age, data are mean  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ . **B**: Zymography analysis for 130 kDa MMP-9

in aortas from control and H rats at 4 weeks of age, data are mean  $\pm$  SEM.  $p < 0.001$ . C:  
TIMP-1 immunostaining (magnitude X20) in aortas from control and H rats at 4 weeks of  
age, data are mean  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Figure 1**



**Figure 2**

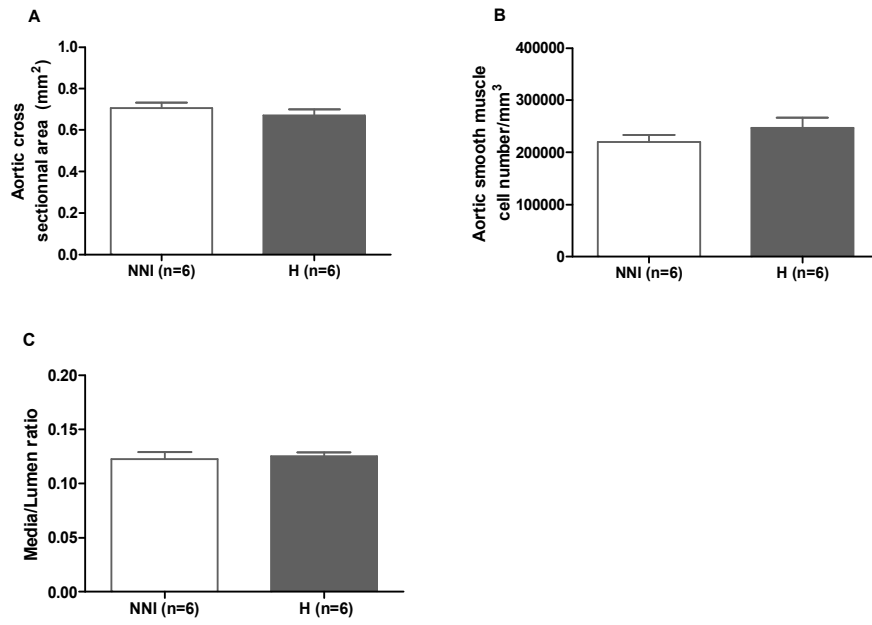


Figure 3

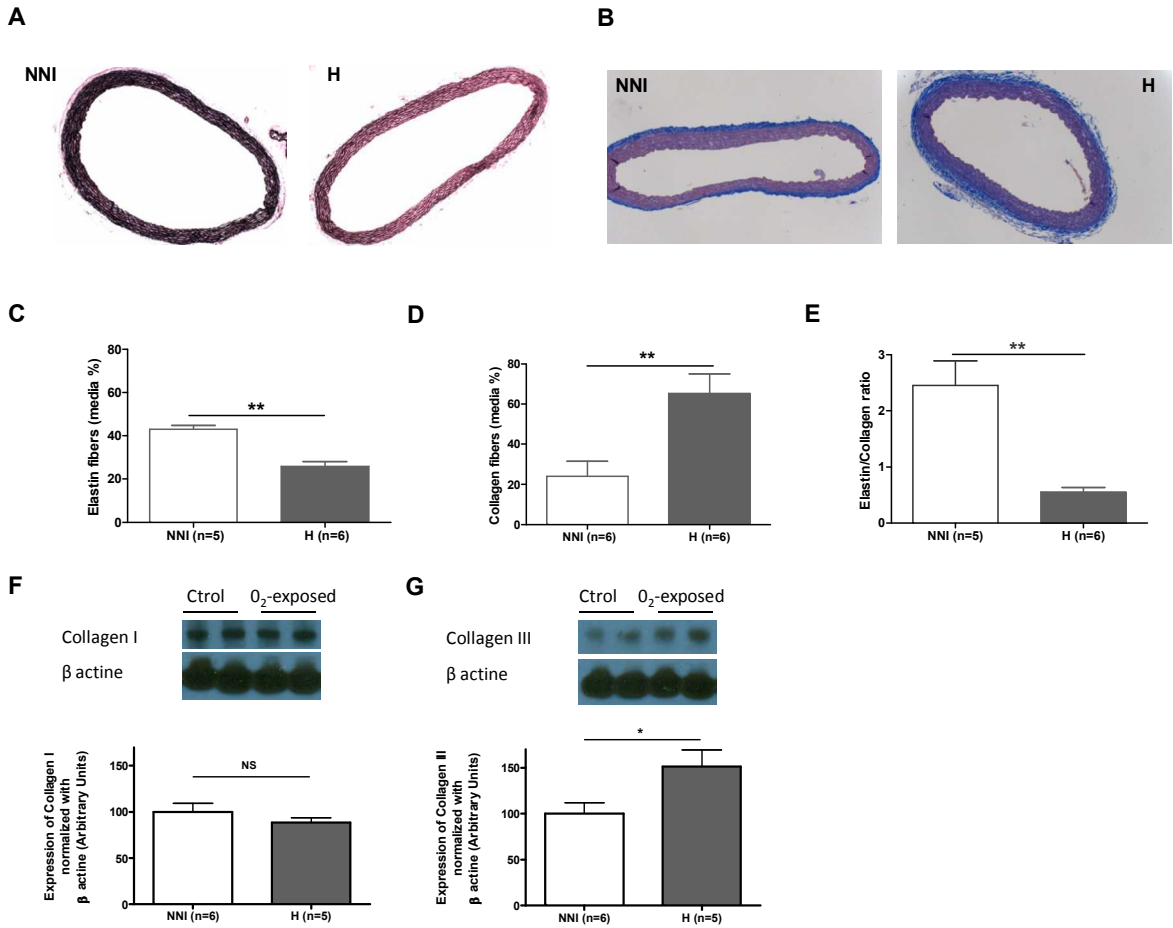




Figure 4

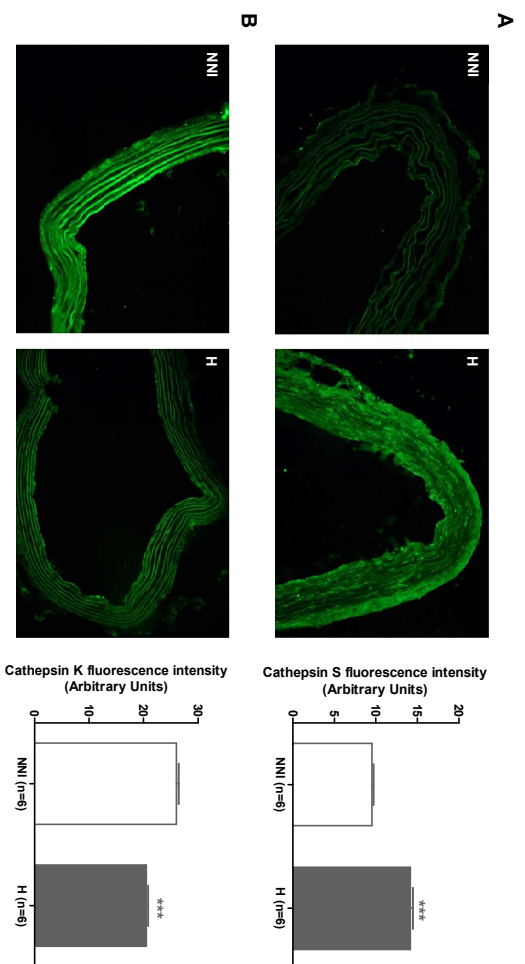


Figure 5

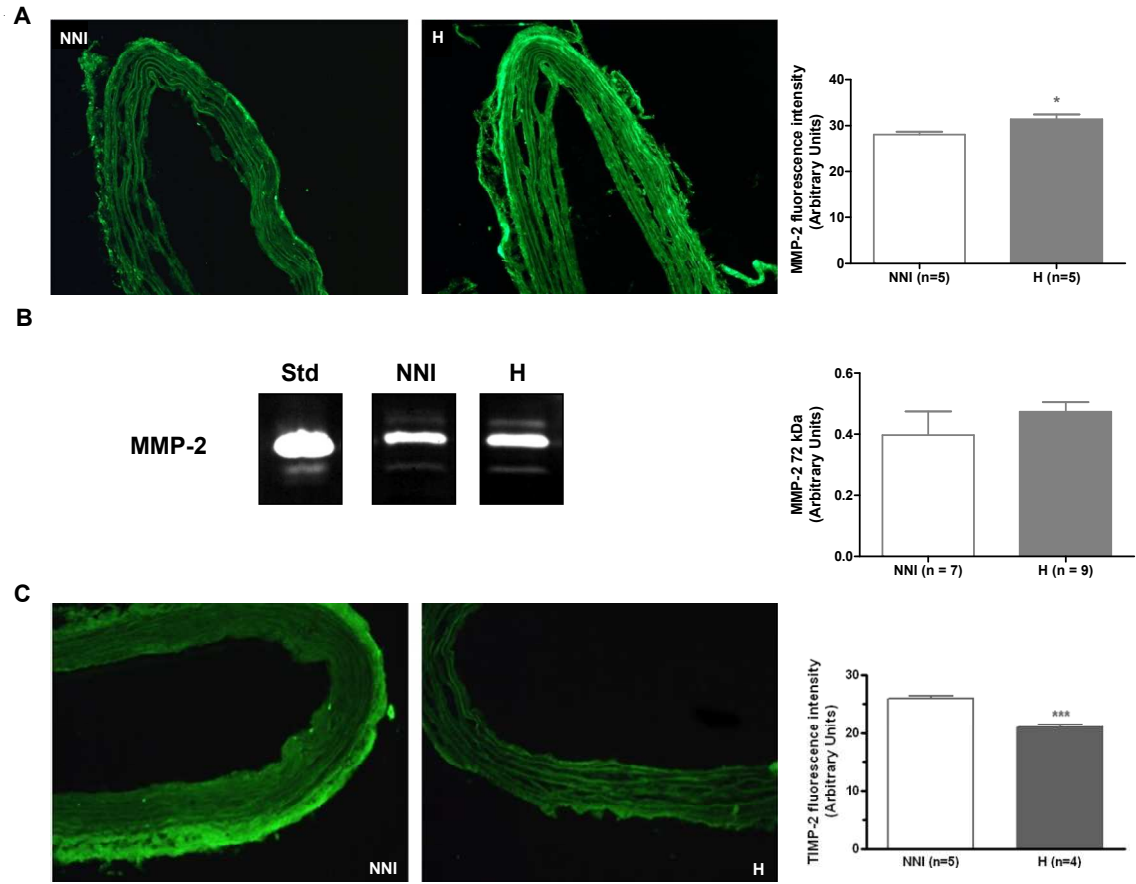
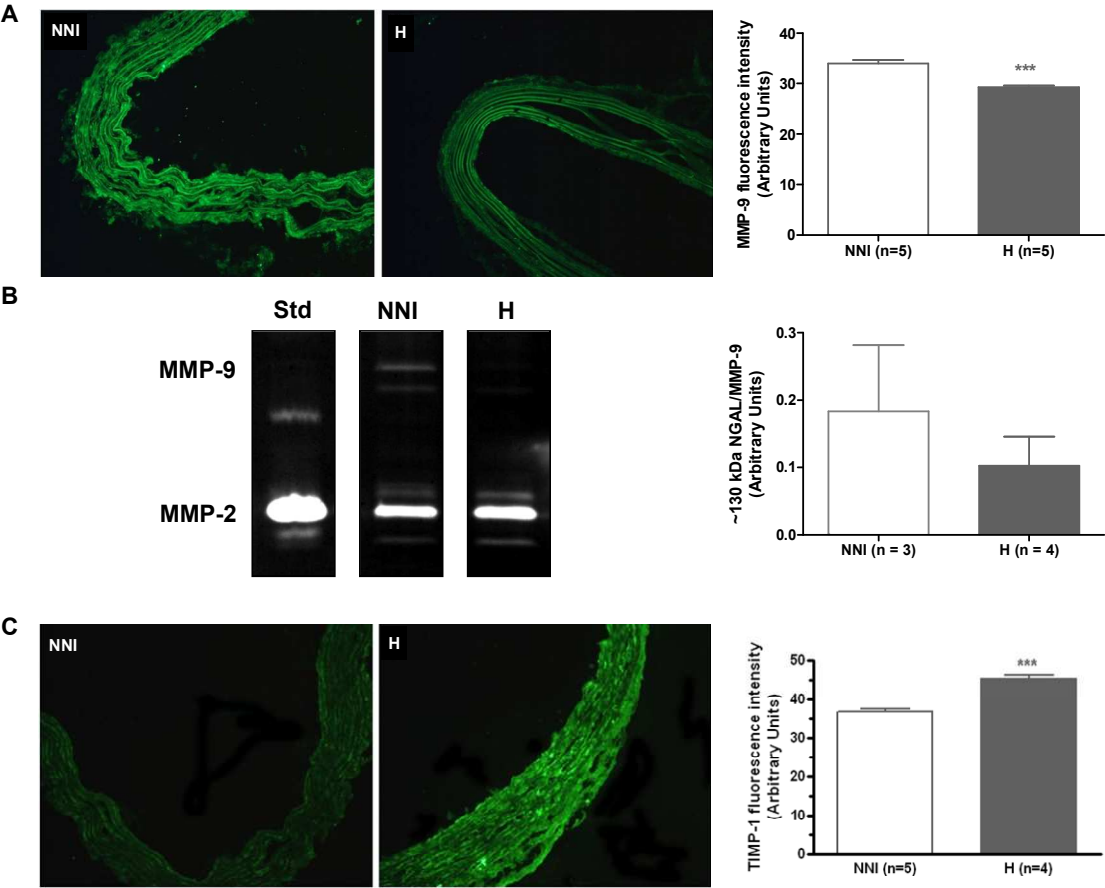


Figure 6



**Troisième Article :**

**Evidence of arterial stiffness in young adults born extremely preterm  
(<29 weeks).**

## **Contribution de chaque auteur aux travaux de recherche présentés dans cet article**

Fanny Huyard a réalisé les plans expérimentaux et reçu les participants le jour de leur visite au CHU Sainte Justine, ainsi que l'ensemble de l'analyse des données. Le Dr. Vaujois a réalisé l'ensemble des mesures échocardiographiques. Le Dr Josée Dubois a réalisé les mesures de l'épaisseur intima-média. Fanny Huyard a rédigé la totalité du manuscrit. Le Dr Nuyt a corrigé le manuscrit.

**Etat de publication : En préparation, sera soumis ultérieurement**

### **Contexte de l'étude**

Des travaux antérieurs ont montré que la grande prématurité est associée à une augmentation du risque cardiovasculaire et à une élévation de la pression artérielle à l'âge adulte. Nous avons précédemment démontré dans un modèle animal que des phénomènes de vieillissement prématuré des vaisseaux (Article 1) ainsi que du remodelage vasculaire et une modification du ratio collagène /élastine (Article 2) pouvaient être mis en jeu.

### **Objectifs**

L'objectif de cette étude est de caractériser l'arbre vasculaire au niveau des propriétés biophysiques de l'aorte pouvant ainsi mettre en évidence une rigidité artérielle accrue, indice de vieillissement vasculaire précoce chez des adultes nés prématurés.

## **Méthodes**

20 adultes nés très prématurément appartenant à une cohorte préalablement constituée et 20 contrôles nés à terme ont été étudiés. La vitesse d'onde de pouls (VOP) a été mesurée au niveau de l'arc aortique. Des indices de rigidité ont été calculés: le  $\beta$  stiffness index ( $\beta$ SI), le Peterson's elastic modulus ( $E_p$ ), les impédances caractéristique ( $Z_c$ ) et d'entrée ( $Z_i$ ). Le  $\beta$ SI et l' $E_p$  ont été calculés en mesurant la distensibilité artérielle au niveau de l'aorte ascendante. La  $Z_c$  et la  $Z_i$  ont été calculées en mesurant la surface de l'anneau aortique et la vitesse d'éjection du flux dans l'aorte ascendante. Les tensions artérielles ont également été mesurées, ainsi que l'épaisseur intima-média.

## **Résultats**

Comparés aux sujets nés à terme, les prématurés ont une pression artérielle systolique légèrement plus élevée mais non significative. Les pressions artérielles diastolique et moyenne ne présentent pas de différence. La VOP ne présente pas de différence chez les prématurés comparés aux contrôles. Le  $\beta$ SI et l' $E_p$ , reflétant directement la rigidité artérielle au niveau central, ne sont pas significativement différents chez les prématurés comparés aux contrôles. La  $Z_c$  et la  $Z_i$ , reflétant les résistances à l'éjection du flux, présentent une augmentation comparées aux contrôles. L'épaisseur intima-média des sujets nés prématurément ne présente pas de différence comparé aux sujets nés à terme.

## **Conclusion**

Cette analyse nous indique une augmentation des indices de rigidité artérielle. Cette altération de l'arbre vasculaire pourrait intervenir dans la physiopathologie des complications cardiovasculaires associées.

# **EVIDENCE OF ARTERIAL STIFFNESS IN YOUNG ADULTS BORN EXTREMELY PRETERM (<29 WEEKS)**

Huyard Fanny<sup>1</sup>, Vaujois Laurence<sup>2</sup>, Bertagnolli Mariane<sup>1</sup>, Cloutier Anik<sup>1</sup>, Fallaha Catherine<sup>1</sup>, Bigras Jean-Luc<sup>2</sup>, Dubois Josée<sup>3</sup>, Benetos Athanase<sup>4</sup>, Nuyt Anne Monique<sup>1</sup>.

Department of Pediatrics (Divisions of Neonatology<sup>1</sup> and Cardiology<sup>2</sup>), Department of Radiology<sup>3</sup>, Ste-Justine University Hospital and Research Center, 3175 chemin de la Côte Sainte-Catherine, H3T 1C5 Montréal (Québec), Canada.

**Running head:** Arterial Stiffness in Young Adults Born Preterm

**Word Count:** 4534

**Abstract:** 385

**Tables:** 4

**Corresponding author and address for reprint requests:**

Anne Monique Nuyt, MD

Sainte-Justine University Hospital Research Center

3175 chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montreal (Quebec), Canada, H3T 1C5

Telephone number: [REDACTED]

Fax number: [REDACTED]



## **Abstract**

**Background:** Epidemiological studies reported that individuals born preterm have increased arterial systemic blood pressure in adulthood. We have recently shown in an animal model that premature vascular aging could be involved in this process.

**Aim:** The purpose of this study was to assess biophysical properties (arterial stiffness) of the aorta as early signs of a vascular aging process in young adults born extremely preterm.

**Methods:** We studied 20 young adults (aged  $22.2 \pm 1.6$  years) born extremely preterm ( $27.1 \pm 1.3$  weeks,  $948 \pm 249$  grams) in the absence of any significant medical or neurodevelopmental co-morbidity. Subjects were compared to 20 controls born at term ( $40.3 \pm 1.3$  weeks,  $3576 \pm 406$  grams), matched for age and familial socioeconomic status. The aortic diameter, the pulse wave transit time around the aortic arch and the ascending aortic peak flow were measured with echo-Doppler and the blood pressure recorded simultaneously. Pulse wave velocity, aortic input impedance ( $Z_i$ ), characteristic impedance ( $Z_c$ ), arterial pressure-strain elastic modulus ( $E_p$ ), and arterial wall stiffness index ( $\beta SI$ ) were calculated. Carotid intima media thickness was also measured.

**Results:** Preterm young adults had slightly but not significantly increased arterial systolic blood pressure compared to young adults born at term ( $113.1 \pm 10.8$  vs.  $109.4 \pm 11.1$  mmHg,  $p=0.29$ ). Diastolic and mean arterial blood pressure were similar ( $62.9 \pm 7.7$  vs.  $61.1 \pm 6.4$ ,  $p=0.42$  and  $80.3 \pm 8.4$  vs.  $77.3 \pm 8.2$  mmHg,  $p=0.26$  respectively). Pulse wave velocity did not differ between groups (preterm:  $4.0 \pm 1.0$  vs. term:  $3.3 \pm 1.0$  m/sec,  $p=0.53$ ).  $\beta SI$  and  $E_p$ , direct indices of central arterial rigidity, were not significantly different between preterm and control groups ( $4.9 \pm 2.9$  vs.  $4.2 \pm 1.3$ ,  $p=0.29$  and  $58.2 \pm 30.0$  vs.  $47.7 \pm 15.8$  kPa,  $p=0.18$  respectively).  $Z_c$  and  $Z_i$ , indices of the resistance to ejection to blood flow, were increased

in preterms compared to controls ( $146.5 \pm 39.2$  vs.  $112.5 \pm 32.6$ ,  $p < 0.01$  and  $198.9 \pm 37.0$  vs.  $162.4 \pm 33.0$ ,  $p < 0.01$  dynes. sec.  $\text{cm}^{-5}$ , respectively). No difference was found in the intima media thickness in relation to lumen diameter of carotid artery in men preterms and in women preterm compared to controls ( $10.4 \pm 1.0$  vs.  $10.9 \pm 1.1$ ,  $p = 0.38$  and  $10.3 \pm 1.2$  vs.  $9.6 \pm 1.0$ ,  $p = 0.15$  respectively).

**Conclusions:** Current data demonstrates that young adults who were born very preterm present early indices of arterial rigidity (impedance parameters) compared to term controls, despite no detected difference in blood pressure values. This alteration of the vascular tree could be a patho-physiological mechanism linking prematurity to adult cardiovascular diseases.

**Key words:** Vessels, Ageing, Hypertension, Preterm birth, Cardiovascular disease prevention, Vascular resistance, Arterial Stiffness

## **Introduction**

Extreme prematurity is linked to higher blood pressure in later life (de Jong, Monuteaux et al. 2012) and recent reports indicate increased incidence of chronic hypertension (Boivin, Luo et al. 2012). In addition, it is also known that premature birth can affect the developing vascular tree (Norman 2008). In the aortic wall, synthesis of elastin, which has a significant impact on the structure and function of large elastic arteries such as the aorta (Martyn and Greenwald 1997), peaks in late gestation and falls rapidly after birth (Berry, Looker et al. 1972). Disruption in this process might have a significant impact on the structure and function of large elastic arteries, such as the aorta (Martyn and Greenwald 1997). Whether deleterious conditions associated with preterm birth might lead to changes in aorta wall structure and may predispose to accelerated arterial stiffness is unknown.

Alongside altered structure of vessels during development, measures of vascular health are known to be important predictors of cardiovascular disease in adulthood. Evidence exists to support the hypothesis that lower arterial elasticity is associated with increased risk of cardiovascular disease (Arnett, Evans et al. 1994; Hodes, Lakatta et al. 1995). The normal aorta is elastic and acts as a buffer the pulsatile blood flow. The stiffer the aorta, the faster the propagation of the pulsatile flow wave to the tissues. In fact, it is well known that large arteries stiffness is an important risk factor for cardiovascular diseases (Vlachopoulos, Aznaouridis et al. 2010). Direct measures of aortic stiffness can be used to assess this property. The arterial pressure strain-elastic modulus ( $E_p$ ) and the arterial wall stiffness index, called the  $\beta$  stiffness index ( $\beta SI$ ), assess the relation of the pulsatile flow changes in the aorta related to blood pressure and arterial diameter. There

are also indirect measures of aortic stiffness, like pulse wave velocity (PWV), Input impedance ( $Z_i$ ) and characteristic impedance ( $Z_c$ ). The vascular impedance in a pulsatile blood flow like the arterial circulation is an accurate measure of the resistance to left ventricular ejection.

We hypothesised that preterm birth leads to changes in biophysical properties of large elastic arteries. This would result in a premature vascular stiffness, a characteristic element of vascular aging. Our laboratory had previously shown that  $O_2$  exposure of newborn rats, a well-established model of prematurity-related oxygen injury, had long term systemic vascular consequences leading in early adulthood to elevated blood pressure, endothelial dysfunction and increased vascular stiffness, in addition to microvascular rarefaction (Mivelaz, Yzidorczyk et al. 2011; Yzidorczyk, Comte et al. 2012) (Yzidorczyk, Comte et al. 2008), all are markers of aging.

The aim of current research was to assess biophysical properties (arterial stiffness) of the aorta as early signs of a vascular aging process in young adults born extremely preterm. To our knowledge, there is no study assessing these parameters in the aorta in a population of young adults born very preterm.

## **Methods**

### **Study Population**

20 young adults who were born very preterm with a gestational age of less than 29 weeks, and 20 healthy full-term young adults have been enrolled. The study protocol was approved by the ethics Committee of the Institution. Written informed consent was obtained before blood collection according to the Declaration of Helsinki.

### **Clinical Measures**

A complete history and physical data were recorded. Heights and weights were measured to calculate the body mass index (BMI). Resting brachial systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressures (DBP) and heart rate were recorded by auscultation with the standard sphygmomanometry cuff technique (Dinamap Technology V100, GE Healthcare, USA). An adapted blood pressure cuff was selected for each patient. Five brachial blood pressure measurements were taken. The two first measures were considered a calibration measure, so brachial blood pressure that we present were determined from the average of the last three measures (Pickering, Hall et al. 2005).

### **Echocardiography assessment**

All studies were performed in the morning, with subjects fasting and resting supine in a quiet darkened, temperature-controlled (22°C) room. A Philips iU22 ultrasound machine (Philips, Eindhoven, The Netherlands) equipped with a 17- to 5-MHz broadband linear-array transducer was used. All participants initially had a standard M-mode and two-dimensional echocardiography to exclude congenital heart disease. The biophysical properties of the aorta were derived with an echo-Doppler method. In a high left parasternal view, an M-mode recording was made at a right angle, and the ascending aortic

diameters (end-diastolic minimum dimension (AAOD) and the maximum systolic dimension (AAOS)) were recorded. Diameters were measured on two-dimensional and M-mode images with the trailing to leading edge method. In a standard suprasternal long axis view, an ascending aortic pulsed-wave Doppler tracing was recorded, and the peak aortic velocity (Vmax) was measured. The time from the QRS to the onset of the ascending aortic Doppler envelope (T1) was measured. Maintaining the same transducer position, the pulsed-wave Doppler sample volume was immediately placed as distal as possible in the descending aorta and the time from the QRS to the onset of the descending aorta Doppler envelope (T2) was measured. With the same two-dimensional image, the aortic arch length (L) between these 2 sample volume positions was obtained by summing 5 serial measurements made with electronic calipers along the central axis of this curved segment of the aorta. All echocardiographic measurements were averaged over 3 or 5 consecutive cardiac cycles, depending on the parameters. The following calculations were used:

$$\text{Transit Time (TT)} = T2 - T1 \text{ (sec);}$$

$$\text{Pulse Wave Velocity (PWV)} = L / TT \text{ (cm/sec);}$$

$$\text{Elastic modulus (Ep)} = (SBP - DBP) / [(AAOS - AAOD) / AAOD] \text{ (kPa);}$$

$$\beta \text{ stiffness Index } (\beta SI) = \ln (SBP / DBP) / [(AAOS - AAOD) / AAOD];$$

$$\text{Pulse Pressure (PP)} = SBP - DBP \text{ (mmHg);}$$

$$\text{Aortic Annulus cross-sectional area (AoCSA)} = \pi \times (\text{Aortic Annulus}/2)^2 \text{ (cm}^2\text{);}$$

$$\text{Peak flow} = V_{\text{max}} \times \text{AoCSA} \text{ (cm}^3\text{/ sec);}$$

$$\text{Input impedance (Zi)} = (\text{PP}/\text{peak flow}) \text{ (dyne. sec. cm}^{-5}\text{, 1 mmHg} = 1333 \text{ dyne/cm}^2\text{); Characteristic impedance (Zc)} = \text{PWV} \times \rho / \pi \times \text{ANNcsa} \text{ (dyne. sec. cm}^{-5}\text{, blood density } \rho = 1.06 \text{ g/cm}^3\text{).}$$

**Carotid Intima media thickness (cIMT) measurement:**

cIMT was measured in supine position by recording of ultrasonographic images of both left and right carotid artery, using one 7.5 MHz linear array transducer (ATL Ultramark IV; Advanced Technology Laboratories, Bethel, Washington). On the R-wave of the electrocardiogram, 3 longitudinal images of the near and far wall of the common carotid artery were frozen and stored on videotape. These frozen images were digitalized and displayed on the screen of a computer using a frame grabber (VP 1400-KIT-512-E-AT; Imaging Technology, Woburn, Massachusetts). The common cIMT was determined as the mean of the mean near and far wall measurements of both the left and right side common carotid artery.

**Statistical analysis**

Values are expressed as means  $\pm$  Standard Deviation (SD). Analyses of differences between groups were performed with two-tailed Student's *t* test using IBM SPSS Statistics, version 19.0 (SPSS, IBM, Somers, New York). Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## **Results**

### **Patient characteristics**

**Table 1** shows the general birth characteristics of young adults who were born very preterm compared to young adults born at term. Fifteen of them were small for gestational age at birth.

General characteristics of young adults who were born very preterm compared to young adults born at term are shown in **Table 2**. No significant differences were observed in the values of age, weight and BMI between the 2 groups. Young adults born preterm were significantly smaller (height) compared to young adults born at term. Also, no significant differences were observed in the measure of SBP, DBP, MBP or PP. All these values, which were all within the range of normal values, were slightly higher than those for the control group, in accordance with the literature (de Jong, Monuteaux et al. 2012), but not significantly so. Heart rate was not different between the two groups.

### **Haemodynamic data**

**Table 3** shows the echo-Doppler data and the arterial biophysical properties of young adults who were born very preterm compared to young adults born at term. The aortic annulus and ascending aorta diameters in systole and diastole (AAOS and AAOD) were significantly smaller in young adults born preterm than in control participants. The biophysical properties of the aorta: PWV, Ep,  $\beta$ SI were not statistically different between the two groups, but showed a slight increase in young adults born preterm compared to controls. Zi and Zc were significantly higher in young adults born preterm compared to controls, which is consistent with increased vascular stiffness in these patients.



### **Carotid Intima media thickness measurement**

Carotid artery measurements of young adults born very preterm compared to young adults born at term are presented in **Table 4**. Absolute IMT was not different between the two groups. We studied the diameter of the carotid artery as it was reported that young adults (aged 18 to 27) born with a very low birth weight have smaller carotid artery diameter (Hovi, Turanlahti et al. 2011). No difference in the diameter was found in our cohort; when genders were analyzed separately, carotid diameter tended to be increased in preterm vs. term females and to be reduced in preterm vs. term males. Finally, the calculation of IMT in relation to lumen carotid artery diameter showed no difference between groups.

**Discussion:**

Our findings demonstrate that the biophysical properties of the aorta are already abnormal in young adults born very preterm (<29 weeks gestational age) compared to young adults born at term. These changes in the properties of the aorta are present while blood pressure values were not different, and are indicative of increased aortic stiffness in this population.

Preterm birth may disrupt or even prematurely arrest proper development of the vascular tree, in terms of both vessel wall structure and active organ development (Norman 2008; Nuyt and Alexander 2009). This may result in a restricted vascular bed, relatively narrowed blood vessels, and somewhat stiffer arteries, all predisposing to arterial hypertension.

No difference was found in the direct measures of arterial stiffness (Ep and BSI) and neither in the PWV, but the impedances ( $Z_i$  and  $Z_c$ ) showed a strong increase in subjects born very preterm compared to those born at term.

All values of arterial stiffness are pressure-dependant (O'Rourke, Staessen et al. 2002). Considering no significant difference in blood pressure values was found in our study (Table 2), the difference observed in the impedance values can reflect changes in the structure of the vessels itself, not related to the pressure. Moreover, no difference was observed in the heart rate (Table 2); reinforcing the role of the structure itself. It is known that impedance parameters relate assessment of the resistance (Izzo 2004). Impedance is the pulsatile equivalent of the resistance and it describes the cyclic change in pressure (pulse pressure) caused by a corresponding change in blood flow (O'Rourke and Taylor 1967; O'Rourke and Hashimoto 2007). However, pulse wave analysis does not selectively reflect

propagation of pressure waves in the elastic arteries like aorta (Laurent, Cockcroft et al. 2006), thus there may be an alternative explanation for these findings, such as small artery remodelling and narrowing like Norman suggested in his systematic review (Norman 2008). Moreover, Bonamy and al have shown that preterm adolescent girls had significantly abdominal narrower aorta, and lower peripheral blood flow which suggests increased vascular resistance (Bonamy, Bendito et al. 2005); in this study, both SBP and DBP were increased in the preterm adolescents girls compared to controls. The finding of a narrower abdominal aorta in preterm girls despite a higher pressure indicates that the difference in diameter has a structural basis. The reduced caliber of the aorta in preterm girls may be partly related to the lower height that they found (like we did). Another hypothesis could also be the possibility of halted aortic development after preterm birth.

Taken together, these data and those of the current study support the postulate that extreme prematurity seems to be associated with an abnormal development of both resistance and conductance vessels. The long term consequences of these findings are potential risk factors for cardiovascular mortality.

The stiffness of an artery depends on the composition and arrangement of the materials in the arterial wall. Arterial distensibility and elasticity depend largely on the ratio of elastin and the more rigid collagen in arterial walls (Jacob 2003). As described, in humans, elastin synthesis peaks toward the end of gestation (near term), declines very rapidly after birth, and is minimal in adults (Berry, Looker et al. 1972; Martyn and Greenwald 1997). Disruption of elastin synthesis at the end of gestation or in the event of preterm birth may have long-term consequences. A deficit in elastin and an increase in arterial stiffness were reported in animal models of developmental programming of

hypertension associated with nutrient restriction *in utero* (Khorram, Momeni et al. 2007) and importantly, as concerns preterm birth, in our previous studies of the long-term effects of neonatal hyperoxic stress (Mivelaz, Yzydorczyk et al. 2011).

Other studies have reported increased aortic stiffness in children aged 7-14 years born moderately or very preterm (Bonamy, Bendito et al. 2005; McEniery, Bolton et al. 2011; Rossi, Tauzin et al. 2011). Interestingly, in Rossi's study of 14-year-olds born at 34 weeks, pulse wave velocity in the control full-term groups was similar regardless of whether or not intra uterine growth restriction was present, supporting the impact of (even moderate) preterm birth in itself on vascular outcomes.

Interrupted vascular tree development is a key component of characteristic preterm birth complications such as bronchodysplasia (Thébaud, Ladha et al. 2005) and retinopathy of prematurity (Hardy, Dumont et al. 2000). Mechanistic animal studies by us and others have shown that neonatal exposure to hyperoxic stress reduced angiogenic capacity and systemic microvascular density in adults (Yzydorczyk, Comte et al. 2008).

Regarding cIMT, no difference was found in our study in the assessment of these parameters. In contrast with what we found, a recent study showed that 18-27-year-olds with birth weight under 1500g have smaller carotid (Hovi, Turanlahti et al. 2011). In addition, they found that cIMT, though similar in absolute value (mm), was increased with respect to lumen diameter in adults with birth weight inferior to 1500g, compared to term controls (Hovi, Turanlahti et al. 2011). One possible explanation could be that adult lifestyle factors can affect the cIMT, especially in adult people, more than a long term effect of developmental programming early in life.

Several limitations might have influenced the results of this study. Firstly, longitudinal cohort studies are prone to selection bias where preterm participants more likely represent a more functional subset with higher socio economical status (Callanan, Doyle et al. 2001; Hille, Elbertse et al. 2005), lessening potential differences with term controls. This bias, however, could affect results conservatively; any group differences observed would in fact be all the more significant. Secondly, the number of patients in this study is relatively small compared to large epidemiologic studies. However, it was enough to uncover statistically significant data. Also, this study uses technical consideration of the echocardiographic Doppler method to calculate PWV. This requires measurement of the rapid transit time of the central pulse wave, and current echocardiographic machines are unable to accurately measure the curve of the aortic length around the aortic arch. In addition, the SBP and the DBP used for the calculations were obtained from the brachial artery and not from central pressure. Thirdly, our participants will not yet have attained the age of increasing incidence of chronic disease hence the identification of risk conditions, which have been rigorously defined. A decline in physiological function, even within normal range, remains significant and noteworthy considering the gradual age-related decreases sure to follow, thus predisposing these individuals to earlier disease onset. Finally, arterial stiffness parameters and blood pressure measures are obtained at the same time point, thus limiting the establishment of causal relationship.

## **Conclusions**

Because arterial wall stiffness seems to reflect the degree of early cardiovascular change in the arterial tree, when the effects of the risk factors for cardiovascular events are being evaluated, measurements of the stiffness by aortic ultrasound may be warranted. Additional ongoing prospective studies are necessary to assess whether or not the detectable modification of aortic impedances implies an increased risk of future cardiovascular events in preterm population.

## **Acknowledgments / Sources of funding**

This project receives financial support from Centre de promotion de la Santé CHU Sainte-Justine / Fondation Lucie et André Chagnon. Fanny Huyard was supported by a fellowship from the- Quebec Training Network in Perinatal Research (Canadian Institutes of Health Research). Anne Monique Nuyt was supported by a salary award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## **Disclosure**

None.

## References

- Arnett, D. K., G. W. Evans, et al. (1994). "Arterial stiffness: a new cardiovascular risk factor?" *Am J Epidemiol* **140**(8): 669-682.
- Berry, C. L., T. Looker, et al. (1972). "Nucleic acid and scleroprotein content of the developing human aorta." *Journal of Pathology* **108**(4): 265-274.
- Berry, C. L., T. Looker, et al. (1972). "Nucleic acid and scleroprotein content of the developing human aorta." *J Pathol* **108**(4): 265-274.
- Boivin, A., Z. C. Luo, et al. (2012). "Pregnancy complications among women born preterm." *CMAJ* **184**(16): 1777-1784.
- Bonamy, A. K., A. Bendito, et al. (2005). "Preterm birth contributes to increased vascular resistance and higher blood pressure in adolescent girls." *Pediatr Res* **58**(5): 845-849.
- Callanan, C., L. Doyle, et al. (2001). "Children followed with difficulty: how do they differ?" *J Paediatr Child Health* **37**(2): 152-156.
- de Jong, F., M. C. Monuteaux, et al. (2012). "Systematic review and meta-analysis of preterm birth and later systolic blood pressure." *Hypertension* **59**(2): 226-234.
- Hardy, P., I. Dumont, et al. (2000). "Oxidants, nitric oxide and prostanoids in the developing ocular vasculature: a basis for ischemic retinopathy." *Cardiovasc Res* **47**(3): 489-509.
- Hille, E. T., L. Elbertse, et al. (2005). "Nonresponse bias in a follow-up study of 19-year-old adolescents born as preterm infants." *Pediatrics* **116**(5): e662-666.
- Hodes, R. J., E. G. Lakatta, et al. (1995). "Another modifiable risk factor for cardiovascular disease? Some evidence points to arterial stiffness." *J Am Geriatr Soc* **43**(5): 581-582.
- Hovi, P., M. Turanlahti, et al. (2011). "Intima-media thickness and flow-mediated dilatation in the Helsinki study of very low birth weight adults." *Pediatrics* **127**(2): e304-311.
- Izzo, J. L., Jr. (2004). "Arterial stiffness and the systolic hypertension syndrome." *Curr Opin Cardiol* **19**(4): 341-352.
- Jacob, M. P. (2003). "Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions." *Biomed Pharmacother* **57**(5-6): 195-202.
- Khorram, O., M. Momeni, et al. (2007). "Nutrient restriction in utero induces remodeling of the vascular extracellular matrix in rat offspring." *Reprod Sci* **14**(1): 73-80.
- Laurent, S., J. Cockcroft, et al. (2006). "Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications." *Eur Heart J* **27**(21): 2588-2605.
- Martyn, C. N. and S. E. Greenwald (1997). "Impaired synthesis of elastin in walls of aorta and large conduit arteries during early development as an initiating event in pathogenesis of systemic hypertension." *Lancet* **350**(9082): 953-955.
- McEniery, C. M., C. E. Bolton, et al. (2011). "Cardiovascular consequences of extreme prematurity: the EPICure study." *J Hypertens* **29**(7): 1367-1373.
- Mivelaz, Y., C. Zydorczyk, et al. (2011). "Neonatal oxygen exposure leads to increased aortic wall stiffness in adult rats: a Doppler ultrasound study." *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* **2**: 184-189.
- Norman, M. (2008). "Low birth weight and the developing vascular tree: a systematic review." *Acta Paediatr* **97**(9): 1165-1172.

- Nuyt, A. and B. Alexander (2009). "Developmental programming and hypertension." Curr Opin Nephrol Hypertens **18**(2): 144-152.
- O'Rourke, M. F. and J. Hashimoto (2007). "Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective." J Am Coll Cardiol **50**(1): 1-13.
- O'Rourke, M. F., J. A. Staessen, et al. (2002). "Clinical applications of arterial stiffness; definitions and reference values." Am J Hypertens **15**(5): 426-444.
- O'Rourke, M. F. and M. G. Taylor (1967). "Input impedance of the systemic circulation." Circ Res **20**(4): 365-380.
- Pickering, T. G., J. E. Hall, et al. (2005). "Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 1: blood pressure measurement in humans: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research." Circulation **111**(5): 697-716.
- Rossi, P., L. Tauzin, et al. (2011). "Respective roles of preterm birth and fetal growth restriction in blood pressure and arterial stiffness in adolescence." J Adolesc Health **48**(5): 520-522.
- Thébaud, B., F. Ladha, et al. (2005). "Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization." Circulation **112**(16): 2477-2486.
- Vlachopoulos, C., K. Aznaouridis, et al. (2010). "Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis." J Am Coll Cardiol **55**(13): 1318-1327.
- Yzidorczyk, C., B. Comte, et al. (2008). "Neonatal oxygen exposure in rats leads to cardiovascular and renal alterations in adulthood." Hypertension **52**(5): 889-895.
- Yzidorczyk, C., B. Comte, et al. (2012). "DEVELOPMENTAL PROGRAMMING OF eNOS UNCOUPLING AND ENHANCED VASCULAR OXIDATIVE STRESS IN ADULT RATS AFTER TRANSIENT NEONATAL OXYGEN EXPOSURE." J Cardiovasc Pharmacol: In press.



**Table:****Table 1: General birth characteristics of young adults who were born very preterm compared to young adults born at term**

	<i>Term (n=20)</i>	<i>Preterm (n=20)</i>
Women/Men	13/7	11/9
Gestational age (weeks)	40.3 ± 1.3, (38.4,43.3) <sup>a</sup>	27.1 ± 1.3, (24.2,28.9)
Birth weight (g)	3576 ± 406, (3010,4500) <sup>b</sup>	948 ± 249, (615,1490)
Small for gestational age (<10 <sup>e</sup> perc), n (%)	N/A	3 (15%)
Ethnicity: Caucasian, n (%)	20 (100%)	16 (80%)
Bronchopulmonary dysplasia, n (%)	N/A	13 (65%)
Retinopathy, n (%)	N/A	5 (25%)

<sup>a</sup> n=16, <sup>b</sup> n=19. Data are presented as mean ± SD, (min,max) or number (%). N/A: not applicable.

**Table 2: General characteristics of young adults who were born very preterm compared to young adults born at term**

	<i>Men</i>			<i>Women</i>		
	<i>Term (n=7)</i>	<i>Preterm (n=9)</i>	<i>P value</i>	<i>Term (n=13)</i>	<i>Preterm (n=11)</i>	<i>P value</i>
Age (years)	24.4 ± 1.5	22.1 ± 1.4	<b>0.006**</b>	21.3 ± 2.1	22.3 ± 1.8	0.22
Height (cm)	184.6 ± 6.0	170.2 ± 4.7	<b>0.0001***</b>	167.3 ± 7.1	158.7 ± 6.1	<b>0.005**</b>
Weight (kg)	79.8 ± 13.9	72.0 ± 17.1	0.34	62.0 ± 8.4	59.2 ± 12.9	0.53
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.3 ± 3.3	24.7 ± 5.1	0.54	22.2 ± 2.1	23.5 ± 4.6	0.41
SBP(mmHg)	115.7 ± 15.1	115.5 ± 6.4	0.98	106.0 ± 6.1	110.9 ± 12.4	0.23
DBP (mmHg)	61.0 ± 7.5	61.3 ± 6.8	0.93	61.1 ± 6.2	64.2 ± 8.5	0.31
MBP (mmHg)	81.4 ± 10.2	81.1 ± 6.7	0.95	75.1 ± 6.3	79.6 ± 9.8	0.19
PP (mmHg)	54.7 ± 15.2	54.2 ± 6.4	0.93	44.9 ± 5.9	46.7 ± 7.7	0.52
Heart rate	73 ± 12	77 ± 10	0.44	82 ± 10	79 ± 12	0.48

BMI = Body Mass Index, SBP = Systolic Blood Pressure, DBP = Diastolic Blood Pressure, MBP = Mean Blood Pressure, PP = Pulse Pressure, Data are presented as mean ± SD. Bold type represents significant differences between the groups. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

**Table 3: Echo-Doppler data and Arterial Biophysical properties of young adults who were born very preterm compared to young adults born at term**

	<i>Men</i>			<i>Women</i>		
	<i>Term (n=7)</i>	<i>Preterm (n=9)</i>	<i>P value</i>	<i>Term (n=13)</i>	<i>Preterm (n=11)</i>	<i>P value</i>
Aortic annulus (mm)	22.9 ± 2.5	20.4 ± 1.9	<b>0.03*</b>	19.9 ± 1.2	18.4 ± 1.2	<b>0.007**</b>
AAOS (mm)	29.1 ± 2.7 <sup>a</sup>	24.9 ± 2.4	<b>0.008**</b>	25.7 ± 1.8	23.6 ± 1.8 <sup>b</sup>	<b>0.01*</b>
AAOD (mm)	26.1 ± 2.7 <sup>a</sup>	22.2 ± 2.5	<b>0.01*</b>	22.7 ± 1.5	21.0 ± 1.8 <sup>b</sup>	<b>0.02*</b>
PWV (m.sec)	4.0 ± 1.3 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.9	0.99	3.3 ± 0.8	4.0 ± 1.2	0.12
Zi (dyne. sec. cm <sup>-5</sup> )	155.5 ± 37.8	210.7 ± 48.2	<b>0.03*</b>	166.2 ± 31.1	189.2 ± 24.3	0.06
Zc (dyne. sec. cm <sup>-5</sup> )	107.8 ± 23.9 <sup>a</sup>	132.5 ± 32.7	0.14	114.7 ± 36.6	157.9 ± 41.8	<b>0.01*</b>
Ep (kPa)	59.3 ± 17.4 <sup>a</sup>	69.6 ± 34.3	0.51	42.3 ± 12.3	48.0 ± 22.5 <sup>b</sup>	0.45
βSI	4.9 ± 1.3 <sup>a</sup>	5.7 ± 2.9	0.53	3.9 ± 1.2	4.1 ± 2.1 <sup>b</sup>	0.69

AAOS = Ascending Aorta maximum Systolic dimension, AAOD = Ascending Aorta minimum Diastolic dimension, PWV = pulse wave velocity, Zi = input impedance, Zc = characteristic impedance, Ep = Peterson's elastic modulus, βSI = β stiffness index. <sup>a</sup> n=6' <sup>b</sup> n=10. Data are presented as mean ± SD. Bold type represents significant differences between the groups. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

**Table 4: Carotid artery measurements of young adults who were born very preterm compared to young adults born at term**

	<i>Men</i>			<i>Women</i>		
	<i>Term (n=7)</i>	<i>Preterm (n=9)</i>	<i>P value</i>	<i>Term (n=12)</i>	<i>Preterm (n=9)</i>	<i>P value</i>
Carotid artery (mm)	6.0 ± 0.3	5.7 ± 0.4	0.18	5.1 ± 0.7	5.4 ± 0.3	0.32
IMT (mm)	0.55 ± 0.06	0.55 ± 0.06	0.98	0.53 ± 0.03	0.53 ± 0.06	0.72
IMT (%)	10.9 ± 1.1	10.4 ± 1.0	0.38	9.6 ± 1.0	10.3 ± 1.2	0.15

IMT = Intima Media Thickness, IMT (%) = IMT in relation to lumen diameter of carotid artery : carotid artery/IMT. Data are presented as mean ± SD.

**Résultats additionnels :**

# 1. Matériels et méthodes

## 1.1 Modèle cellulaire

### 1.1.1 Etude de la prolifération cellulaire

#### 1.1.1.1 *Compte cellulaire*

Les cellules ont été cultivées en flasque T25 et ensemencées à  $7 \times 10^3$  cellules/mL dans 5mL de milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Wisent, Saint-Bruno, Canada). Elles ont ensuite été exposées à l'hyperoxie 12h après l'ensemencement afin de permettre l'attachement des cellules. La procédure d'exposition à l'hyperoxie est décrite dans le chapitre 3 et les cellules ont été récoltées pour le compte cellulaire suivant les temps décrits dans le chapitre 3 (immédiatement après l'exposition à l'O<sub>2</sub> et après un temps de repos en conditions contrôles), à l'aide de 1,5 mL de trypsine-EDTA 0,05 % (Invitrogen, Carlsbad, CA) pendant 5 mn à 37 C°, neutralisé ensuite avec du SVF volume à volume. Les cellules ont ensuite été comptées par un automate (Z1™ Coulter Counter®, Beckman Coulter, Mississauga, Canada).

#### 1.1.1.2 *Mesure de la synthèse d'ADN par incorporation de BrdU*

Le taux de synthèse a été évalué par l'incorporation au BrdU, qui est un analogue de la thymidine, en utilisant un kit ELISA (Roche, Laval, QC, Canada), suivant le protocole indiqué par le fabricant. Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 96 puits ( $1 \times 10^3$  cellules par puits) et exposées à l'hyperoxie pendant 24h. Le BrdU a été ajouté 2h avant la fin de l'exposition (recommandé par le fabricant), puis un dosage colorimétrique a été effectué.

### 1.1.2 Evaluation de la cytotoxicité par le test de libération de Lactate déshydrogénase

Afin d'évaluer si une réduction du nombre de cellules résulte davantage d'une mort cellulaire que d'un ralentissement du taux de la prolifération cellulaire (attribuable à un état de sénescence), un test de cytotoxicité au LDH (In Vitro Toxicology Assay Kit, Lactic Dehydrogenase based: TOX7 Sigma Aldrich, St. Louis, MO) à été effectué suivant les recommandations du fabricant. Le test est basé sur la réduction du NAD par la LDH. Le produit formé de la réduction du NAD (le NADH) est utilisé dans une conversion stœchiométrique d'un marqueur au tétrazolium. Le LDH libéré a été évalué dans le milieu de culture. La densité optique utilisée était à 490nm.

### 1.1.3 Evaluation des dommages à l'ADN : immunofluorescence du 53BP1

L'immunomarquage est réalisé avec un anticorps spécifique du 53BP1 (Novus Biologicals, 100-304, Oakville, ON, Canada). Une fixation de la culture cellulaire est réalisée à l'aide de paraformaldéhyde à 4% pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite lavées au PBS ; puis une étape de perméabilisation des cellules est effectuée avec du Triton 100X à 0.2% pendant 3 minutes. Un nouveau rinçage avec du PBS est effectué. Les sites protéiques aspécifiques sont bloqués par du sérum normal de chèvre (NGS : Normal Goat Serum) à 5% (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) pendant une heure. L'anticorps polyclonal primaire de lapin dilué au 1/50<sup>ème</sup> contre le 53BP1 est incubé pendant la nuit à 4°C. Trois rinçages sont ensuite effectués au PBS. Un anticorps secondaire fluorescent Alexa 488 dilué au 1/200<sup>ème</sup> (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) est ensuite incubé pendant 2h dans

l'obscurité à température de la pièce. Les cellules ont été marquées au DAPI (DAKO Cytomation, Carpinteria, CA) pour la visualisation des noyaux et sont ensuite lavées une dernière fois au PBS puis fixées entre une lame et une lamelle pour l'observation au microscope à fluorescence (Nikon, Eclipse E800, Mississauga, ON, Canada). Le laser utilisé pour l'excitation est bleu à 470 nm et le recueil est effectué dans le vert à 510 nm.

## **1.2 Cohorte**

### 1.2.1 Evaluation d'indices de stress oxydant

#### *1.2.1.1 MDA*

Les concentrations plasmatiques de MDA ont été mesurées par HPLC suivant la méthode décrite par Levy et coll (Levy, Brunet et al. 2007)].

#### *1.2.1.2 Glutathion*

Le couple GSH et GSSG est reconnu comme un indicateur important du statut redox cellulaire dans le plasma humain (Jones, Carlson et al. 2000). Le ratio GSH/GSSG est d'ailleurs considéré comme un bon marqueur d'évaluation du stress oxydant (Jones 2002). De plus, la mesure du potentiel réducteur du glutathion, calculé selon l'équation de Nernst, à partir des concentrations de ce couple de molécules permet d'estimer l'environnement redox de la cellule (Schafer and Buettner 2001). Les niveaux de glutathion oxydé et réduit ont été mesurés dans le sang total traité rapidement après prélèvement avec l'acide métaphosphorique à 5 % et centrifugé pendant 1 min à 5 000 g. La séparation se fait par électrophorèse capillaire de zone (P/ACE™ MDQ système d'électrophorèse capillaire de



Beckman Coulter) tel que décrit dans cet article de notre laboratoire (Cambonie, Comte et al. 2007).

### 1.2.2 Extraction des CPE au Ficoll et Compte des CPE par cytométrie en flux

Immédiatement après avoir prélevé 11 mL de sang dans des tubes vert hépariné au sein des patients constituant la cohorte, les cellules mononuclées du sang ont été récupérées par la technique d'extraction au Ficoll. Le sang a été dilué avec du PBS (volume à volume) (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Les cellules ont ensuite été récupérées après une centrifugation pendant 30 min à 400 g (2000 rpm) par gradient de densité (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare Life Sciences, Burlington, ON, Canada). Après la centrifugation quatre phases sont visibles. En partant du fond du tube on peut distinguer les globules rouges, le Ficoll (transparent), puis la couche mince de cellules mononuclées (brune), et enfin le plasma (jaune). Les cellules mononuclées sont ensuite récupérées à l'aide d'une pipette Pasteur et lavées dans du PBS. Les cellules sont ensuite congelées immédiatement dans du SVF (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) avec 10% diméthyl sulfoxyde (DMSO, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO)).

Pour le compte par cytométrie en flux (FACS Calibur Unit, Becton Dickinson, CA), l'ensemble des cellules a été décongelé le jour de l'expérience. Chaque échantillon correspondant à chaque patient a utilisé  $1 \times 10^6$  cellules et un minimum de 500 000 événements a été enregistré. Le phénotype des CPE a été caractérisé en utilisant trois anticorps monoclonaux incubés pendant 30 mn à 4°C. Les anticorps suivants ont été utilisés : anti-humain CD34 conjugué à la fluorescein-isothiocyanate (FITC) (eBioscience,

CA), anti-humain VEGF R2 conjugué à l'allophycocyanin (APC) (R&D Systems, CA), et anti-humain CD 133 conjugué à la R-phycoerythrin (PE) (Miltenyi Biotec, CA). Un marqueur de viabilité a également été utilisé pour chaque échantillon à l'aide du 7 Amino-Actinomycin7-AAD (BD Pharmingen, CA).

## **2. Résultats**

### **2.1 Modèle cellulaire**

#### 2.1.1 Effet de l'exposition à l'O<sub>2</sub> sur la prolifération des cellules A10

Immédiatement après l'exposition à l'O<sub>2</sub>, le compte cellulaire des cellules était identique dans le groupe H comparé au groupe contrôle (Figure 1A), mais la prolifération étudiée avec l'incorporation au BrdU était significativement diminuée. (Figure 1B). Après 96 heures de récupération dans les conditions contrôles, les cellules du groupe H présentaient une réduction de 14% (10-19%,  $p < 0.05$ ) en terme de compte cellulaire pour celles exposées 24h à l'O<sub>2</sub>, et une réduction de 19 % (13-29%,  $p < 0.05$ ) pour celles exposées 48h à l'O<sub>2</sub> (Figure 1A). Ces résultats indiquent donc une diminution du taux de prolifération dans le groupe de cellules ayant été exposé à l'O<sub>2</sub>, marqueur reconnu de sénescence cellulaire.

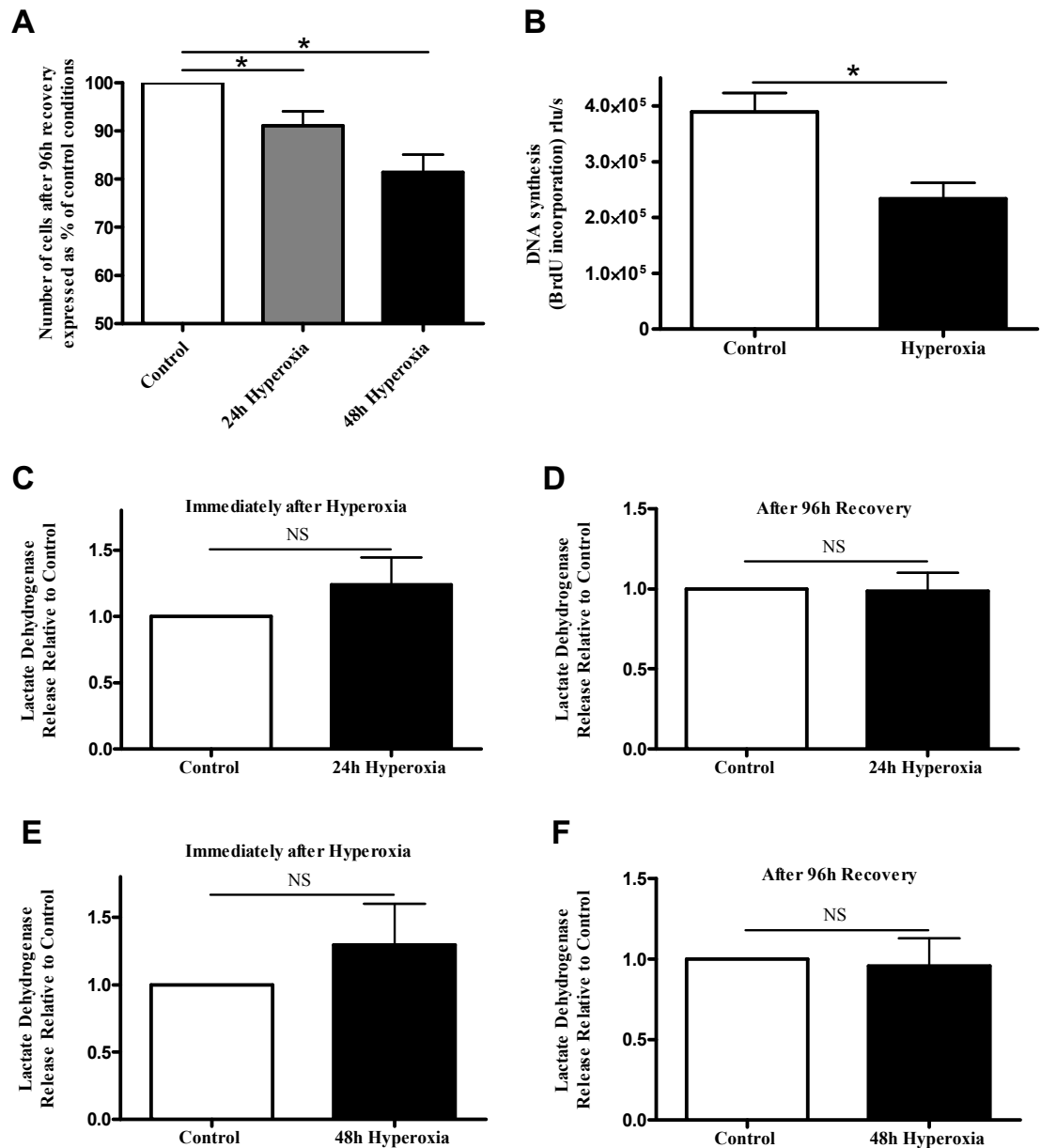
#### 2.1.2 Effet de l'exposition à l'O<sub>2</sub> sur les dommages à l'ADN cellules A10

Le marquage du 53BP1 se caractérise par une présentation ponctiforme au niveau de l'ADN. L'exposition à l'O<sub>2</sub> entraîne une augmentation du marquage au 53BP1 immédiatement après l'exposition (Figure 2A). Ces marquages sont encore présents alors que les cellules ont été remises en conditions contrôles (Figure 2B), suggérant des dommages persistants à l'ADN.

### 2.1.3 Effet de l'exposition à l'O<sub>2</sub> sur la libération de LDH : évaluation de la cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité se sont révélés négatifs immédiatement après l'exposition à l'O<sub>2</sub>, ainsi qu'après la période de récupération en conditions contrôles (Figure 1 C,D, E ,F). Ces résultats suggèrent donc que la diminution du taux de prolifération ainsi que la diminution du compte cellulaire ne sont pas attribuables à de la mort cellulaire, mais bien à un arrêt de la croissance cellulaire.

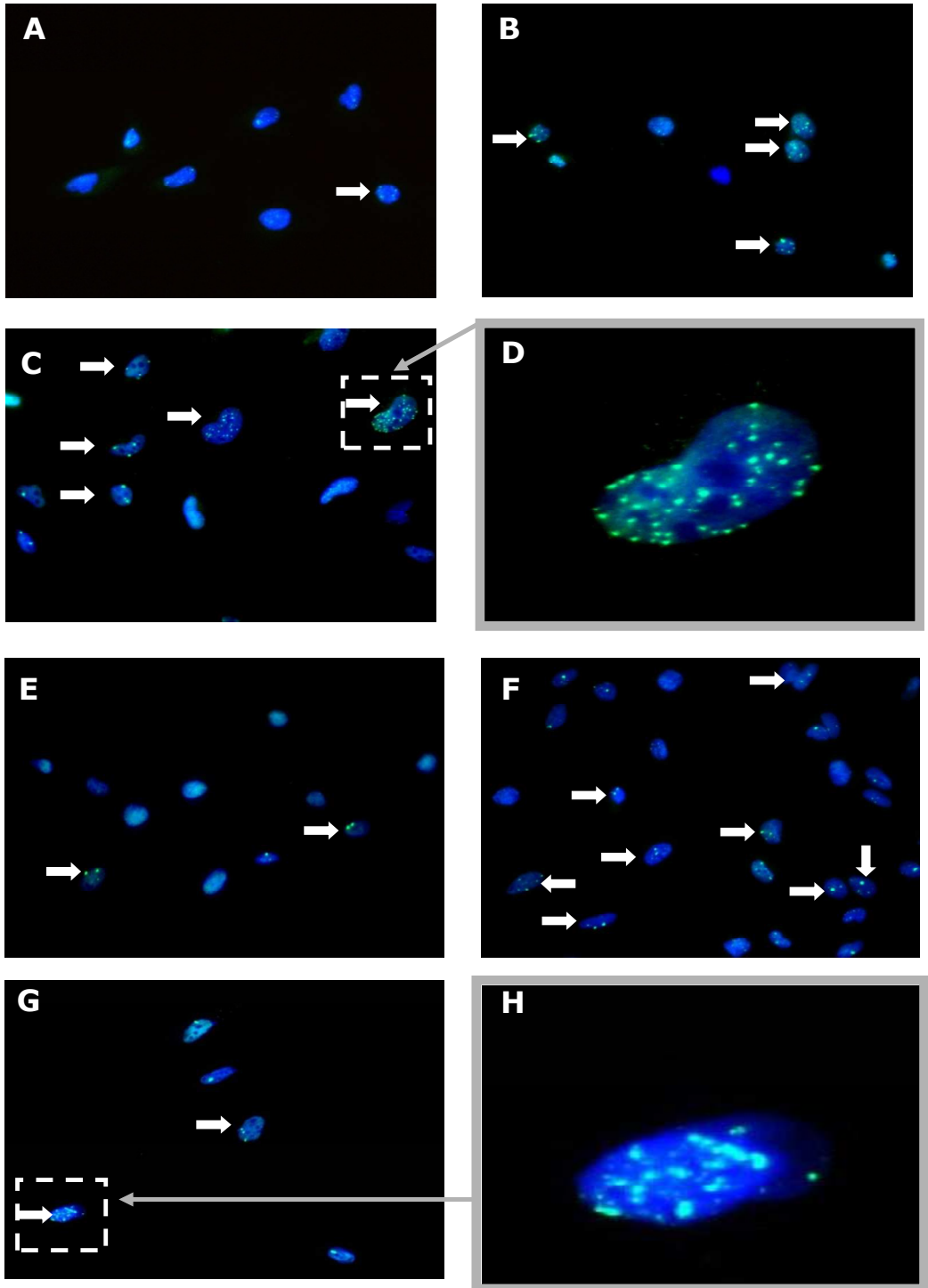
**Figure 1:**



**Figure 1:** Hyperoxia decreases proliferation rate in A10 cells without cell toxicity. **A:** Automatically counting cell number in cells exposed for 24 or 48hrs to hyperoxia (40% O<sub>2</sub>) expressed as percentage of control conditions. Data are mean ± SEM of n=6 for 24hrs and n=4 for 48hrs different O<sub>2</sub> exposure. \*: p<0.05 hyperoxia vs. control using paired t-test. **B:** Measurement of cell proliferation in cells exposed for 24hrs to hyperoxia or control conditions. Data are mean ± SEM of n=4 different O<sub>2</sub> exposure. \*: p<0.05 hyperoxia vs. control using unpaired t-test. **C, E:** Measurement of Lactate Dehydrogenase release (marker

of cell toxicity) in cells immediately after 24 (C) or 48hrs of hyperoxia (E) vs. control conditions, and after 96hrs recovery ((D): for cells exposed to 24h hyperoxia; (F) for cells exposed to 48hrs hyperoxia) expressed as ratio of control conditions. Data are mean  $\pm$  SEM of n=4 different O<sub>2</sub> exposure. NS: No significant difference between hyperoxia vs. control using unpaired t-test.

Figure 2:



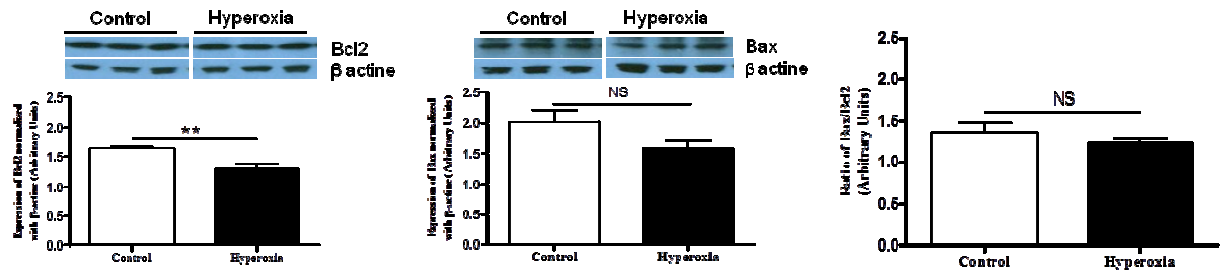
**Figure 2:** Hyperoxia promotes persistent 53BP1 staining. **Immediately after O<sub>2</sub> exposure:** Hyperoxia exposure lead to more DNA damage as evidenced by an increased number of 53BP1 nuclear foci (arrows) in A10 cells exposed to hyperoxia (40% O<sub>2</sub>) for 24h (**B**) or 48h (**C**) compared to cells which remained in control conditions (**A**) (X40 magnification). **D** Higher magnification of box in **C** showing an increased number of 53BP1 nuclear foci. **After 96hrs recovery in control conditions:** Representative microphotographs of DNA damage represented by 53BP1 positive nuclear foci (arrows) in A10 cells, allowed to recover 96h in control conditions after exposure to hyperoxia for 24h (**F**) or 48h (**G**) compared to cells which had remained in control conditions (**E**) (X40 magnification). **H** Higher magnification of box in **G** showing persistent increased 53BP1 nuclear foci, suggesting persistent DNA damage. Nuclear localisation was confirmed using 4,6-diaminido-2 phenylindole (DAPI, blue).



## 2.2 Modèle animal

### 2.2.1 Evaluation de l'expression de Bax et Bcl2 à 4W par Western Blot

Le protocole de Western Blot utilisé est identique à celui présenté dans l'Article 1 figure 1C et D. L'exposition à l'O<sub>2</sub> n'a pas d'effet sur l'expression des protéines Bax et Bcl2 à 4W. Nous pouvons donc conclure qu'il ne semble pas y avoir d'effet apoptotique de l'O<sub>2</sub> sur les cellules vasculaires.



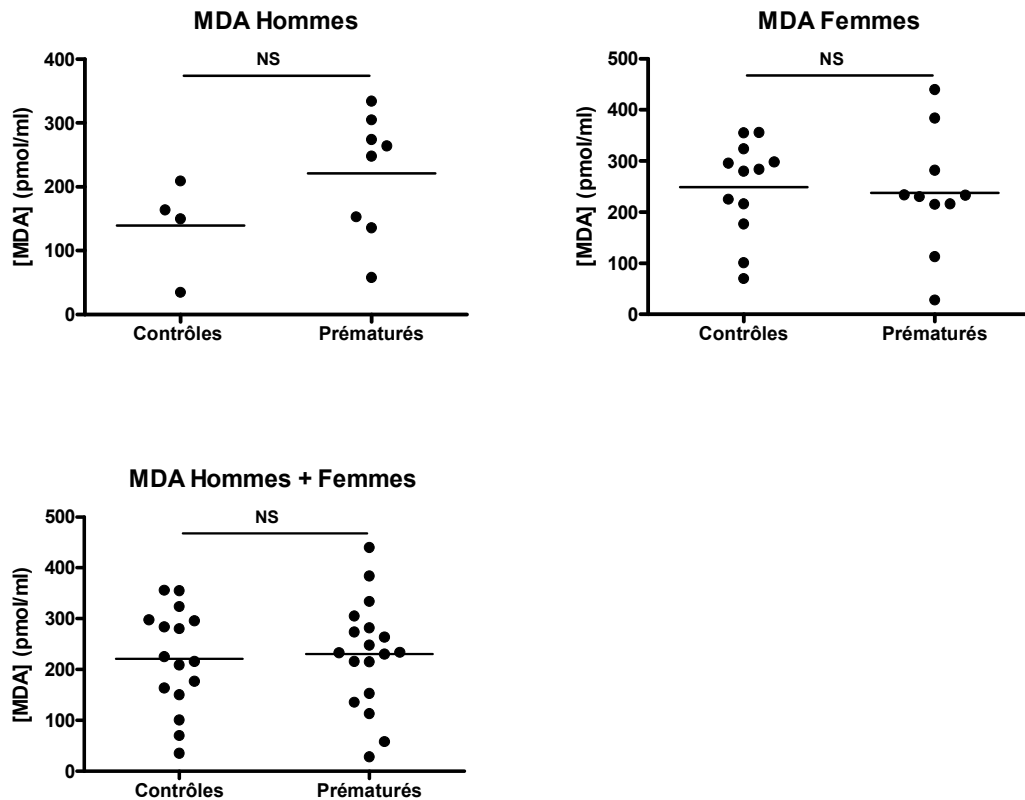
**Figure 3** : Expression de Bcl 2 et de Bax rapportée à la  $\beta$ -actine dans des extraits totaux de protéines aortiques de rats à 4W (n =6) ayant été exposés à l'oxygène en période néonatale (Hyperoxia) et contrôle déterminée par Western Blot et quantifié avec le logiciel Gel Pro Analyser 3.1. NS=non significatif, \*\*,  $p < 0,01$  hyperoxie vs contrôles en utilisant un test t de Student.

## 2.3 Cohorte

### 2.3.1 MDA

Les concentrations plasmatiques de MDA ont été mesurées au sein de notre cohorte (Figure 4). Le fait d'être une jeune adulte né prématuré ne semble pas être associé avec une augmentation de la peroxydation lipidiques ( $p=0,79$ ). Par contre, si l'on sépare les hommes des femmes on observe une tendance à l'augmentation des concentrations plasmatique en MDA ( $p=0,17$ ) chez les hommes non présente chez les femmes ( $p=0,8$ ).

Ces résultats sont préliminaires et sont donc à prendre avec précautions du fait du faible nombre de sujets masculins, un plus grand nombre de sujets est nécessaires afin de conclure dans cette population.



**Figure 4** : Concentrations plasmatiques de malondialdéhyde (MDA) chez de jeunes adultes nés prématurés (n=18) comparés à des jeunes adultes nés à terme (n=16). NS=non significatif, prématurés vs contrôles en utilisant un test t de Student.

### 2.3.2 Glutathion

Les concentrations érythrocytaires de glutathion oxydé et réduit ont été mesurées.

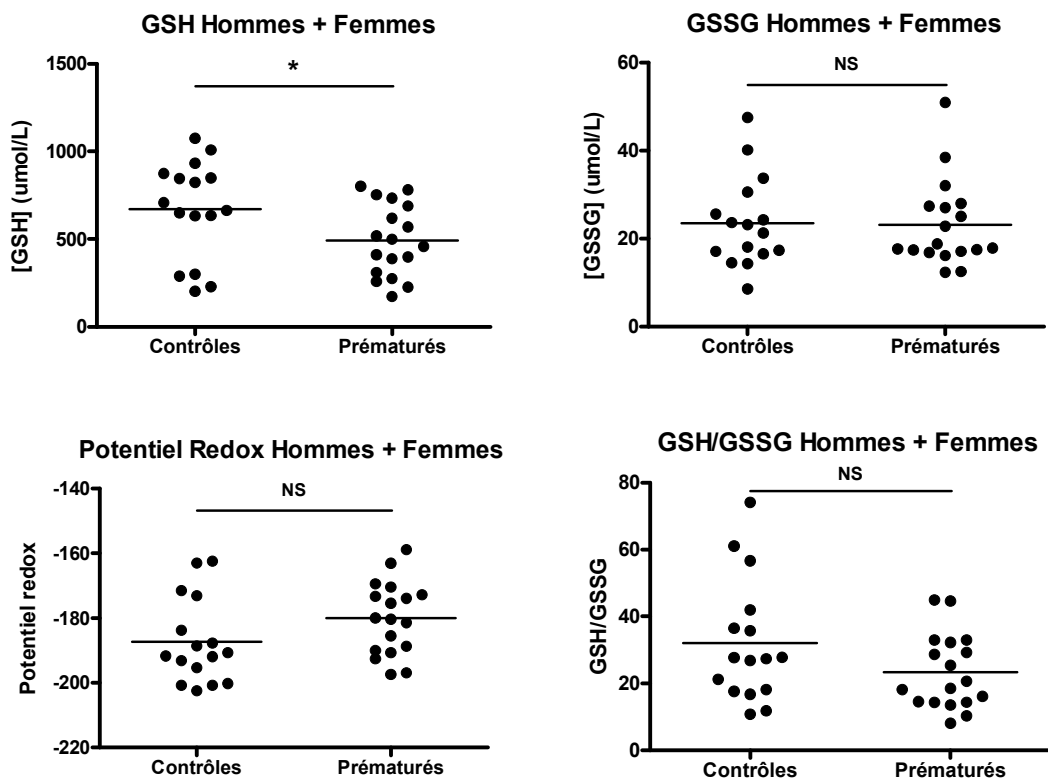
La Figure 5 montre que dans le groupe des prématurés en comparaison avec les contrôles :

- la concentration de GSH est significativement diminuée (p=0,04),
- la concentration de GSSG est inchangée (p=0,9),

- le calcul du potentiel redox [672] a révélé un environnement plus oxydé en présentant une tendance à l'augmentation ( $p=0,09$ ), et

- le ratio GSH/GSSG présente une tendance à la diminution ( $p=0,1$ ).

Ces résultats sont préliminaires et un plus grand nombre de sujets est nécessaires afin de conclure au statut oxydé ou non dans cette population.



**Figure 5 :** Evaluation du statut oxydant dans les érythrocytes de jeunes adultes nés prématurés (n=18) comparés à des jeunes adultes nés à terme (n=16). NS=non significatif, \*  $p < 0,05$  prématurés vs contrôles en utilisant un test t de Student.



## **CHAPITRE 5 : DISCUSSION**

Dans ce travail de doctorat, il a été montré que les effets d'une hyperoxie en période néonatale pouvaient modifier, d'une part, le devenir des cellules de la paroi vasculaire par des phénomènes de sénescence prématurée et de remodelage de la paroi vasculaire et, d'autre part, l'impédance aortique, marqueur de rigidité aortique, caractéristique reconnue de vieillissement vasculaire.

## **1. Le mécanisme du stress oxydant dans le développement de l'HTA**

### **1.1 Le rôle d'une exposition prématurée à l'oxygène en période néonatale**

Afin de recréer la situation de prématurité dans un modèle expérimental, nous avons étudié les effets d'une exposition à l'O<sub>2</sub> de rats en période néonatale. Dans un modèle établi et validé pour reproduire un stress hyperoxique chez le rat (Lachapelle, Dembinska et al. 1999, Dorfman, Dembinska et al. 2008), différents critères de sénescence ont été utilisés pour étudier le vieillissement vasculaire. Le modèle animal que nous avons choisi d'utiliser a été classiquement utilisé pour les études à court terme des complications de la prématurité (comme la ROP et la DBP) suite à une exposition à l'O<sub>2</sub>. Cependant, comme tout modèle animal, il ne peut prétendre reproduire exactement le stress subit par les nouveau-nés, notamment les prématurés. Le point le plus discuté est le fait que les rats ne sont pas nés prématurés dans le modèle utilisé. Or, cette situation a déjà été envisagée mais les mères rejettent leurs nouveau-nés si un accouchement sous césarienne est réalisé. Autre point important, et justifiant la validité de ce modèle pour l'hypothèse posée, les rongeurs présentent après la naissance à terme un développement actif des principaux organes vitaux et notamment une immaturité des structures vasculaires (Zicha and Kunes

1999). Un raton nouveau-né peut donc être assimilé à un prématuré en termes de maturité de son système vasculaire.

Un environnement hyperoxique se définit comme un environnement dans lequel la  $pO_2$  est au dessus de la normoxie observée dans l'organe étudié. Une exposition à un environnement hyperoxique conduira donc à des effets toxiques dont le degré de sévérité dépendra de la concentration en  $O_2$  utilisée, ainsi que de la durée d'exposition. Ainsi la situation dite « hyperoxique » sera dépendante du type cellulaire ou de l'organe étudié. Par exemple, si des cultures cellulaires issues de tissus de mammifères sont exposées à 20 % d' $O_2$ , leur environnement est hyperoxique en comparaison à leur environnement physiologique (Roy, Khanna et al. 2003). Il n'y a donc pas de définition unique d'un environnement hyperoxique.

À l'âge adulte, les animaux (ainsi que les humains) sont davantage sensibles à une exposition à 85-100 % d' $O_2$  que les rats (Frank, Bucher et al. 1978). Il a été montré que la majorité des animaux adultes meurt dans les 72 h suite à une exposition à l' $O_2$  (Frank, Bucher et al. 1978), vraisemblablement secondairement à des dommages inflammatoires pulmonaires. En revanche, des études expérimentales ont montré que les nouveau-nés étaient très résistants à une hyperoxie en termes de survie. En effet, Bonikos *et al* (Bonikos, Bensch et al. 1976) ont montré que 75 % des souriceaux nouveau-nés pouvaient survivre à 100 % d' $O_2$  pendant une durée d'une semaine, alors que des souris adultes meurent entre le 3<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour d'exposition.

Cependant, même si les nouveau-nés ont une meilleure protection vis-à-vis d'une exposition à de fortes concentrations d' $O_2$ , le principe 6 de Nijland stipule que : « *Les tentatives post-natales pour corriger les effets de la programmation peuvent avoir leurs*

*propres conséquences non-désirées. Quand les conditions post-natales ne sont pas celles pour lesquelles le fœtus est préparé, des problèmes peuvent apparaître.* » Autrement dit, il pourra se produire des effets délétères sur le développement des organes et leur fonctionnement.

## **1.2 Les conséquences d'une déficience en enzyme antioxydante chez le prématuré**

Nous savons que les enfants nés prématurément sont plus sujets aux stress oxydants d'une part du à l'immaturité de leurs défenses antioxydantes (Thibeault 2000), et d'autre part du à l'exposition à des situations oxydantes, telles l'exposition à l'air ambiant ou à un supplément d'O<sub>2</sub> (Saugstad 2005). En effet, à la naissance la p<sub>a</sub>O<sub>2</sub> sanguine augmente brusquement du à l'exposition à l'air ambiant contenant 21 % d'O<sub>2</sub>. La PaO<sub>2</sub> normale d'un nouveau-né après la naissance se situe autour de 90 mmHg, alors qu'elle est de 30 mmHg chez le fœtus. Cette augmentation rapide de PaO<sub>2</sub> génère alors une quantité importante d'ERO. Pour le nouveau-né, l'augmentation brutale de la PaO<sub>2</sub> à la naissance représentera alors la source la plus importante d'ERO et donc de stress oxydant, et davantage en situation de prématurité où l'organisme est encore immature. L'O<sub>2</sub> est la thérapie la plus fréquemment utilisée chez les enfants prématurés. La supplémentation en O<sub>2</sub> permet de maintenir une PaO<sub>2</sub> adéquate. La toxicité cellulaire induite par l'O<sub>2</sub> est le résultat de la formation de radicaux libres qui sont très réactifs. Parmi eux, O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, espèce très réactive, semble être le principal agent responsable de la toxicité cellulaire induite par l'O<sub>2</sub> (Saltzman and Fridovich 1973, Feeney and Berman 1976). La capacité de défense contre des lésions liées aux ERO dépend de la capacité des défenses antioxydantes. Chez les animaux qui ont une sensibilité vis-à-vis d'une exposition à l'O<sub>2</sub>, il a été suggéré une



incapacité à augmenter l'activité des défenses antioxydantes pulmonaires en réponse à cette exposition. Une étude menée chez le lapin prématuré (29<sup>ème</sup> / 32<sup>ème</sup> jours de gestation) a montré qu'il n'y avait pas d'augmentation des défenses antioxydantes (CAT, SOD, GPx), le rendant ainsi plus sujet à développer des lésions pulmonaires (Frank and Sosenko 1991). Les rats nouveau-nés sont moins sensibles vis-à-vis de l'O<sub>2</sub> que les adultes, et il a été montré que cette résistance vis-à-vis de l'exposition à l'O<sub>2</sub> s'exerce de la naissance jusqu'à un mois de vie, pouvant sûrement s'expliquer par une augmentation au niveau pulmonaire de l'activité des défenses antioxydantes, phénomène qui ne se produit pas chez des animaux adultes (Yam, Frank et al. 1978). La SOD semble être le principal mécanisme de défense vis-à-vis de l'O<sub>2</sub>, puisque dès 24 h d'exposition l'activité de la SOD au niveau pulmonaire est maximale dans le poumon de rats nouveau-nés.

## **2. Le mécanisme de sénescence vasculaire précoce impliqué dans la programmation développementale de l'HTA**

La distinction physiologique de la sénescence répliquative et de la sénescence induite par le stress peut paraître ambiguë, en revanche les conséquences seront identiques à savoir que toutes les cellules sénescents présenteront des altérations de leur métabolisme et de leur niveau d'expressions géniques et protéiques (Campisi 2000, Sitte, Merker et al. 2000, Narita, Núñez et al. 2003). La sénescence, qu'elle soit de cause physiologique ou pathologique, altère les fonctions normales des cellules affectées. Il a par exemple été montré que des fibroblastes sénescents sécrètent moins de fibres de collagène et plus de MMPs de la matrice, favorisant ainsi un remodelage vasculaire (Campisi 1998, Ben-Porath and Weinberg 2005). Ainsi, compte tenu des altérations fonctionnelles des cellules sénescents présentées, il est logique de proposer que la sénescence peut être à la cause des complications physiopathologiques observées dans notre modèle.

La première partie de ce travail a consisté à évaluer à la fois *in vivo* et *in vitro* des mécanismes de sénescence intervenant dans la structure vasculaire. Nous avons montré que les troubles vasculaires présents chez le rat adulte hypertendu (hypertension, dysfonction endothéliale et rigidité aortique) étaient précédés chez le jeune rat par un vieillissement accéléré des vaisseaux.

### **2.1 Le défaut de prolifération des cellules vasculaires**

Parmi les complications liées à la prématurité, la DBP et la ROP sont les principales pathologies dont l'exposition à l'O<sub>2</sub> est un facteur étiologique déterminant. Ces deux

pathologies sont caractérisées par un développement vasculaire anormal, résultant en une diminution des alvéoles au niveau pulmonaire et en une ischémie rétinienne au niveau de l'œil. Cette ischémie entraîne ensuite une réponse angiogénique menant à une prolifération vasculaire exagérée et non organisée qui, dans les cas les plus sévères, pourront conduire à une cécité (Chen and Smith 2007). En revanche, les conséquences vasculaires systémiques (à court et long terme) d'une exposition à l'hyperoxie en période néonatale ne sont que très peu étudiées. Nous avons donc essayé de caractériser ce point.

Nous avons également montré dans le modèle cellulaire une diminution du compte cellulaire suite à l'exposition à l'O<sub>2</sub>. Ces résultats ont été confirmés par un test de prolifération (incorporation au BrdU) et montrent une diminution de la prolifération dès la fin de l'exposition.

Cependant, l'application des études de vieillissement cellulaire *in vitro* aux processus physiopathologiques *in vivo* doit être faite avec vigilance. En effet, les conditions *in vitro* engendrent des divisions cellulaires lors des passages inhérents aux cultures cellulaires et le potentiel répliatif des cellules a pu être impliqué en provoquant leur division artificielle, et donc leur entrée en sénescence. Bien que nous ayons pris soin de cultiver les cellules dans un intervalle de passages faible, les cellules effectuent donc plus de divisions cellulaires *in vitro* qu'*in vivo*. De plus, la culture cellulaire utilise des concentrations d'O<sub>2</sub> de l'air ambiant ( $\pm 20\%$ ), concentrations plus élevées qu'*in vivo* (2-5%) (Campisi 2001). En conséquence, les cellules en culture sont exposées à un stress oxydant indépendant du contexte *in vivo*, pouvant ainsi interférer avec la problématique même de notre recherche. Nous avons cependant essayé de cultiver les cellules à 12%O<sub>2</sub>, ayant ainsi trois groupes :

- un exposé à l'hyperoxie 40%O<sub>2</sub>,
- un air ambiant 20%O<sub>2</sub>,
- un normoxie à 12%O<sub>2</sub>.

Les résultats ont été surprenants et ont mené à un profil identique dans le groupe exposé à l'hyperoxie 40%O<sub>2</sub> et dans le groupe normoxie à 12%O<sub>2</sub>. Etant d'origine commerciale les cellules avec lesquelles nous avons travaillé ont été cultivées depuis leur extraction à l'air ambiant. Elles se sont vraisemblablement adaptées à ces conditions non physiologiques, engendrant ainsi un phénotype particulier. Le fait de les avoir réexposées à nouveau à 12%O<sub>2</sub> a été considéré comme un stress.

Bien que les études de vieillissement *in vitro* ne soient pas parfaites, elles constituent cependant des outils précieux pour comprendre les mécanismes impliqués dans le vieillissement *in vivo*. Le groupe de Mitsui *et al.* a suggéré que les études *in vitro* s'avèrent de bons modèles pour étudier le comportement de la sénescence (précocité, marqueurs, potentiel répliatif), surtout avec l'utilisation de cellules à passage initial, le plus représentatif de ce qui a pu se dérouler *in vivo* (Schneider and Mitsui 1976). C'est pourquoi après avoir démontré des caractéristiques de vieillissement dans les CML d'aortes thoraciques de rat embryonnaires ; nous sommes passés à l'étude de ces phénomènes dans notre modèle animal.

Tout d'abord nous avons choisi d'étudier la prolifération des CMLs au niveau aortique à l'âge de P10, immédiatement après la fin de l'exposition à l'O<sub>2</sub>. En effet ces expériences ont été effectuées à P10, âge où les rats n'ont pas encore fini leur développement et où l'aorte présente une prolifération active des cellules composant la média (Berry, Looker et al. 1972, Looker and Berry 1972). De plus, à un âge plus avancé

les CMLs matures présentent un taux de prolifération extrêmement faible, il serait alors difficile et peu pertinent de mettre en évidence un éventuel défaut de prolifération (Owens 1995).

Nous avons ainsi observé *in vivo* une diminution de l'incorporation du BrdU au niveau de la paroi artérielle (Article 1, figure 1) de rats ayant été exposés à l'O<sub>2</sub> en période néonatale. Cette altération de prolifération au niveau des cellules vasculaires apparaît pendant la période cruciale du développement vasculaire, souvent retrouvée dans la littérature sous le terme de « fenêtre critique » du développement (Plagemann, Harder et al. 2012). Une telle altération pourra donc avoir des conséquences à long terme sur la structure vasculaire car la réponse de l'organisme au stress conduirait à mettre en place des caractéristiques adaptatives visant à préserver son intégrité à court terme, mais inadaptées à long terme (Gluckman and Hanson 2006). Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec la notion du principe 4 énoncé par Nijland (Nijland, Ford et al. 2008) (Tableau 1) indiquant qu'une perturbation pendant le développement fœtal ou néonatal: « *peut faire intervenir des changements structuraux dans des organes importants : le nombre absolu de cellules dans un organe peut être modifié, le rapport entre les différents types de cellules et leur distribution dans un organe peut être déséquilibré, la vascularisation normale de l'organe peut être compromise* ».

Nous avons en revanche montré à l'âge de 4W que l'exposition à l'O<sub>2</sub> en période néonatale ne modifiait pas le nombre de CML ainsi que la surface de l'aorte (Article 2, figure 2). Ces résultats indiquent respectivement qu'il n'y a pas d'hyperplasie, ni d'hypertrophie aortique à 4W. Toujours en se référant aux énoncés de Nijland, ces données peuvent être interprétées par le principe 5 précisant : « *Dans un environnement défavorable,*

*le bébé en développement tente de compenser les déficiences qu'il subit. Cette compensation peut avoir des conséquences. »*

Si l'on met les résultats de l'article 1 et de l'article 2 en perspective, nous pouvons prétendre qu'au niveau vasculaire à P10, âge où le développement est actif, la prolifération cellulaire est altérée ; puis au cours du temps à 4W, le nombre cellulaire semble se rétablir. Ce comportement peut évoquer la notion de « catch up » ou rattrapage de croissance en français. L'organisme subit un rattrapage de croissance accéléré pouvant avoir des effets délétères (Hales and Ozanne 2003). Il a en effet été montré, dans d'autres modèles de programmation développementale tels que la programmation d'un faible poids à la naissance par un régime appauvri en protéine pendant la gestation, la présence de ce rattrapage de croissance (Ozanne 2009). Ce rattrapage de croissance étant connu comme un facteur de risque entraînant la survenue de maladies cardiovasculaires ainsi qu'une mort précoce (Ozanne and Nicholas Hales 2005) (Ozanne and Hales 2004) .

De plus il a été montré dans notre modèle que l'exposition au stress hyperoxique est associée à une diminution significative du poids par rapport au groupe contrôle entre la 7<sup>ème</sup> et la 15<sup>ème</sup> semaine d'âge. A 25 semaines d'âge, aucune différence de poids entre les groupes n'est observée, un phénomène de rattrapage (catch up) a donc eu lieu (Yzydorczyk C, données non publiées).

Les effets délétères de ce rattrapage de croissance au sein de notre modèle pourraient se retrouver notamment au niveau vasculaire par le remodelage vasculaire que nous observons dans le groupe H à 4W (Article 2, figures 3,4,5,6).

## **2.2 La présence de dommages à l'ADN au sein des cellules vasculaires sans augmentation des phénomènes d'apoptose**

Les dommages à l'ADN sont connus pour être impliqués dans le développement des phénomènes de vieillissement (Lombard, Chua et al. 2005, Garinis, van der Horst et al. 2008). Plusieurs études ont ainsi montré l'accumulation de dommage à l'ADN dans des tissus âgés (Sedelnikova, Horikawa et al. 2004, Schumacher, Garinis et al. 2008).

Nous avons montré la présence de bris à l'ADN (par le test des comètes, Article 1, figure 4B) au niveau aortique, chez le raton immédiatement après l'exposition à l'O<sub>2</sub>, ainsi que d'éléments caractéristiques de réparations à l'ADN (immunofluorescence du 53BP1, Article 1 figure 4A) chez le raton immédiatement après l'exposition à l'O<sub>2</sub>. Ces résultats sont d'autant plus intéressants qu'ils sont persistants à 4W et à 16W. L'âge de 4W est en effet un âge important car les animaux ne sont plus exposés à l'O<sub>2</sub>, mais ne sont pas encore hypertendus. Une étude à cet âge permet donc d'étudier les causes des troubles retrouvés à l'âge adulte.

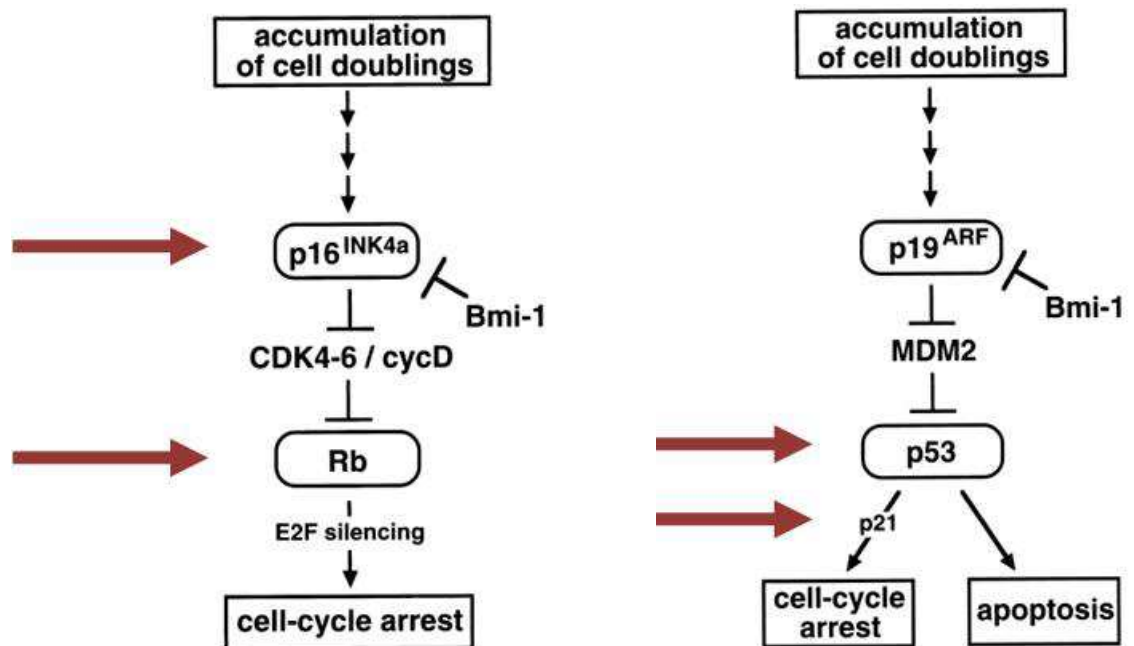
Parallèlement à ces résultats nous avons montré que l'expression des protéines Bax (protéine pro-apoptotique) et Bcl2 (protéine anti-apoptotique) n'était pas modifiée dans le modèle animal à P10 suite à l'exposition à l'O<sub>2</sub> (Article 1, figure 1C et D). Ces résultats ont été également confirmés à 4W (résultats additionnels). Etant donné que l'apoptose intervient également en réponse à un stress (paragraphe 2.1.4 de l'introduction), il était légitime de tester l'implication de celle-ci dans notre modèle au niveau vasculaire. Il a de plus été montré que si la cellule continue de subir des dommages délétères par différents types de stress, la protéine p53 possède la capacité de déclencher une mort cellulaire programmée par apoptose indépendante des CKIs (Chen, Liu et al. 2000). Les résultats de

défaut de prolifération observés et de dommages à l'ADN pouvant également intervenir lorsque les cellules rentrent en apoptose. En montrant ainsi une résistance à l'apoptose, ces données permettent d'attribuer que dans notre modèle l'exposition à l'O<sub>2</sub> évoque davantage des phénomènes de sénescence précoce.

### 2.3 L'augmentation des protéines de sénescence au sein de la paroi vasculaire

Nous avons vu que la sénescence est un processus complexe pouvant être déclenché par différents stimuli et que plusieurs voies de signalisation peuvent mener à l'arrêt de la division cellulaire. Ces différentes voies peuvent varier suivant l'espèce animale ou le type cellulaire étudiés, cependant deux voies de signalisation semblent se détacher à savoir celles de p53 et de pRb (Figure 20) (Bringold and Serrano 2000).

**Figure 21 : Programme effecteur de la sénescence comprenant les voies p53/p21 et p16/pRb, d'après Bringold**





Ces deux molécules semblent nécessaires à l'initiation et au maintien de la sénescence, il a en effet été montré que l'inactivation de ces gènes permet aux cellules de retourner dans un état actif de prolifération (Dannenberg, van Rossum et al. 2000, Dirac and Bernards 2003, Sage, Miller et al. 2003).

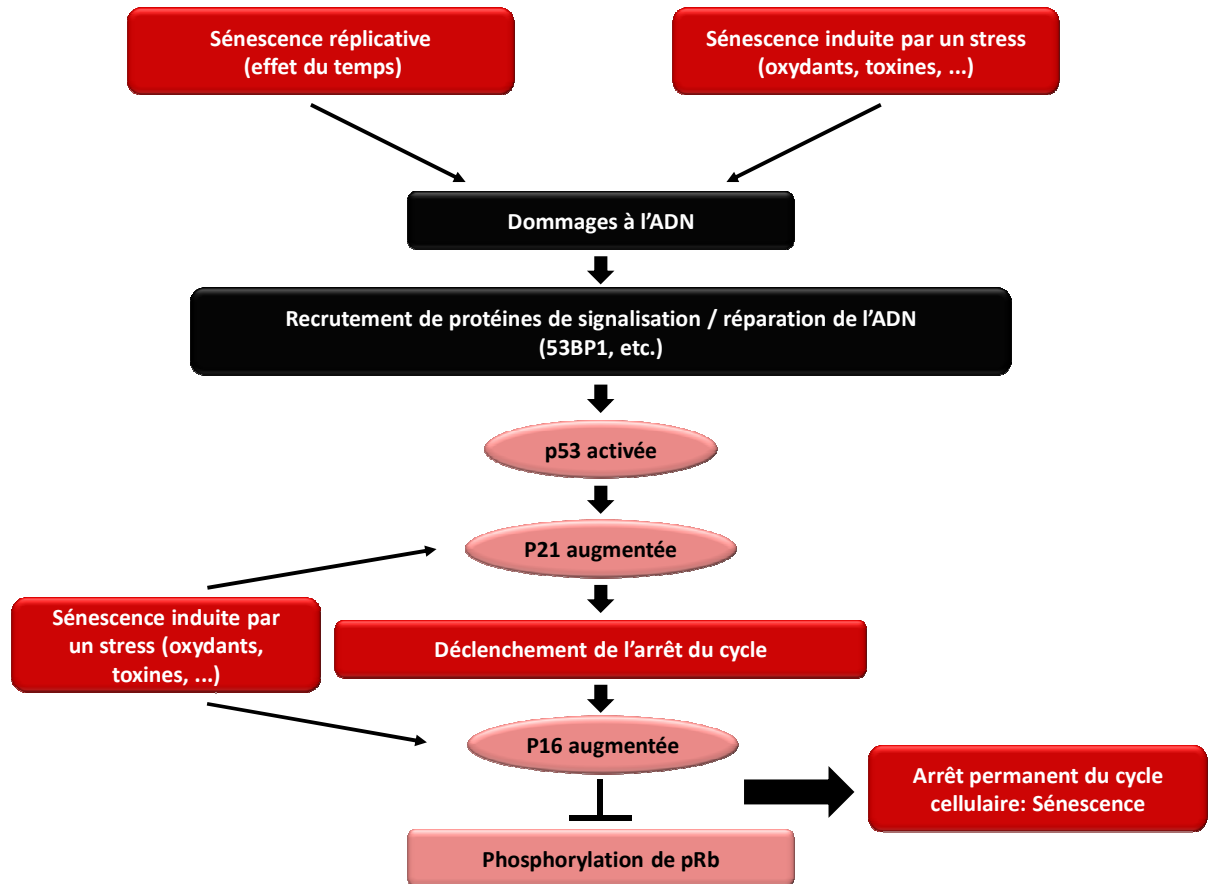
Tel que présenté dans le paragraphe 2.2 de la discussion, la présence de dommages à l'ADN conduisant à l'arrêt de croissance cellulaire, nous avons choisi d'étudier la présence de protéines de sénescence au sein de la structure vasculaire. L'entrée en sénescence s'accompagne d'une augmentation de la fonction de p53 et de l'accumulation de p21, un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines, gène cible de p53. Nous avons tout d'abord montré par immunofluorescence une augmentation de p53, p16 et p21 au sein de la paroi aortique d'animaux ayant été exposés à l'O<sub>2</sub> en période néonatale. Ces résultats ont été retrouvés à l'âge de P10, traduisant un effet immédiat de l'exposition à l'O<sub>2</sub>. Nous avons également montré une augmentation de ces marqueurs à l'âge de 16W également par immunofluorescence. Nous avons confirmé par des Western Blots l'augmentation de ces marqueurs de sénescence pour certaines protéines. La figure 21 reprend l'ensemble des notions que nous avons démontrées au niveau moléculaire en termes de sénescence cellulaire dans notre modèle.

Ces résultats sont en accord avec d'autres modèles engendrant des complications cardiovasculaires faisant intervenir du vieillissement vasculaire. Burring a été un des premiers à observer *in vivo* la présence de cellules endothéliales ayant une morphologie aplatie et augmentée en surface (>800µm<sup>2</sup>) recouvrant les plaques d'athérosclérose, suggérant la présence de cellules sénescents dans des régions où le flux sanguin présente un écoulement turbulent (Burring 1991). À l'aide d'un marquage *ex vivo* de SA gal,

Minamino *et al* ont observé la présence de cellules endothéliales et de CMLV positives au niveau de plaques athérosclérotiques tapissant les artères coronaires (Minamino and Komuro 2002). Ces travaux confirment donc l'existence de la sénescence cellulaire *in vivo* au niveau vasculaire et confèrent ainsi un rôle à la sénescence dans le développement de complications physiopathologiques d'ordre vasculaire (Minamino and Komuro 2002, Minamino, Miyauchi et al. 2002).

Mais également plus proche de notre modèle de programmation développementale, les protéines p16 et p21 ont été retrouvées significativement augmentées au niveau du cœur et du rein dans la descendance de rates gestantes recevant une diète faible en protéines, et donnant naissance à des ratons présentant un faible poids à la naissance (Luyckx, Compston et al. 2009).

**Figure 22 : Synthèse mécanistique d'un point de vue moléculaire de l'arrêt du cycle cellulaire aboutissant à la sénescence. Implications de divers stimuli pouvant activer un programme commun de sénescence.**



### **3. Les conséquences fonctionnelles au niveau vasculaire de la prématurité et leurs rôles dans la programmation développementale de l'HTA à l'âge adulte observée lors d'une exposition à l'oxygène en période néonatale**

A plusieurs reprises dans la littérature, des mécanismes vasculaires ont été évoqués pour expliquer la relation entre la prématurité ou un faible poids de naissance et l'augmentation de la pression artérielle à long terme. On retrouve notamment la raréfaction du système microvasculaire (Hellström, Hård et al. 1998, Bonamy, Bendito et al. 2005, Pladys, Sennlaub et al. 2005), ou la dysfonction endothéliale ainsi que la rigidité artérielle (Martin, Hu et al. 2000, Leeson, Kattenhorn et al. 2001).

Dans les travaux composant cette thèse, nous avons montré l'implication des phénomènes de sénescence. Afin de mieux caractériser les conséquences fonctionnelles de telles perturbations, nous avons donc étudié le défaut d'angiogénèse et la raréfaction microvasculaire. Nous avons également étudié le remodelage vasculaire qui est une caractéristique reconnue de vieillissement vasculaire ainsi que la rigidité artérielle pouvant lui être associée.

#### **3.1 Le défaut d'angiogénèse et la raréfaction microvasculaire associée**

Nous avons pour la première fois montré dans le modèle animal une diminution des capacités angiogéniques au niveau aortique dans le groupe H à l'âge de P10. De plus, nous avons également observé de manière concomitante (à P10) la présence d'une raréfaction microvasculaire au niveau du muscle tibial (muscle strié), qui est un site majeur de

résistance vasculaire périphérique dans le groupe H (Article 1, figure 2). Ces résultats suggèrent donc que la raréfaction microvasculaire ainsi que la diminution de la capacité angiogénique précèdent l'élévation de la pression sanguine associée avec une hyperoxie néonatale, puisqu'elles apparaissent dès la fin de l'exposition à l'O<sub>2</sub>.

Il est bien connu que la raréfaction microvasculaire ou la réduction des capillaires et artérioles est associée avec l'hypertension (Boudier 1999, Ligi, Grandvullemin et al. 2010), en ayant pour conséquence une augmentation des résistances vasculaires périphériques (Norman 2008). Ceci provoque une diminution de la perfusion des organes cibles, favorisant l'apparition de maladies cardiovasculaires et rénales. Une corrélation négative entre la densité capillaire au niveau cutané et le risque d'apparition de maladies cardiovasculaires a d'ailleurs été démontrée (Debbabi, Uzan et al. 2006).

Cependant, la raréfaction vasculaire est généralement considérée comme une conséquence plutôt qu'une cause de l'hypertension (le Noble, Stassen et al. 1998). Ici, nous pouvons ainsi postuler que l'élévation de la pression sanguine observée dans notre modèle pourrait résulter d'un mécanisme d'adaptation permettant le recrutement de capillaires aboutissant ainsi à une perfusion adéquate des tissus périphériques (Greene, Tonellato et al. 1992).

Des observations similaires à notre modèle ont été rapportées chez le rat spontanément hypertendu juvénile (le Noble, Tangelder et al. 1990) et chez le jeune adulte présentant un risque élevé de développer une hypertension (Noon, Walker et al. 1997). Notre laboratoire avait également montré chez le rat dans un modèle de programmation développementale appauvri en protéine pendant la gestation la présence d'une raréfaction

microvasculaire dans la descendance chez le rat nouveau-né à 7 jours de vie (Pladys, Sennlaub et al. 2005).

Enfin, ces résultats confortent les nombreuses études menées chez l'homme qui démontrent que des enfants nés prématurés présentent, à l'âge adulte, une réduction de la vascularisation rétinienne (Chapman, Mohamudally et al. 1997) et ce alors qu'ils n'avaient pas présenté de ROP en période néonatale. Une autre étude a aussi montré une relation linéaire entre un petit poids de naissance et le rétrécissement des artéioles rétiniennes en association avec une pression sanguine plus élevée à l'âge de 6 ans (Mitchell, Liew et al. 2008).

### **3.2 Le mécanisme du remodelage vasculaire**

En fin de gestation au 3<sup>ème</sup> trimestre, on observe une accumulation très rapide d'élastine au niveau aortique (Martyn and Greenwald 1997). Le stimulus à l'origine de cette synthèse rapide d'élastine est inconnu, mais est requis afin d'avoir une adaptation optimale des artères de gros calibre tel que l'aorte. Ces modifications hémodynamiques postnatales immédiates sont caractérisées par une augmentation de la pression artérielle et du volume d'éjection systolique du ventricule gauche (Bendeck, Keeley et al. 1994). L'élastine supporte une grande partie de la tension générée par la pression sanguine et constitue un déterminant majeur du diamètre du vaisseau au repos. Ensuite, le développement postnatal de l'aorte et de l'arbre artériel s'effectuera selon un mode de vieillissement physiologique de la paroi artérielle concomitant à l'augmentation physiologique de la pression artérielle, et aboutira au remodelage vasculaire (tel que vu dans le paragraphe 3.2 de l'introduction).

Les artères sont ainsi capables de changements structuraux et fonctionnels en réponse aux conditions hémodynamiques. Dans l'hypertension, le système artériel va subir un remodelage structural caractérisé par une hypertrophie de la paroi artérielle, une augmentation du rapport paroi/lumière. Toutes ces altérations sont associées à une diminution de la distensibilité artérielle et peuvent contribuer à l'hypertension et aux dommages aux organes cibles. Nous avons montré dans l'article 2 (figure 2) qu'il n'y avait pas d'hypertrophie de la média et que le nombre de CML était inchangé dans le groupe H à 4W. De plus, afin d'étudier la contractilité vasculaire (ou vasomotricité) nous avons montré *ex vivo* que la réactivité vasculaire à l'AngII (induisant une vasoconstriction) et au carbachol (induisant une vasodilatation) chez les animaux âgés de 4 semaines est similaire entre les groupes (Article 2, figure 1A et 1B). La dysfonction vasculaire en terme de contractilité vasculaire ne paraît donc pas être la cause des troubles retrouvés à l'âge adulte.

En revanche nous avons observé une augmentation de la densité des fibres de collagène associée à une diminution de la densité des fibres d'élastine (Article 2, figure 3). Ces résultats traduisent un changement structurel au niveau aortique dans le groupe H dès 4 W. Les fibres d'élastine et de collagène interviennent dans les propriétés mécaniques des vaisseaux respectivement à pression faible-moderée et à pression plus élevée (Berry, Greenwald et al. 1975, Silver, Christiansen et al. 1989). Nous avons présenté dans l'introduction que les propriétés élastiques de l'aorte sont dépendantes de la présence de l'élastine dans la paroi artérielle. D'un point de vue clinique, l'altération des propriétés viscoélastiques suite à un défaut d'élastine pourrait expliquer la réduction de la compliance aortique observée chez les enfants prématurés. Ligi *et coll* ont d'ailleurs observé une

corrélation positive entre l'AG et le contenu en élastine dans les artères du cordon ombilical chez des enfants prématurés ou nés petits pour l'AG (Ligi, Grandvillain et al. 2010). De plus il a également été montré que la quantité d'élastine est associée avec une augmentation de la rigidité artérielle (Burkhardt, Matter et al. 2009) dans une population d'enfants atteints de RCIU.

Ces données sont intéressantes et permettent de mieux caractériser, d'un point de vue fonctionnel, l'ordre d'apparition des troubles au sein de notre modèle. En effet, cela pourrait expliquer d'une part l'élévation de la VOP retrouvée à l'âge adulte (Mivelaz, Yzydorczyk et al. 2011) dans le groupe exposé à l'O<sub>2</sub> et d'autre part l'élévation de la pression sanguine (Yzydorczyk, Comte et al. 2008) observée dans ce même groupe à l'âge adulte dans notre modèle. Ces données sont en accord avec ce qui a été observé dans les poumons et ostéoclastes de rats nouveau-nés exposés à une concentration élevée en O<sub>2</sub>, chez qui il a été trouvé une augmentation de la synthèse du collagène de type I et une diminution du dépôt d'élastine (Lopez, Boucherat et al. 2006, Chen, Wang et al. 2007).

Ces résultats sont également compatibles avec notre hypothèse de vieillissement précoce, à savoir que lors du vieillissement l'aorte développe une dégénérescence de l'élastine, ainsi qu'une augmentation du contenu en collagène ayant pour conséquence une perte d'élasticité et une augmentation de la rigidité (Schlatmann and Becker 1977).

Afin d'expliquer la dégradation des fibres d'élastine et l'augmentation de la densité des fibres de collagène, nous avons étudié les mécanismes moléculaires intervenant dans le remodelage de la MEC via l'intervention des MMPs et des cathepsines. Les MMP-2 et MMP-9 sont en effet connues pour dégrader l'élastine (Senior, Griffin et al. 1991).



Nous avons observé des modifications aussi bien dans l'activité (tendance augmentée mais non significative) que dans l'expression des MMP-2 (significativement augmentée) et -9 (Article 2, figures 5 et 6), dans les cathepsines (Article 2, figure 4), ainsi que dans l'expression des inhibiteurs tissulaires des MMPs : les TIMPs. Ces résultats peuvent ainsi suggérer que dans notre modèle, la dégradation de l'élastine peut s'expliquer par une augmentation de l'activité et expression des MMPs et des cathepsines.

De nombreux travaux ont montré que dans l'hypertension le stress oxydant favorise le dépôt de collagène ainsi que des altérations dans l'activité des MMPs. Ces perturbations entraînent un épaissement de la media et un remodelage vasculaire tel qu'observé dans de nombreuses maladies cardiovasculaires dont l'hypertension (Galis and Khatri 2002, Bouvet, Gilbert et al. 2005, Flamant, Placier et al. 2007, Watts, Rondelli et al. 2007).

Des études cliniques et expérimentales ont également mentionné une augmentation de l'expression et de l'activité des MMPs, notamment des MMP-2 et MMP-9 dans le plasma et tissu vasculaire d'individus hypertendus (Yasmin, McEniery et al. 2005).

Cependant, les altérations de la structure vasculaire (remaniement du ratio collagène/élastine, activation des enzymes de dégradation de la MEC) que nous observons interviennent dès 4W, soit en amont des dysfonctions vasculaires retrouvées à l'âge adulte. Nous pouvons ainsi conclure que l'élévation de la pression sanguine observée dans notre modèle pourrait résulter d'un remodelage vasculaire précoce, dû au phénomène de sénescence décrit dans la partie 2 de cette discussion.

### **3.3 L'augmentation d'indice de la rigidité artérielle**

Lorsque la rigidité des artères de gros calibre tel que l'aorte augmente, la vitesse et l'onde de réflexion du flux sanguin augmentent. L'onde de réflexion arrive plus rapidement au cœur, c'est à dire pendant la systole. Cela aura pour conséquence une augmentation de la PAS et de la PP, et une réduction de la PAD induisant une réduction de la perfusion coronarienne. Le cœur compensera par une augmentation de sa postcharge qu'il va compenser par une augmentation de son travail. Si la rigidité artérielle reste élevée, il apparaîtra une hypertrophie ventriculaire gauche (Girerd, Laurent et al. 1991). Ces modifications du système vasculaire peuvent survenir très tôt dans la vie, ou se développer progressivement avec l'âge. L'augmentation de la rigidité artérielle, mais également la diminution de la compliance artérielle, sont reconnues comme facteurs de risque de maladies cardiovasculaires au même titre que l'âge ou l'HTA, pour n'en citer que quelques-uns (Lehmann, Hopkins et al. 1996). L'augmentation de la rigidité artérielle contribue donc au développement de l'hypertension systémique, particulièrement systolique, chez les personnes âgées (Franklin, Khan et al. 1999).

Dans l'article 3 tableau 2, il est intéressant de souligner que le groupe d'anciens prématurés présente des valeurs de PAS plus élevées que le groupe contrôle, sans toutefois être significative. Bien que non pathologiques, ces valeurs peuvent déjà souligner une augmentation de la rigidité traduisant un vieillissement précoce du système vasculaire chez ces patients.

Il est connu que la prématurité peut altérer le développement du système cardiovasculaire et prédisposer à l'hypertension artérielle, favorisant ainsi la survenue de maladies cardiovasculaires à long terme (Martyn and Greenwald 1997, Liao, Arnett et al.

1999). Du fait de la variation proportionnelle à l'AG du contenu pariétal en élastine et de la diminution rapide de son accumulation après la naissance (Berry, Looker et al. 1972), il est possible qu'une diminution de sa synthèse durant la vie fœtale, ou que la compromission de l'achèvement de son accumulation pariétale par une naissance trop précoce, soient impossibles à corriger ultérieurement et engendrent une augmentation de la rigidité artérielle à long terme à l'origine d'un vieillissement précoce des artères de gros calibre (Martyn and Greenwald 1997).

Nous avons donc étudié des indices de rigidité au sein d'une cohorte d'anciens prématurés comparés à de jeunes adultes nés à terme. Ces résultats ont mis en évidence une augmentation des impédances (Article 3, Table 3) sans augmentation des indices directs de rigidité artérielle tels que la VOP ou l'EP et le  $\beta$ SI.

Dans la littérature, il a été montré que le nouveau-né grand prématuré présentait à cinq jours de vie une altération des propriétés viscoélastiques de la paroi aortique associée à une diminution de sa compliance. Il a également été montré que malgré le développement extra-utérin, l'altération des propriétés viscoélastiques artérielles persistait, par une compliance artérielle basse chez le prématuré à sept semaines de vie (Tauzin, Rossi et al. 2006). Une autre étude indique une augmentation de l'index de rigidité de l'aorte abdominale chez des nouveau-nés présentant un RCIU (Akira and Yoshiyuki 2006). De plus, il est intéressant de remarquer que l'augmentation de la rigidité artérielle est indépendante de la pression artérielle chez les adolescents anciens prématurés sans RCIU (Rossi, Tauzin et al. 2006) ou de petit poids de naissance (Lurbe, Torro et al. 2003). C'est également le cas dans notre étude : bien que légèrement plus importantes, les pressions artérielles systoliques ne sont pas significativement plus élevées dans le groupe des

prématurés (Article 3, tableau 2). Enfin, chez l'adulte, une relation inverse entre le poids de naissance et la rigidité artérielle a également été montrée et celle-ci est d'autant plus forte que l'AG est faible (Martyn, Barker et al. 1995, Oren, Vos et al. 2003).

Nous pouvons préciser qu'avec le temps, ou en étudiant une cohorte plus âgée, ou par exemple en recrutant un nombre plus important de sujets, il serait possible de montrer une élévation significative de la PAS. Mais il paraît plus intéressant de montrer l'ontogénie des troubles vasculaires rencontrés, et nos résultats permettent ainsi de caractériser l'ordre d'apparition des troubles en indiquant que la rigidité artérielle serait la cause d'une élévation de la PAS retrouvées dans cette population. De plus, ces résultats sont les premiers à étudier dans ce groupe d'âge (jeunes adultes) au niveau aortique des indices de rigidité directs (EP, BSI) et indirects (VOP, Zi et ZC), permettant ainsi d'affiner le profil vasculaire de cette population. Nous avons montré que les impédances aortiques sont significativement plus élevées dans le groupe des prématurés comparés aux contrôles. En revanche, un indice plus souvent étudié comme la VOP n'apparaît pas différents dans notre étude (Article 3, tableau 3). Les autres marqueurs de rigidité directs comme le EP et BSI ne présentent pas non plus de différence. Ces résultats suggèrent qu'au sein de notre cohorte les marqueurs directs ne semblent pas impliqués dans le développement de la rigidité artérielle.

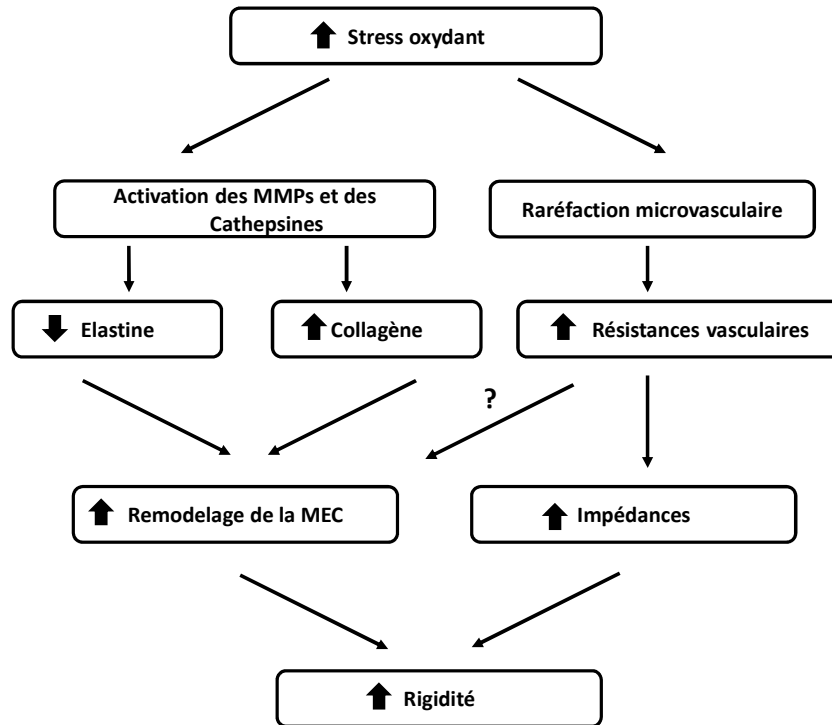
En mettant en parallèle les résultats de l'article 3, de l'article 2 et ceux de l'article 1, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'augmentation des impédances retrouvée dans notre cohorte pourrait être expliquée par un changement de structure de l'aorte montré dans l'article 2. Yasmin et al ont montré que l'accroissement de l'expression de MMP-9 et MMP-2 était corrélé à l'augmentation de VOP 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 VOP, davantage que le facteur âge des patients. De plus, même chez les sujets jeunes et sains, la MMP-9 reste un prédicteur indépendant de la rigidité aortique (Yasmin, McEniery et al. 2005). Même si la VOP n'est pas affectée dans notre cohorte, les impédances qui sont également des marqueurs de rigidité indirects sont elles en revanche significativement augmentées dans le groupe des prématurés. Nous proposons donc que les MMPs, vraisemblablement en dégradant les fibres élastiques, favorisent la rigidité vasculaire dans notre modèle. La dégradation de l'élastine, diminuant l'élasticité de la paroi artérielle, réduit ainsi la capacité de l'aorte à se distendre sous le flux lors de l'éjection cardiaque, cela augmentant les impédances de l'aorte. En outre, la dégradation de l'élastine via les MMPs, telle que citée dans l'introduction, et d'autres macromolécules de la MEC produisent des matrikines qui peuvent intervenir dans les processus liés à la rigidité vasculaire.

Par ailleurs, en intégrant la raréfaction vasculaire observée dans l'article 1, l'altération des impédances pourrait refléter le défaut des résistances dans le modèle animal dès P10.

Nous pouvons ainsi présenter ces différents résultats sous la forme du schéma suivant (Figure 22).

**Figure 23 : Synthèse mécanistique d'un point de vue fonctionnel du développement de la rigidité artérielle via le remodelage vasculaire et l'augmentation des impédances**



D'autres explorations seront utiles afin d'évaluer l'exactitude et l'ontogénie de la succession d'évènements proposés dans l'augmentation de la rigidité des artères que nous suggérons à la figure 22 et déterminer quel facteur serait le plus pertinent à contrôler et à quel moment dans le processus de remodelage ou de vieillissement vasculaire.

**CHAPITRE 6 : PERSPECTIVES GENERALES**

## **1. Implication des mécanismes de régulation épigénétique**

Un phénomène en plein essor qu'il paraît intéressant d'étudier dans notre modèle est l'épigénétique. En effet, il est connu que des influences environnementales précoces dans le développement pourraient induire des variations épigénétiques pouvant affecter de manière permanente le risque de maladies cardiovasculaires (Nuyt and Szyf 2007). Le matériel génétique est ainsi équipé d'un ensemble de mécanismes, appelés épigénétiques, qui lui permettent d'adapter le déroulement du programme à son environnement. Les modifications épigénétiques désignent donc l'ensemble des modifications héritables du phénotype secondaire à un mécanisme indépendant de la séquence primaire d'ADN (Bird 2007). Les plus connues sont la méthylation de l'ADN et les modifications de la chromatine mais aussi d'autres mécanismes comme, par exemple, les ARNs non codants. Cela permet à plusieurs gènes d'être actifs alors que d'autres restent silencieux de manière transitoire ou permanente. Ces modifications jouent notamment un rôle majeur dans la régulation des télomères.

Nous disposons de tissus issus du modèle animal sur deux générations (descendance de rats exposés à l'O<sub>2</sub> en période néonatale) et il serait alors possible d'étudier les effets de ces mécanismes au niveau des effets à travers les générations.

## **2. Étude de la vasodilatation de l'artère brachiale par Doppler**

Plusieurs études révèlent que le vieillissement vasculaire est associé à une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium et à une hypersensibilité aux agents vasoconstricteurs (Marín 1995, Heitzer, Just et al. 1996, Barua, Ambrose et al. 2001, Lakatta 2002, Ambrose and Barua 2004, Brandes, Fleming et al. 2005).



La dilatation artérielle résulte principalement du relâchement du NO par l'endothélium, reflétant la fonction de celui-ci (Joannides, Haefeli et al. 1995). De plus, des résultats précédents de notre laboratoire ont démontré une dysfonction endothéliale dans le modèle animal (Yzdyorczyk, Comte et al. 2013). Enfin il a également été étudié à plusieurs reprises dans une des études cliniques une relation entre le faible poids de naissance et une dysfonction endothéliale (Martin, Hu et al. 2000, Leeson, Kattenhorn et al. 2001).

La dilatation endothéliale dépendante du flux vasculaire (FMD) de l'artère brachiale apparaît donc comme un paramètre important à étudier au sein de notre cohorte. La FMD est analysée en mesurant la modification du diamètre de l'artère en réponse à une augmentation du flux sanguin. Celui-ci est obtenu suite au relâchement d'un brassard ayant auparavant été gonflé 50 mmHg au-dessus de la PAS. Elle est considérée comme la technique de référence non-invasive pour mesurer la fonction endothéliale (Corretti, Anderson et al. 2002, Pyke and Tschakovsky 2005, Deanfield, Halcox et al. 2007).

### **3. Étude des cellules souches vasculaires : les cellules progénitrices endothéliales**

Nous avons vu que le vieillissement cellulaire est un ensemble complexe de phénotypes caractérisé par une diminution de la prolifération cellulaire. Au contraire de l'homéostasie chez des organismes comme la drosophile ou *Caenorhabditis elegans*, l'homéostasie chez les mammifères dépend de la présence de cellules souches ayant la capacité de renouvellement nécessaire à la régénération tissulaire. Ainsi, la régulation de la longévité des cellules souches joue un rôle dans le vieillissement humain (Park, Morrison et al. 2004).

Les résultats obtenus dans l'étude du développement vasculaire ont montré une diminution de la capacité angiogénique, renforcée par une diminution de la prolifération cellulaire au niveau vasculaire. Ils soulignent par conséquent l'intérêt d'étudier plus spécifiquement le rôle des CPE. En effet, de part leur fonction cruciale lors du développement du réseau vasculaire lors des phénomènes d'angiogenèse, les CPE apparaissent comme un candidat intéressant (Asahara, Masuda et al. 1999). L'étude de leur capacité fonctionnelle, à savoir le développement de nouveaux vaisseaux à l'aide de matrigel, apparait comme une expérience intéressante permettant de mettre en évidence une éventuelle altération des CPE dans notre modèle (Ingram, Mead et al. 2004). Parallèlement, l'étude de leur capacité de renouvellement est également une autre voie d'exploration possible, faisant ainsi intervenir les hypothèses de sénescence précoce que vous avons développées dans ce doctorat (Masuda, Alev et al. 2011).

#### **4. Étude de la longueur des télomères**

Les télomères sont des régions de l'ADN situées aux extrémités des chromosomes. Le rôle principal des télomères est de protéger l'intégrité des chromosomes. Du fait de leur attrition graduelle, en fonction du nombre de cycles cellulaires, les télomères représentent des marqueurs de la sénescence cellulaire (Edo and Andres 2005), en particulier pour les cellules du système cardiovasculaire comme les cellules endothéliales (Giannotti, Doerries et al. 2010) ou musculaires lisses (Matthews, Gorenne et al. 2006). L'étude de la longueur des télomères chez l'humain au sein de notre cohorte apparait comme une perspective justifiée et pertinente. Une récente étude de l'équipe du Pr Aviv (Daniali, Benetos et al. 2013) met en évidence le rôle crucial de la longueur des télomères dans les cellules au sein

d'une population de jeunes adultes. En effet, les chercheurs ont mis en évidence que la longueur des télomères était majoritairement déterminée pendant les vingt premières années de la vie, plus que par les comportements futurs (tabac, exercice physique, etc.). De plus, cette étude met également en évidence que les différences observées sont davantage présentes dans les populations de cellules souches de ces patients, cellules fortement impliquées dans le développement et le renouvellement des fonctions de l'organisme. Il apparaît donc ultimement intéressant d'étudier la longueur des télomères au sein de notre cohorte, population encore jeune où nous serions susceptibles de mettre en évidence un raccourcissement des télomères à cette âge encore jeune. De plus, l'étude au niveau des CPE paraît être intéressante dans ce contexte du fait des capacités altérées d'angiogenèse retrouvées dans notre modèle animal.

**CHAPITRE 7 : CONCLUSIONS**

Dans le premier article, il a été montré qu'une exposition en période néonatale à de l'hyperoxie résultait dans le modèle animal en des dommages persistant de l'ADN, ainsi qu'en une augmentation de protéines de sénescence au niveau aortique. De plus, dans ce même modèle animal, une diminution de la prolifération cellulaire et de la capacité angiogénique au niveau aortique a été montrée ainsi qu'une raréfaction microvasculaire. Ces éléments suggèrent donc un vieillissement vasculaire prématuré, précédant l'hypertension et les dysfonctions vasculaire retrouvées à l'âge adulte dans notre modèle animal, et pourraient donc y contribuer.

Le deuxième article a étudié les conséquences d'une exposition brève à l'O<sub>2</sub> en période néonatale dans le modèle animal (rats âgés de 4 semaines, soit avant l'apparition des troubles retrouvés à l'âge adulte), au niveau des composants de la structure des vaisseaux. La proportion de fibres de collagène est significativement augmentée chez les animaux ayant été exposés à l'O<sub>2</sub>, comparés aux contrôles. La proportion de fibres d'élastine est en revanche significativement diminuée chez les animaux ayant été exposé à l'O<sub>2</sub>, comparés aux contrôles. Le ratio élastine/collagène est de plus significativement diminué chez ces mêmes animaux, cela traduisant un remodelage vasculaire et une rigidification artérielle déjà présente à 4 semaines. De plus, l'étude des MMPs (enzymes intervenant dans la modification de la matrice extra-cellulaire) dans la paroi aortique montre des indices de remodelage vasculaire présents chez ces animaux.

Dans le troisième article, l'objectif était de définir l'état de l'arbre vasculaire chez de jeunes adultes au niveau des propriétés biophysiques de l'aorte, pouvant ainsi mettre en évidence une rigidité artérielle accrue, indice de vieillissement vasculaire précoce. Comparés aux sujets nés à terme, les prématurés ont des pressions artérielles systolique,

diastolique et moyenne similaires. La VOP ne présente pas de différence chez les prématurés comparés aux contrôles. Le  $\beta$ SI et l'Ep, reflétant directement la rigidité artérielle au niveau central, ne présentent pas d'augmentation chez les prématurés comparés aux contrôles. Zc et Zi, reflétant les résistances à l'éjection du flux, présentent une augmentation significative comparées aux contrôles. Ces résultats supportent l'hypothèse proposée à savoir une augmentation de la rigidité artérielle. L'altération de l'arbre vasculaire pourrait donc prédisposer et expliquer la physiopathologie de complications cardiovasculaires dans cette population de jeunes adultes.

Ce projet de recherche de doctorat forme ainsi un exemple de recherche translationnelle où les connaissances émergent des résultats obtenus en laboratoire servent à une explication mécanistique des différences observées en recherche clinique. Les résultats de ce projet permettent de mieux caractériser les facteurs de risque au niveau vasculaire orientant ainsi la prise en charge de cette population auprès des intervenants en santé vers une pratique préventive de dépistage et d'intervention précoce. En identifiant les anciens prématurés comme groupe à risque, il sera possible à long terme d'agir à plusieurs niveaux. En évaluant notamment des nouvelles pratiques en néonatalogie susceptible de modifier favorablement la programmation développementale de pathologies adultes.

Enfin, pour résumer sous forme de points saillants et concis, les résultats de cette thèse démontrent que :

1. L'exposition à l'O<sub>2</sub> en période néonatale provoque à court terme chez le raton, dont le système vasculaire est encore en développement, une diminution de la prolifération cellulaire au niveau aortique.

2. Au niveau fonctionnel, la diminution de prolifération se traduit par une diminution des capacités d'angiogénèse ainsi que par une raréfaction microvasculaire observée au niveau du muscle tibial.

3. L'exposition néonatale à l'O<sub>2</sub> augmente la présence de bris à l'ADN et de foci au niveau nucléaire de 53BP1 à P10, 4W et 16W, indiquant l'existence d'éléments de réparations persistant chez l'adulte.

4. La présence de bris à l'ADN n'évoque pas des phénomènes d'apoptose (pas d'augmentation d'expression de Bax et de Bcl2 à P10 ni à 4W). De plus, l'expression de protéines de sénescence est significativement augmentée au niveau aortique immédiatement après l'exposition à l'O<sub>2</sub> en période néonatale et à long terme. Ces résultats démontrent pour la première fois la présence de marqueurs caractéristiques de vieillissement au-delà de la période néonatale, suite à une exposition brève à l'O<sub>2</sub>. Ces changements précèdent l'HTA et la dysfonction vasculaire et pourraient donc y contribuer.

5. L'exposition à l'O<sub>2</sub> pour une période brève de 24 ou 48 h sur des cellules se traduit par une diminution de la prolifération cellulaire, et cela sans augmentation de cytotoxicité. Les conséquences observées peuvent donc être compatibles avec des mécanismes de sénescence cellulaire, et n'orientent pas l'explication des phénomènes

observés vers des mécanismes de cytotoxicité pouvant être attribuables à des phénomènes de nécrose ou d'apoptose.

6. Le maintien d'une structure vasculaire identique au niveau de la taille des CMLV. Aucune hypertrophie des CMLV n'est observée dans ce modèle et le rapport de la media sur la lumière de l'aorte est inchangé.

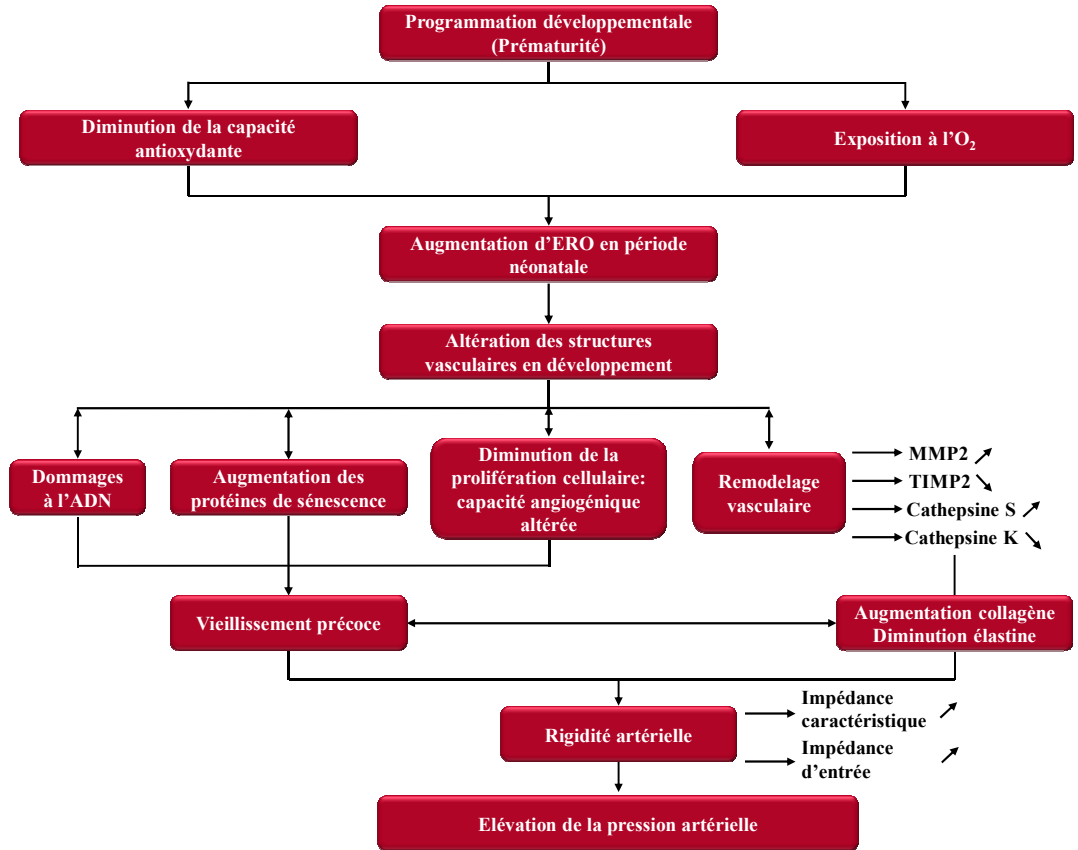
7. Un remodelage vasculaire actif est présent : le rapport élastine/collagène aortique est diminué à 4W suite à une exposition néonatale à l'O<sub>2</sub> et peut s'expliquer en une activation accrue de MMP-2 aortique qui s'accompagne d'une inhibition de TIMP-2.

8. Comparées aux sujets nés à terme, les prématurés ne présentent pas une augmentation des marqueurs directs de rigidité artérielle (VOP, EP et BSi).

9. En revanche, comparés aux sujets nés à terme, les prématurés présentent une augmentation des marqueurs indirects de rigidité artérielle, tels les impédances Zc et Zi traduisant une altération des résistances. Cette altération de l'arbre vasculaire pourrait intervenir dans la physiopathologie des complications cardiovasculaires associées.



**Figure 24: Mécanisme physiopathologique du développement de l'élévation de la pression artérielle à l'âge adulte lors d'une exposition à l'O<sub>2</sub> en période néonatale**



## Références bibliographiques

Adams, M. M. and P. B. Carpenter (2006). "Tying the loose ends together in DNA double strand break repair with 53BP1." Cell Div **1**: 19.

Adijiang, A., Y. Higuchi, F. Nishijima, H. Shimizu and T. Niwa (2010). "Indoxyl sulfate, a uremic toxin, promotes cell senescence in aorta of hypertensive rats." Biochem Biophys Res Commun **399**(4): 637-641.

Akira, M. and S. Yoshiyuki (2006). "Placental circulation, fetal growth, and stiffness of the abdominal aorta in newborn infants." J Pediatr **148**(1): 49-53.

Alexander, B. T. (2003). "Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring." Hypertension **41**(3): 457-462.

Alexeyev, M. F., S. P. Ledoux and G. L. Wilson (2004). "Mitochondrial DNA and aging." Clin Sci (Lond) **107**(4): 355-364.

Ambrose, J. A. and R. S. Barua (2004). "The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update." J Am Coll Cardiol **43**(10): 1731-1737.

Anderson, L., C. Henderson and Y. Adachi (2001). "Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage." Mol Cell Biol **21**(5): 1719-1729.

Arribas, S. M., A. Hinek and M. C. Gonzalez (2006). "Elastic fibres and vascular structure in hypertension." Pharmacol Ther **111**(3): 771-791.

Artandi, S. E., S. Chang, S. L. Lee, S. Alson, G. J. Gottlieb, L. Chin and R. A. DePinho (2000). "Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice." Nature **406**(6796): 641-645.

Asahara, T., H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Magner and J. M. Isner (1999). "Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization." Circ Res **85**(3): 221-228.

Baker, S. J., S. Markowitz, E. R. Fearon, J. K. Willson and B. Vogelstein (1990). "Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53." Science **249**(4971): 912-915.

Ballatori, N., S. M. Krance, S. Notenboom, S. Shi, K. Tieu and C. L. Hammond (2009). "Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases." Biol Chem **390**(3): 191-214.

Barker, D. J. (1998). Programming the baby. Mothers, babies and health in later life Edinburgh, Churchill Livingstone 13-42.

Barker, D. J. and C. Osmond (1986). "Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales." Lancet **1**(8489): 1077-1081.

Barker, D. J., C. Osmond, J. Golding, D. Kuh and M. E. Wadsworth (1989). "Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease." BMJ **298**(6673): 564-567.

Barua, R. S., J. A. Ambrose, L. J. Eales-Reynolds, M. C. DeVoe, J. G. Zervas and D. C. Saha (2001). "Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation." Circulation **104**(16): 1905-1910.

Bassareo, P. P., V. Fanos, M. Puddu, P. Demuru, F. Cadeddu, M. Balzarini and G. Mercurio (2010). "Reduced brachial flow-mediated vasodilation in young adult ex extremely low birth weight preterm: a condition predictive of increased cardiovascular risk?" J Matern Fetal Neonatal Med **23 Suppl 3**: 121-124.

Baumbach, G. L. and D. D. Heistad (1989). "Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension." Hypertension **13**(6 Pt 2): 968-972.

Ben-Porath, I. and R. A. Weinberg (2005). "The signals and pathways activating cellular senescence." Int J Biochem Cell Biol **37**(5): 961-976.

Bendeck, M. P., F. W. Keeley and B. L. Langille (1994). "Perinatal accumulation of arterial wall constituents: relation to hemodynamic changes at birth." Am J Physiol **267**(6 Pt 2): H2268-2279.

Benetos, A., S. Laurent, A. P. Hoeks, P. H. Boutouyrie and M. E. Safar (1993). "Arterial alterations with aging and high blood pressure. A noninvasive study of carotid and femoral arteries." Arterioscler Thromb **13**(1): 90-97.

Berg, A. H. and P. E. Scherer (2005). "Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease." Circ Res **96**(9): 939-949.

Berry, C. L., S. E. Greenwald and J. F. Rivett (1975). "Static mechanical properties of the developing and mature rat aorta." Cardiovasc Res **9**(5): 669-678.

Berry, C. L., T. Looker and J. Germain (1972). "Nucleic acid and scleroprotein content of the developing human aorta." J Pathol **108**(4): 265-274.

Berry, C. L., T. Looker and J. Germain (1972). "The growth and development of the rat aorta. I. Morphological aspects." J Anat **113**(Pt 1): 1-16.

Berti, P. J. and A. C. Storer (1995). "Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases." J Mol Biol **246**(2): 273-283.

- Bird, A. (2007). "Perceptions of epigenetics." Nature **447**(7143): 396-398.
- Biri, A., A. Onan, E. Devrim, F. Babacan, M. Kavutcu and I. Durak (2006). "Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes." Placenta **27**(2-3): 327-332.
- Boivin, A., Z. C. Luo, F. Audibert, B. Masse, F. Lefebvre, R. Tessier and A. M. Nuyt (2012). "Pregnancy complications among women born preterm." CMAJ **184**(16): 1777-1784.
- Bonamy, A. K., A. Bendito, H. Martin, E. Andolf, G. Sedin and M. Norman (2005). "Preterm birth contributes to increased vascular resistance and higher blood pressure in adolescent girls." Pediatr Res **58**(5): 845-849.
- Bonamy, A. K., K. Kallen and M. Norman (2012). "High blood pressure in 2.5-year-old children born extremely preterm." Pediatrics **129**(5): e1199-1204.
- Bonamy, A. K., H. Martin, G. Jorreskog and M. Norman (2007). "Lower skin capillary density, normal endothelial function and higher blood pressure in children born preterm." J Intern Med **262**(6): 635-642.
- Bonikos, D. S., K. G. Bensch and W. H. Northway, Jr. (1976). "Oxygen toxicity in the newborn. The effect of chronic continuous 100 percent oxygen exposure on the lungs of newborn mice." Am J Pathol **85**(3): 623-650.
- Bork, P., K. Hofmann, P. Bucher, A. F. Neuwald, S. F. Altschul and E. V. Koonin (1997). "A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins." FASEB J **11**(1): 68-76.
- Bou-Gharios, G., M. Ponticos, V. Rajkumar and D. Abraham (2004). "Extra-cellular matrix in vascular networks." Cell Prolif **37**(3): 207-220.
- Boudier, H. A. (1999). "Arteriolar and capillary remodelling in hypertension." Drugs **58 Spec No 1**: 37-40.
- Bouvet, C., L. A. Gilbert, D. Girardot, D. deBlois and P. Moreau (2005). "Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition." Hypertension **45**(3): 432-437.
- Bradley, T. J., J. E. Potts, M. T. Potts, A. M. DeSouza and G. G. Sandor (2005). "Echocardiographic Doppler assessment of the biophysical properties of the aorta in pediatric patients with the Marfan syndrome." Am J Cardiol **96**(9): 1317-1321.
- Brandes, R. P., I. Fleming and R. Busse (2005). "Endothelial aging." Cardiovasc Res **66**(2): 286-294.

- Bringold, F. and M. Serrano (2000). "Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence." Exp Gerontol **35**(3): 317-329.
- Bromme, D., K. Okamoto, B. B. Wang and S. Biroc (1996). "Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme." J Biol Chem **271**(4): 2126-2132.
- Brown, J. P., W. Wei and J. M. Sedivy (1997). "Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts." Science **277**(5327): 831-834.
- Bruel, A. and H. Oxlund (1996). "Changes in biomechanical properties, composition of collagen and elastin, and advanced glycation endproducts of the rat aorta in relation to age." Atherosclerosis **127**(2): 155-165.
- Buitendijk, S., J. Zeitlin, M. Cuttini, J. Langhoff-Roos and J. Bottu (2003). "Indicators of fetal and infant health outcomes." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **111 Suppl 1**: S66-77.
- Burkhardt, T., C. M. Matter, C. Lohmann, H. Cai, T. F. Lüscher, A. H. Zisch and E. Beinder (2009). "Decreased umbilical artery compliance and igf-I plasma levels in infants with intrauterine growth restriction - implications for fetal programming of hypertension." Placenta **30**(2): 136-141.
- Bürrig, K. F. (1991). "The endothelium of advanced arteriosclerotic plaques in humans." Arterioscler Thromb **11**(6): 1678-1689.
- Callebaut, I. and J. P. Mornon (1997). "From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair." FEBS Lett **400**(1): 25-30.
- Cambonie, G., B. Comte, C. Zydorczyk, T. Ntimbane, N. Germain, N. L. Lê, P. Pladys, C. Gauthier, I. Lahaie, D. Abran, J. C. Lavoie and A. M. Nuyt (2007). "Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **292**(3): R1236-1245.
- Campisi, J. (1998). "The role of cellular senescence in skin aging." J Investig Dermatol Symp Proc **3**(1): 1-5.
- Campisi, J. (2000). "Cancer, aging and cellular senescence." In Vivo **14**(1): 183-188.
- Campisi, J. (2001). "From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture?" Exp Gerontol **36**(4-6): 607-618.
- Canepa, E. T., M. E. Scassa, J. M. Ceruti, M. C. Marazita, A. L. Carcagno, P. F. Sirkin and M. F. Ogara (2007). "INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions." IUBMB Life **59**(7): 419-426.

- Canty, E. G. and K. E. Kadler (2005). "Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis." J Cell Sci **118**(Pt 7): 1341-1353.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." Nat Med **6**(4): 389-395.
- Chapman, H. A., R. J. Riese and G. P. Shi (1997). "Emerging roles for cysteine proteases in human biology." Annu Rev Physiol **59**: 63-88.
- Chapman, N., A. Mohamudally, A. Cerutti, A. Stanton, A. A. Sayer, C. Cooper, D. Barker, A. Rauf, J. Evans, R. Wormald, P. Sever, A. Hughes and S. Thom (1997). "Retinal vascular network architecture in low-birth-weight men." J Hypertens **15**(12 Pt 1): 1449-1453.
- Chen, C. M., L. F. Wang, H. C. Chou, Y. D. Lang and Y. P. Lai (2007). "Up-regulation of connective tissue growth factor in hyperoxia-induced lung fibrosis." Pediatr Res **62**(2): 128-133.
- Chen, J. and L. E. Smith (2007). "Retinopathy of prematurity." Angiogenesis **10**(2): 133-140.
- Chen, Q. and B. N. Ames (1994). "Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4130-4134.
- Chen, Q., A. Fischer, J. D. Reagan, L. J. Yan and B. N. Ames (1995). "Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(10): 4337-4341.
- Chen, Q. M., J. C. Bartholomew, J. Campisi, M. Acosta, J. D. Reagan and B. N. Ames (1998). "Molecular analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication." Biochem J **332** (Pt 1): 43-50.
- Chen, Q. M., J. Liu and J. B. Merrett (2000). "Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response of normal human fibroblasts." Biochem J **347**(Pt 2): 543-551.
- Cheng, X. W., K. Obata, M. Kuzuya, H. Izawa, K. Nakamura, E. Asai, T. Nagasaka, M. Saka, T. Kimata, A. Noda, K. Nagata, H. Jin, G. P. Shi, A. Iguchi, T. Murohara and M. Yokota (2006). "Elastolytic cathepsin induction/activation system exists in myocardium and is upregulated in hypertensive heart failure." Hypertension **48**(5): 979-987.
- Chessex, P., C. Watson, G. W. Kaczala, T. Rouleau, M. E. Lavoie, J. Friel and J. C. Lavoie (2010). "Determinants of oxidant stress in extremely low birth weight premature infants." Free Radic Biol Med **49**(9): 1380-1386.

- Cheung, Y. F., K. Y. Wong, B. C. Lam and N. S. Tsoi (2004). "Relation of arterial stiffness with gestational age and birth weight." Arch Dis Child **89**(3): 217-221.
- Collins, I. and M. D. Garrett (2005). "Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors." Curr Opin Pharmacol **5**(4): 366-373.
- Corretti, M. C., T. J. Anderson, E. J. Benjamin, D. Celermajer, F. Charbonneau, M. A. Creager, J. Deanfield, H. Drexler, M. Gerhard-Herman, D. Herrington, P. Vallance, J. Vita, R. Vogel and I. B. A. R. T. Force (2002). "Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force." J Am Coll Cardiol **39**(2): 257-265.
- Daniali, L., A. Benetos, E. Susser, J. D. Kark, C. Labat, M. Kimura, K. Desai, M. Granick and A. Aviv (2013). "Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults." Nat Commun **4**: 1597.
- Dannenberg, J. H., A. van Rossum, L. Schuijff and H. te Riele (2000). "Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions." Genes Dev **14**(23): 3051-3064.
- Dart, A. M. and B. A. Kingwell (2001). "Pulse pressure--a review of mechanisms and clinical relevance." J Am Coll Cardiol **37**(4): 975-984.
- de Jong, F., M. C. Monuteaux, R. M. van Elburg, M. W. Gillman and M. B. Belfort (2012). "Systematic review and meta-analysis of preterm birth and later systolic blood pressure." Hypertension **59**(2): 226-234.
- Deanfield, J. E., J. P. Halcox and T. J. Rabelink (2007). "Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance." Circulation **115**(10): 1285-1295.
- Debbabi, H., L. Uzan, J. J. Mourad, M. Safar, B. I. Levy and E. Tibiriçà (2006). "Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients." Am J Hypertens **19**(5): 477-483.
- Di Leonardo, A., S. P. Linke, K. Clarkin and G. M. Wahl (1994). "DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts." Genes Dev **8**(21): 2540-2551.
- Dietz, H. C. and R. P. Mecham (2000). "Mouse models of genetic diseases resulting from mutations in elastic fiber proteins." Matrix Biol **19**(6): 481-488.
- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith and et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9363-9367.

- Dirac, A. M. and R. Bernards (2003). "Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53." J Biol Chem **278**(14): 11731-11734.
- Dorfman, A., O. Dembinska, S. Chemtob and P. Lachapelle (2008). "Early manifestations of postnatal hyperoxia on the retinal structure and function of the neonatal rat." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(1): 458-466.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**(1): 47-95.
- Dulic, V., W. K. Kaufmann, S. J. Wilson, T. D. Tlsty, E. Lees, J. W. Harper, S. J. Elledge and S. I. Reed (1994). "p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest." Cell **76**(6): 1013-1023.
- Edo, M. D. and V. Andres (2005). "Aging, telomeres, and atherosclerosis." Cardiovasc Res **66**(2): 213-221.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell **75**(4): 817-825.
- Ellis, R. E., J. Y. Yuan and H. R. Horvitz (1991). "Mechanisms and functions of cell death." Annu Rev Cell Biol **7**: 663-698.
- Feeney, L. and E. R. Berman (1976). "Oxygen toxicity: membrane damage by free radicals." Invest Ophthalmol **15**(10): 789-792.
- Flamant, M., S. Placier, C. Dubroca, B. Esposito, I. Lopes, C. Chatziantoniou, A. Tedgui, J. C. Dussault and S. Lehoux (2007). "Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling." Hypertension **50**(1): 212-218.
- Forman, H. J., M. Maiorino and F. Ursini (2010). "Signaling functions of reactive oxygen species." Biochemistry **49**(5): 835-842.
- Forsdahl, A. (1977). "Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease?" Br J Prev Soc Med **31**(2): 91-95.
- Franco, M. C., E. M. Kawamoto, R. Gorjao, V. M. Rastelli, R. Curi, C. Scavone, A. L. Sawaya, Z. B. Fortes and R. Sesso (2007). "Biomarkers of oxidative stress and antioxidant status in children born small for gestational age: evidence of lipid peroxidation." Pediatr Res **62**(2): 204-208.
- Frank, L., J. R. Bucher and R. J. Roberts (1978). "Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species." Journal of Applied Physiology **45**(5): 699-704.



- Frank, L. and I. R. Sosenko (1991). "Failure of premature rabbits to increase antioxidant enzymes during hyperoxic exposure: increased susceptibility to pulmonary oxygen toxicity compared with term rabbits." Pediatr Res **29**(3): 292-296.
- Franklin, S. S., S. A. Khan, N. D. Wong, M. G. Larson and D. Levy (1999). "Is pulse pressure useful in predicting risk for coronary heart Disease? The Framingham heart study." Circulation **100**(4): 354-360.
- Galis, Z. S. and J. J. Khatri (2002). "Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly." Circ Res **90**(3): 251-262.
- Garinis, G. A., G. T. van der Horst, J. Vijg and J. H. Hoeijmakers (2008). "DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem." Nat Cell Biol **10**(11): 1241-1247.
- Garnero, P., O. Borel, I. Byrjalsen, M. Ferreras, F. H. Drake, M. S. McQueney, N. T. Foged, P. D. Delmas and J. M. Delaisse (1998). "The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases." J Biol Chem **273**(48): 32347-32352.
- Gelb, B. D., G. P. Shi, H. A. Chapman and R. J. Desnick (1996). "Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency." Science **273**(5279): 1236-1238.
- Gelse, K., E. Poschl and T. Aigner (2003). "Collagens--structure, function, and biosynthesis." Adv Drug Deliv Rev **55**(12): 1531-1546.
- Georgeson, G. D., B. J. Szony, K. Streitman, I. S. Varga, A. Kovacs, L. Kovacs and A. Laszlo (2002). "Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **103**(2): 136-139.
- Giannotti, G., C. Doerries, P. S. Mocharla, M. F. Mueller, F. H. Bahlmann, T. Horvath, H. Jiang, S. A. Sorrentino, N. Steenken, C. Manes, M. Marzilli, K. L. Rudolph, T. F. Luscher, H. Drexler and U. Landmesser (2010). "Impaired endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in prehypertension: relation to endothelial dysfunction." Hypertension **55**(6): 1389-1397.
- Gibbons, G. H. and V. J. Dzau (1994). "The emerging concept of vascular remodeling." N Engl J Med **330**(20): 1431-1438.
- Girerd, X., S. Laurent, B. Pannier, R. Asmar and M. Safar (1991). "Arterial distensibility and left ventricular hypertrophy in patients with sustained essential hypertension." Am Heart J **122**(4 Pt 2): 1210-1214.
- Gluckman, P. D. and M. A. Hanson (2006). "The consequences of being born small - an adaptive perspective." Horm Res **65 Suppl 3**: 5-14.
- Gokce, N., J. F. Keaney, Jr., L. M. Hunter, M. T. Watkins, J. O. Menzoian and J. A. Vita (2002). "Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study." Circulation **105**(13): 1567-1572.

- Goldenberg, R. L., J. F. Culhane, J. D. Iams and R. Romero (2008). "Epidemiology and causes of preterm birth." Lancet **371**(9606): 75-84.
- Green, D. R. and G. I. Evan (2002). "A matter of life and death." Cancer Cell **1**(1): 19-30.
- Greene, A. S., P. J. Tonellato, Z. Zhang, J. H. Lombard and A. W. Cowley (1992). "Effect of microvascular rarefaction on tissue oxygen delivery in hypertension." Am J Physiol **262**(5 Pt 2): H1486-1493.
- Gupta, S., A. Agarwal and R. K. Sharma (2005). "The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia." Obstet Gynecol Surv **60**(12): 807-816.
- Hack, M. (2006). "Young adult outcomes of very-low-birth-weight children." Semin Fetal Neonatal Med **11**(2): 127-137.
- Hales, C. N. and S. E. Ozanne (2003). "The dangerous road of catch-up growth." J Physiol **547**(Pt 1): 5-10.
- Halliwell, B. (1993). "The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system." Haemostasis **23 Suppl 1**: 118-126.
- Halloran, B. G. and B. T. Baxter (1995). "Pathogenesis of aneurysms." Semin Vasc Surg **8**(2): 85-92.
- Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi and S. J. Elledge (1993). "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." Cell **75**(4): 805-816.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res **25**: 585-621.
- Heagerty, A. M., C. Aalkjaer, S. J. Bund, N. Korsgaard and M. J. Mulvany (1993). "Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth." Hypertension **21**(4): 391-397.
- Heitzer, T., H. Just and T. Münzel (1996). "Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers." Circulation **94**(1): 6-9.
- Hellström, A., A. L. Hård, A. Niklasson, E. Svensson and B. Jacobsson (1998). "Abnormal retinal vascularisation in preterm children as a general vascular phenomenon." Lancet **352**(9143): 1827.
- Hornebeck, W., H. Emonard, J. C. Monboisse and G. Bellon (2002). "Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression." Semin Cancer Biol **12**(3): 231-241.

- Ingram, D. A., L. E. Mead, H. Tanaka, V. Meade, A. Fenoglio, K. Mortell, K. Pollok, M. J. Ferkowicz, D. Gilley and M. C. Yoder (2004). "Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood." Blood **104**(9): 2752-2760.
- Irving, R. J., N. R. Belton, R. A. Elton and B. R. Walker (2000). "Adult cardiovascular risk factors in premature babies." Lancet **355**(9221): 2135-2136.
- Itahana, K., J. Campisi and G. P. Dimri (2007). "Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay." Methods Mol Biol **371**: 21-31.
- Itahana, K., Y. Zou, Y. Itahana, J. L. Martinez, C. Beausejour, J. J. Jacobs, M. Van Lohuizen, V. Band, J. Campisi and G. P. Dimri (2003). "Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1." Mol Cell Biol **23**(1): 389-401.
- Iwabuchi, K., P. L. Bartel, B. Li, R. Marraccino and S. Fields (1994). "Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(13): 6098-6102.
- Iwabuchi, K., B. Li, H. F. Massa, B. J. Trask, T. Date and S. Fields (1998). "Stimulation of p53-mediated transcriptional activation by the p53-binding proteins, 53BP1 and 53BP2." J Biol Chem **273**(40): 26061-26068.
- Iwasa, H., J. Han and F. Ishikawa (2003). "Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway." Genes Cells **8**(2): 131-144.
- Jacob, M. P. (2003). "Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions." Biomed Pharmacother **57**(5-6): 195-202.
- Jacob, M. P. (2006). "[Extracellular matrix and vascular ageing]." Med Sci (Paris) **22**(3): 273-278.
- Jiang, C. F. and A. P. Avolio (1997). "Characterisation of structural changes in the arterial elastic matrix by a new fractal feature: directional fractal curve." Med Biol Eng Comput **35**(3): 246-252.
- Joannides, R., W. E. Haefeli, L. Linder, V. Richard, E. H. Bakkali, C. Thuillez and T. F. Lüscher (1995). "Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo." Circulation **91**(5): 1314-1319.
- Jones, D. P. (2002). "Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance." Methods Enzymol **348**: 93-112.

- Jones, D. P. (2008). "Radical-free biology of oxidative stress." Am J Physiol Cell Physiol **295**(4): C849-868.
- Jones, D. P., J. L. Carlson, V. C. Mody, J. Cai, M. J. Lynn and P. Sternberg (2000). "Redox state of glutathione in human plasma." Free Radic Biol Med **28**(4): 625-635.
- Kafienah, W., D. Bromme, D. J. Buttle, L. J. Croucher and A. P. Hollander (1998). "Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix." Biochem J **331** ( Pt 3): 727-732.
- Kamb, A., N. A. Gruis, J. Weaver-Feldhaus, Q. Liu, K. Harshman, S. V. Tavtigian, E. Stockert, R. S. Day, 3rd, B. E. Johnson and M. H. Skolnick (1994). "A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types." Science **264**(5157): 436-440.
- Kastan, M. B., O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein and R. W. Craig (1991). "Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage." Cancer Res **51**(23 Pt 1): 6304-6311.
- Kastan, M. B., Q. Zhan, W. S. el-Deiry, F. Carrier, T. Jacks, W. V. Walsh, B. S. Plunkett, B. Vogelstein and A. J. Fornace, Jr. (1992). "A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia." Cell **71**(4): 587-597.
- Kelley, R. O., J. A. Trotter, L. F. Marek, B. D. Perdue and C. B. Taylor (1980). "Variation in cytoskeletal assembly during spreading of progressively subcultivated human embryo fibroblasts (IMR-90)." Mech Ageing Dev **13**(2): 127-141.
- Kemp, M., Y. M. Go and D. P. Jones (2008). "Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology." Free Radic Biol Med **44**(6): 921-937.
- Kermack, W. O., A. G. McKendrick and P. L. McKinlay (1934). "Death-rates in Great Britain and Sweden: Expression of Specific Mortality Rates as Products of Two Factors, and some Consequences thereof." J Hyg (Lond) **34**(4): 433-457.
- Kielty, C. M., M. J. Sherratt and C. A. Shuttleworth (2002). "Elastic fibres." J Cell Sci **115**(Pt 14): 2817-2828.
- Kistner, A., G. Celsi, M. Vanpee and S. H. Jacobson (2000). "Increased blood pressure but normal renal function in adult women born preterm." Pediatr Nephrol **15**(3-4): 215-220.
- Kistner, A., L. Jacobson, S. H. Jacobson, E. Svensson and A. Hellstrom (2002). "Low gestational age associated with abnormal retinal vascularization and increased blood pressure in adult women." Pediatr Res **51**(6): 675-680.
- Kleiber, N., P. Chessex, T. Rouleau, A. M. Nuyt, M. Perreault and J. C. Lavoie (2010). "Neonatal exposure to oxidants induces later in life a metabolic response associated to a

phenotype of energy deficiency in an animal model of total parenteral nutrition." Pediatr Res **68**(3): 188-192.

Koonin, E. V., S. F. Altschul and P. Bork (1996). "BRCA1 protein products ... Functional motifs." Nat Genet **13**(3): 266-268.

Kress, M., E. May, R. Cassingena and P. May (1979). "Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum." J Virol **31**(2): 472-483.

Krishnamurthy, J., C. Torrice, M. R. Ramsey, G. I. Kovalev, K. Al-Regaiey, L. Su and N. E. Sharpless (2004). "Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging." J Clin Invest **114**(9): 1299-1307.

Kuerbitz, S. J., B. S. Plunkett, W. V. Walsh and M. B. Kastan (1992). "Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7491-7495.

Kuster, A., I. Tea, V. Ferchaud-Roucher, S. Le Borgne, C. Plouzenec, N. Winer, J. C. Roze, R. J. Robins and D. Darmaun (2011). "Cord blood glutathione depletion in preterm infants: correlation with maternal cysteine depletion." PLoS One **6**(11): e27626.

Lachapelle, P., O. Dembinska, L. M. Rojas, J. Benoit, G. Almazan and S. Chemtob (1999). "Persistent functional and structural retinal anomalies in newborn rats exposed to hyperoxia." Can J Physiol Pharmacol **77**(1): 48-55.

Lai, T. T. and C. F. Bearer (2008). "Iatrogenic environmental hazards in the neonatal intensive care unit." Clin Perinatol **35**(1): 163-181, ix.

Lakatta, E. and D. Levy (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease." Circulation **107**(1): 139-146.

Lakatta, E. G. (2002). "Age-associated cardiovascular changes in health: impact on cardiovascular disease in older persons." Heart Fail Rev **7**(1): 29-49.

Lakatta, E. G., J. H. Mitchell, A. Pomerance and G. G. Rowe (1987). "Human aging: changes in structure and function." J Am Coll Cardiol **10**(2 Suppl A): 42A-47A.

Lane, D. P. and L. V. Crawford (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." Nature **278**(5701): 261-263.

Laurent, S., P. Boutouyrie and P. Lacolley (2005). "Structural and genetic bases of arterial stiffness." Hypertension **45**(6): 1050-1055.

- Lavoie, J. C., S. Belanger, M. Spalinger and P. Chessex (1997). "Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: the major contributor to in vitro generation of peroxides." Pediatrics **99**(3): E6.
- Lavoie, J. C. and P. Chessex (1997). "Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues." Free Radic Biol Med **23**(4): 648-657.
- le Noble, F. A., F. R. Stassen, W. J. Hacking and H. A. Struijker Boudier (1998). "Angiogenesis and hypertension." J Hypertens **16**(11): 1563-1572.
- le Noble, J. L., G. J. Tangelder, D. W. Slaaf, H. van Essen, R. S. Reneman and H. A. Struyker-Boudier (1990). "A functional morphometric study of the cremaster muscle microcirculation in young spontaneously hypertensive rats." J Hypertens **8**(8): 741-748.
- Lee, B. Y., J. A. Han, J. S. Im, A. Morrone, K. Johung, E. C. Goodwin, W. J. Kleijer, D. DiMaio and E. S. Hwang (2006). "Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase." Aging Cell **5**(2): 187-195.
- Leeson, C. P., M. Kattenhorn, R. Morley, A. Lucas and J. E. Deanfield (2001). "Impact of low birth weight and cardiovascular risk factors on endothelial function in early adult life." Circulation **103**(9): 1264-1268.
- Lefebvre, F., J. Glorieux and T. St-Laurent-Gagnon (1996). "Neonatal survival and disability rate at age 18 months for infants born between 23 and 28 weeks of gestation." Am J Obstet Gynecol **174**(3): 833-838.
- Lehmann, E. D., K. D. Hopkins and R. G. Gosling (1996). "Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement." Hypertension **27**(5): 1188-1191.
- Levy, E., S. Brunet, F. Alvarez, E. Seidman, G. Bouchard, E. Escobar and S. Martin (2007). "Abnormal hepatobiliary and circulating lipid metabolism in the Long-Evans Cinnamon rat model of Wilson's disease." Life Sci **80**(16): 1472-1483.
- Lewis, J. L., W. Chinswangwatanakul, B. Zheng, S. B. Marley, D. X. Nguyen, N. C. Cross, L. Banerji, J. Glassford, N. S. Thomas, J. M. Goldman, E. W. Lam and M. Y. Gordon (2001). "The influence of INK4 proteins on growth and self-renewal kinetics of hematopoietic progenitor cells." Blood **97**(9): 2604-2610.
- Lewis, R. M., A. J. Forhead, C. J. Petry, S. E. Ozanne and C. N. Hales (2002). "Long-term programming of blood pressure by maternal dietary iron restriction in the rat." Br J Nutr **88**(3): 283-290.
- Liao, D., D. K. Arnett, H. A. Tyroler, W. A. Riley, L. E. Chambless, M. Szklo and G. Heiss (1999). "Arterial stiffness and the development of hypertension. The ARIC study." Hypertension **34**(2): 201-206.

- Ligi, I., I. Grandvuillemin, V. Andres, F. Dignat-George and U. Simeoni (2010). "Low birth weight infants and the developmental programming of hypertension: a focus on vascular factors." Semin Perinatol **34**(3): 188-192.
- Linzer, D. I. and A. J. Levine (1979). "Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells." Cell **17**(1): 43-52.
- Lombard, D. B., K. F. Chua, R. Mostoslavsky, S. Franco, M. Gostissa and F. W. Alt (2005). "DNA repair, genome stability, and aging." Cell **120**(4): 497-512.
- London, G. M., S. J. Marchais, A. P. Guerin and B. Pannier (2004). "Arterial stiffness: pathophysiology and clinical impact." Clin Exp Hypertens **26**(7-8): 689-699.
- Looker, T. and C. L. Berry (1972). "The growth and development of the rat aorta. II. Changes in nucleic acid and scleroprotein content." J Anat **113**(Pt 1): 17-34.
- Lopez, E., O. Boucherat, M. L. Franco-Montoya, J. R. Bourbon, C. Delacourt and P. H. Jarreau (2006). "Nitric oxide donor restores lung growth factor and receptor expression in hypoxia-exposed rat pups." Am J Respir Cell Mol Biol **34**(6): 738-745.
- Lucas, A. (1991). "Programming by early nutrition in man." Ciba Found Symp **156**: 38-50; discussion 50-35.
- Lurbe, E., M. I. Torro, E. Carvajal, V. Alvarez and J. Redón (2003). "Birth weight impacts on wave reflections in children and adolescents." Hypertension **41**(3 Pt 2): 646-650.
- Luyckx, V. A., C. A. Compston, T. Simmen and T. F. Mueller (2009). "Accelerated senescence in kidneys of low-birth-weight rats after catch-up growth." Am J Physiol Renal Physiol **297**(6): F1697-1705.
- Maquart, F. X., G. Bellon, S. Pasco and J. C. Monboisse (2005). "Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation." Biochimie **87**(3-4): 353-360.
- Martin, H., J. Hu, G. Gennser and M. Norman (2000). "Impaired endothelial function and increased carotid stiffness in 9-year-old children with low birthweight." Circulation **102**(22): 2739-2744.
- Martyn, C. N., D. J. Barker, S. Jespersen, S. Greenwald, C. Osmond and C. Berry (1995). "Growth in utero, adult blood pressure, and arterial compliance." Br Heart J **73**(2): 116-121.
- Martyn, C. N. and S. E. Greenwald (1997). "Impaired synthesis of elastin in walls of aorta and large conduit arteries during early development as an initiating event in pathogenesis of systemic hypertension." Lancet **350**(9082): 953-955.

Marín, J. (1995). "Age-related changes in vascular responses: a review." Mech Ageing Dev **79**(2-3): 71-114.

Masuda, H., C. Alev, H. Akimaru, R. Ito, T. Shizuno, M. Kobori, M. Horii, T. Ishihara, K. Isobe, M. Isozaki, J. Itoh, Y. Itoh, Y. Okada, B. A. McIntyre, S. Kato and T. Asahara (2011). "Methodological development of a clonogenic assay to determine endothelial progenitor cell potential." Circ Res **109**(1): 20-37.

Matheu, A., A. Maraver and M. Serrano (2008). "The Arf/p53 pathway in cancer and aging." Cancer Res **68**(15): 6031-6034.

Matthews, C., I. Gorenne, S. Scott, N. Figg, P. Kirkpatrick, A. Ritchie, M. Goddard and M. Bennett (2006). "Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress." Circ Res **99**(2): 156-164.

McEniery, C. M., C. E. Bolton, J. Fawke, E. Hennessy, J. Stocks, I. B. Wilkinson, J. R. Cockcroft and N. Marlow (2011). "Cardiovascular consequences of extreme prematurity: the EPICure study." J Hypertens **29**(7): 1367-1373.

Melero, J. A., D. T. Stitt, W. F. Mangel and R. B. Carroll (1979). "Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells." Virology **93**(2): 466-480.

Meng, A., Y. Wang, G. Van Zant and D. Zhou (2003). "Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells." Cancer Res **63**(17): 5414-5419.

Michalovitz, D., O. Halevy and M. Oren (1990). "Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53." Cell **62**(4): 671-680.

Michel, J. B., D. Heudes, O. Michel, P. Poitevin, M. Philippe, E. Scalbert, B. Corman and B. I. Levy (1994). "Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes. II. Large arteries." Am J Physiol **267**(1 Pt 2): R124-135.

Mikkola, K., J. Leipala, T. Boldt and V. Fellman (2007). "Fetal growth restriction in preterm infants and cardiovascular function at five years of age." J Pediatr **151**(5): 494-499, 499 e491-492.

Minamino, T. and I. Komuro (2002). "Role of telomere in endothelial dysfunction in atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **13**(5): 537-543.

Minamino, T., H. Miyauchi, T. Yoshida, Y. Ishida, H. Yoshida and I. Komuro (2002). "Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction." Circulation **105**(13): 1541-1544.



- Mitchell, P., G. Liew, E. Rohtchina, J. J. Wang, D. Robaei, N. Cheung and T. Y. Wong (2008). "Evidence of arteriolar narrowing in low-birth-weight children." Circulation **118**(5): 518-524.
- Mivelaz, Y., C. Zyzdorczyk, A. Barbier, A. Cloutier, J. C. Fouron, D. de Blois and A. M. Nuyt (2011). "Neonatal oxygen exposure leads to increased aortic wall stiffness in adult rats: a Doppler ultrasound study." Journal of Developmental Origins of Health and Disease **2**: 184-189.
- Miyashita, T. and J. C. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." Cell **80**(2): 293-299.
- Mohn, A., V. Chiavaroli, M. Cerruto, A. Blasetti, C. Giannini, T. Bucciarelli and F. Chiarelli (2007). "Increased oxidative stress in prepubertal children born small for gestational age." J Clin Endocrinol Metab **92**(4): 1372-1378.
- Mulvany, M. J. (1992). "A reduced elastic modulus of vascular wall components in hypertension?" Hypertension **20**(1): 7-9.
- Murphy, G. J., G. Murphy and J. J. Reynolds (1991). "The origin of matrix metalloproteinases and their familial relationships." FEBS Lett **289**(1): 4-7.
- Nadeau, L., M. Boivin, R. Tessier, F. Lefebvre and P. Robaey (2001). "Mediators of behavioral problems in 7-year-old children born after 24 to 28 weeks of gestation." J Dev Behav Pediatr **22**(1): 1-10.
- Nadeau, L., R. Tessier and A. Descoteaux (2009). "Observed behaviours of pre-term children in a social play situation with classroom peers." Dev Neurorehabil **12**(4): 201-206.
- Nadeau, L., R. Tessier, F. Lefebvre and P. Robaey (2004). "Victimization: a newly recognized outcome of prematurity." Dev Med Child Neurol **46**(8): 508-513.
- Nagasawa, H., S. A. Latt, M. E. Lalande and J. B. Little (1985). "Effects of X-irradiation on cell-cycle progression, induction of chromosomal aberrations and cell killing in ataxia telangiectasia (AT) fibroblasts." Mutat Res **148**(1-2): 71-82.
- Nagasawa, H. and J. B. Little (1983). "Comparison of kinetics of X-ray-induced cell killing in normal, ataxia telangiectasia and hereditary retinoblastoma fibroblasts." Mutat Res **109**(2): 297-308.
- Narita, M., S. Nunez, E. Heard, A. W. Lin, S. A. Hearn, D. L. Spector, G. J. Hannon and S. W. Lowe (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." Cell **113**(6): 703-716.
- Nehiri, T., J. P. Duong Van Huyen, M. Viltard, C. Fassot, D. Heudes, N. Freund, G. Deschenes, P. Houillier, P. Bruneval and M. Lelievre-Pegorier (2008). "Exposure to

maternal diabetes induces salt-sensitive hypertension and impairs renal function in adult rat offspring." Diabetes **57**(8): 2167-2175.

Nejjar, I., M. T. Pieraggi, J. C. Thiers and H. Bouissou (1990). "Age-related changes in the elastic tissue of the human thoracic aorta." Atherosclerosis **80**(3): 199-208.

Nijland, M. J., S. P. Ford and P. W. Nathanielsz (2008). "Prenatal origins of adult disease." Curr Opin Obstet Gynecol **20**(2): 132-138.

Noda, A., Y. Ning, S. F. Venable, O. M. Pereira-Smith and J. R. Smith (1994). "Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen." Exp Cell Res **211**(1): 90-98.

Noon, J. P., B. R. Walker, D. J. Webb, A. C. Shore, D. W. Holton, H. V. Edwards and G. C. Watt (1997). "Impaired microvascular dilatation and capillary rarefaction in young adults with a predisposition to high blood pressure." J Clin Invest **99**(8): 1873-1879.

Norman, M. (2008). "Low birth weight and the developing vascular tree: a systematic review." Acta Paediatr **97**(9): 1165-1172.

Nuyt, A. and M. Szyf (2007). "Developmental programming through epigenetic changes." Circ Res **100**(4): 452-455.

O'Donovan, D. J. and C. J. Fernandes (2004). "Free radicals and diseases in premature infants." Antioxid Redox Signal **6**(1): 169-176.

O'Rourke, M. F. (1971). "The arterial pulse in health and disease." Am Heart J **82**(5): 687-702.

O'Rourke, M. F. (1976). "Pulsatile arterial haemodynamics in hypertension." Aust N Z J Med **6 suppl 2**: 40-48.

O'Rourke, M. F. and G. Mancia (1999). "Arterial stiffness." J Hypertens **17**(1): 1-4.

O'Rourke, M. F., J. A. Staessen, C. Vlachopoulos, D. Duprez and G. E. Plante (2002). "Clinical applications of arterial stiffness; definitions and reference values." Am J Hypertens **15**(5): 426-444.

Ohtani, K., J. DeGregori and J. R. Nevins (1995). "Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12146-12150.

Ohtani, N., K. Yamakoshi, A. Takahashi and E. Hara (2004). "The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression." J Med Invest **51**(3-4): 146-153.

- Ojeda, N. B., D. Grigore and B. T. Alexander (2008). "Developmental programming of hypertension: insight from animal models of nutritional manipulation." Hypertension **52**(1): 44-50.
- Oren, A., L. E. Vos, W. J. Bos, M. E. Safar, C. S. Uiterwaal, W. H. Gorissen, D. E. Grobbee and M. L. Bots (2003). "Gestational age and birth weight in relation to aortic stiffness in healthy young adults: two separate mechanisms?" Am J Hypertens **16**(1): 76-79.
- Owens, G. K. (1995). "Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells." Physiol Rev **75**(3): 487-517.
- Owens, G. K., M. S. Kumar and B. R. Wamhoff (2004). "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease." Physiol Rev **84**(3): 767-801.
- Ozanne, S. E. (2009). "The long term effects of early postnatal diet on adult health." Adv Exp Med Biol **639**: 135-144.
- Ozanne, S. E. and C. N. Hales (2004). "Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice." Nature **427**(6973): 411-412.
- Ozanne, S. E. and C. Nicholas Hales (2005). "Poor fetal growth followed by rapid postnatal catch-up growth leads to premature death." Mech Ageing Dev **126**(8): 852-854.
- Park, I. K., S. J. Morrison and M. F. Clarke (2004). "Bmi1, stem cells, and senescence regulation." J Clin Invest **113**(2): 175-179.
- Parrinello, S., E. Samper, A. Krtolica, J. Goldstein, S. Melov and J. Campisi (2003). "Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts." Nat Cell Biol **5**(8): 741-747.
- Peynet, J., J. L. Beaudoux and A. Legrand (2005). Stress oxydant et athérosclérose. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. T. D. Lavoiser.
- Pladys, P., F. Sennlaub, S. Brault, D. Checchin, I. Lahaie, N. L. Lê, K. Bibeau, G. Cambonie, D. Abran, M. Brochu, G. Thibault, P. Hardy, S. Chemtob and A. M. Nuyt (2005). "Microvascular rarefaction and decreased angiogenesis in rats with fetal programming of hypertension associated with exposure to a low-protein diet in utero." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **289**(6): R1580-1588.
- Plagemann, A., T. Harder, K. Schellong, S. Schulz and J. H. Stupin (2012). "Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **26**(5): 641-653.
- Powell, J. T., N. Vine and M. Crossman (1992). "On the accumulation of D-aspartate in elastin and other proteins of the ageing aorta." Atherosclerosis **97**(2-3): 201-208.

- Pyke, K. E. and M. E. Tschakovsky (2005). "The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function." J Physiol **568**(Pt 2): 357-369.
- Rao, R., J. Miano, E. Olson and C. Seidel (1997). "The A10 cell line: a model for neonatal, neointimal, or differentiated vascular smooth muscle cells?" Cardiovasc Res **36**(1): 118-126.
- Rebbaa, A., X. Zheng, P. M. Chou and B. L. Mirkin (2003). "Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence." Oncogene **22**(18): 2805-2811.
- Redheuil, A., W. C. Yu, C. O. Wu, E. Mousseaux, A. de Cesare, R. Yan, N. Kachenoura, D. Bluemke and J. A. Lima (2010). "Reduced ascending aortic strain and distensibility: earliest manifestations of vascular aging in humans." Hypertension **55**(2): 319-326.
- Robles, S. J. and G. R. Adami (1998). "Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts." Oncogene **16**(9): 1113-1123.
- Rodriguez-Menocal, L., S. M. Pham, D. Mateu, M. St-Pierre, Y. Wei, I. Pestana, A. Aitouche and R. I. Vazquez-Padron (2010). "Aging increases p16 INK4a expression in vascular smooth-muscle cells." Biosci Rep **30**(1): 11-18.
- Roghair, R. D. and G. Aldape (2007). "Naturally occurring perinatal growth restriction in mice programs cardiovascular and endocrine function in a sex- and strain-dependent manner." Pediatr Res **62**(4): 399-404.
- Rossi, P., L. Tauzin, E. Marchand, U. Simeoni and Y. Francès (2006). "[Arterial blood pressure and arterial stiffness in adolescents are related to gestational age]." Arch Mal Coeur Vaiss **99**(7-8): 748-751.
- Roy, S., S. Khanna, A. A. Bickerstaff, S. V. Subramanian, M. Atalay, M. Bierl, S. Pendyala, D. Levy, N. Sharma, M. Venojarvi, A. Strauch, C. G. Orosz and C. K. Sen (2003). "Oxygen sensing by primary cardiac fibroblasts: a key role of p21(Waf1/Cip1/Sdi1)." Circ Res **92**(3): 264-271.
- Sage, J., A. L. Miller, P. A. Pérez-Mancera, J. M. Wysocki and T. Jacks (2003). "Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry." Nature **424**(6945): 223-228.
- Saik, L. A., H. L. Hsieh, W. H. Baricos and E. Shapira (1982). "Enzymatic and immunologic quantitation of erythrocyte superoxide dismutase in adults and in neonates of different gestational ages." Pediatr Res **16**(11): 933-937.
- Saltzman, H. A. and I. Fridovich (1973). "Editorial: Oxygen toxicity. Introduction to a protective enzyme: superoxide dismutase." Circulation **48**(5): 921-923.

- Samuelsson, A. M., P. A. Matthews, M. Argenton, M. R. Christie, J. M. McConnell, E. H. Jansen, A. H. Piersma, S. E. Ozanne, D. F. Twinn, C. Remacle, A. Rowlerson, L. Poston and P. D. Taylor (2008). "Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming." Hypertension **51**(2): 383-392.
- Sandor, G. G., T. Hishitani, R. E. Petty, M. T. Potts, A. Desouza, E. Desouza and J. E. Potts (2003). "A novel Doppler echocardiographic method of measuring the biophysical properties of the aorta in pediatric patients." J Am Soc Echocardiogr **16**(7): 745-750.
- Saugstad, O. D. (2005). "Oxidative stress in the newborn--a 30-year perspective." Biol Neonate **88**(3): 228-236.
- Schafer, F. Q. and G. R. Buettner (2001). "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple." Free Radic Biol Med **30**(11): 1191-1212.
- Schlatmann, T. J. and A. E. Becker (1977). "Pathogenesis of dissecting aneurysm of aorta. Comparative histopathologic study of significance of medial changes." Am J Cardiol **39**(1): 21-26.
- Schneider, E. L. and Y. Mitsui (1976). "The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(10): 3584-3588.
- Schultz, L. B., N. H. Chehab, A. Malikzay and T. D. Halazonetis (2000). "p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks." J Cell Biol **151**(7): 1381-1390.
- Schumacher, B., G. A. Garinis and J. H. Hoeijmakers (2008). "Age to survive: DNA damage and aging." Trends Genet **24**(2): 77-85.
- Schwartz, S. M., G. R. Campbell and J. H. Campbell (1986). "Replication of smooth muscle cells in vascular disease." Circ Res **58**(4): 427-444.
- Sedelnikova, O. A., I. Horikawa, D. B. Zimonjic, N. C. Popescu, W. M. Bonner and J. C. Barrett (2004). "Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks." Nat Cell Biol **6**(2): 168-170.
- Seluanov, A., V. Gorbunova, A. Falcovitz, A. Sigal, M. Milyavsky, I. Zurer, G. Shohat, N. Goldfinger and V. Rotter (2001). "Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53." Mol Cell Biol **21**(5): 1552-1564.
- Senior, R. M., G. L. Griffin, C. J. Fliszar, S. D. Shapiro, G. I. Goldberg and H. G. Welgus (1991). "Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases." J Biol Chem **266**(12): 7870-7875.

- Severino, J., R. G. Allen, S. Balin, A. Balin and V. J. Cristofalo (2000). "Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo?" Exp Cell Res **257**(1): 162-171.
- Shay, J. W., O. M. Pereira-Smith and W. E. Wright (1991). "A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence." Exp Cell Res **196**(1): 33-39.
- Sies, H. (1991). "Role of reactive oxygen species in biological processes." Klin Wochenschr **69**(21-23): 965-968.
- Siewert-Delle, A. and S. Ljungman (1998). "The impact of birth weight and gestational age on blood pressure in adult life: a population-based study of 49-year-old men." Am J Hypertens **11**(8 Pt 1): 946-953.
- Silver, F. H., D. L. Christiansen and C. M. Buntin (1989). "Mechanical properties of the aorta: a review." Crit Rev Biomed Eng **17**(4): 323-358.
- Sitte, N., K. Merker, T. Von Zglinicki, K. J. Davies and T. Grune (2000). "Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II-aging of nondividing cells." FASEB J **14**(15): 2503-2510.
- Sitte, N., K. Merker, T. Von Zglinicki, T. Grune and K. J. Davies (2000). "Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I-effects of proliferative senescence." FASEB J **14**(15): 2495-2502.
- Spina, M., S. Garbisa, J. Hinnie, J. C. Hunter and A. Serafini-Fracassini (1983). "Age-related changes in composition and mechanical properties of the tunica media of the upper thoracic human aorta." Arteriosclerosis **3**(1): 64-76.
- Stein, G. H., M. Beeson and L. Gordon (1990). "Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts." Science **249**(4969): 666-669.
- Sukhova, G. K., G. P. Shi, D. I. Simon, H. A. Chapman and P. Libby (1998). "Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells." J Clin Invest **102**(3): 576-583.
- Sun, L. Q., D. W. Lee, Q. Zhang, W. Xiao, E. H. Raabe, A. Meeker, D. Miao, D. L. Huso and R. J. Arceci (2004). "Growth retardation and premature aging phenotypes in mice with disruption of the SNF2-like gene, PASG." Genes Dev **18**(9): 1035-1046.
- System., C. P. S. (2003). Canadian Perinatal Health Report. Ottawa, Ontario, Health Canada.
- Tauzin, L., F. Risso, C. Buffat, G. Serra and U. Simeoni (2005). "Vascular mechanisms in the developmental programming of cardio-vascular disease." Pediatria Medica e Chirurgica **27**(5): 18-23.

Tauzin, L., P. Rossi, B. Giusano, J. Gaudart, A. Boussuges, A. Fraisse and U. Simeoni (2006). "Characteristics of arterial stiffness in very low birth weight premature infants." Pediatr Res **60**(5): 592-596.

Tezuka, K., Y. Tezuka, A. Maejima, T. Sato, K. Nemoto, H. Kamioka, Y. Hakeda and M. Kumegawa (1994). "Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts." J Biol Chem **269**(2): 1106-1109.

Thibeault, D. (2000). "The precarious antioxidant defenses of the preterm infant." Am J Perinatol **17**(4): 167-181.

Tyner, S. D., S. Venkatachalam, J. Choi, S. Jones, N. Ghebranious, H. Igelmann, X. Lu, G. Soron, B. Cooper, C. Brayton, S. H. Park, T. Thompson, G. Karsenty, A. Bradley and L. A. Donehower (2002). "p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes." Nature **415**(6867): 45-53.

van der Heijden-Spek, J. J., J. A. Staessen, R. H. Fagard, A. P. Hoeks, H. A. Boudier and L. M. van Bortel (2000). "Effect of age on brachial artery wall properties differs from the aorta and is gender dependent: a population study." Hypertension **35**(2): 637-642.

Veit, G., B. Kobbe, D. R. Keene, M. Paulsson, M. Koch and R. Wagener (2006). "Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain." J Biol Chem **281**(6): 3494-3504.

Vlachopoulos, C., K. Aznaouridis and C. Stefanadis (2010). "Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis." J Am Coll Cardiol **55**(13): 1318-1327.

Vousden, K. H. and C. Prives (2009). "Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53." Cell **137**(3): 413-431.

Wadsworth, M. E., H. A. Cripps, R. E. Midwinter and J. R. Colley (1985). "Blood pressure in a national birth cohort at the age of 36 related to social and familial factors, smoking, and body mass." Br Med J (Clin Res Ed) **291**(6508): 1534-1538.

Wahl, G. M. and A. M. Carr (2001). "The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53." Nat Cell Biol **3**(12): E277-286.

Wallace, D. C. (2005). "A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine." Annu Rev Genet **39**: 359-407.

Watts, S. W., C. Rondelli, K. Thakali, X. Li, B. Uhal, M. H. Pervaiz, R. E. Watson and G. D. Fink (2007). "Morphological and biochemical characterization of remodeling in aorta and vena cava of DOCA-salt hypertensive rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(5): H2438-2448.

Wei, W., U. Herbig, S. Wei, A. Dutriaux and J. M. Sedivy (2003). "Loss of retinoblastoma but not p16 function allows bypass of replicative senescence in human fibroblasts." EMBO Rep **4**(11): 1061-1066.

Woods, J. R., Jr. (2001). "Reactive oxygen species and preterm premature rupture of membranes-a review." Placenta **22 Suppl A**: S38-44.

Xia, Z., J. C. Morales, W. G. Dunphy and P. B. Carpenter (2001). "Negative cell cycle regulation and DNA damage-inducible phosphorylation of the BRCT protein 53BP1." J Biol Chem **276**(4): 2708-2718.

Yam, J., L. Frank and R. J. Roberts (1978). "Oxygen toxicity: comparison of lung biochemical responses in neonatal and adult rats." Pediatr Res **12**(2): 115-119.

Yang, N. C. and M. L. Hu (2005). "The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells." Exp Gerontol **40**(10): 813-819.

Yasmin, C. M. McEniery, S. Wallace, Z. Dakham, P. Pulsalkar, P. Pusalkar, K. Maki-Petaja, M. J. Ashby, J. R. Cockcroft and I. B. Wilkinson (2005). "Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(2): 372.

Yzydorczyk, C., B. Comte, G. Cambonie, J. Lavoie, N. Germain, Y. Ting Shun, J. Wolff, C. Deschepper, R. Touyz, M. Lelièvre-Pegorier and A. Nuyt (2008). "Neonatal oxygen exposure in rats leads to cardiovascular and renal alterations in adulthood." Hypertension **52**(5): 889-895.

Yzydorczyk, C., B. Comte, F. Huyard, A. Cloutier, N. Germain, M. Bertagnolli and A. M. Nuyt (2013). "Developmental programming of eNOS uncoupling and enhanced vascular oxidative stress in adult rats after transient neonatal oxygen exposure." J Cardiovasc Pharmacol **61**(1): 8-16.

Yzydorczyk, C. C., B; Germain, N; Cloutier, A; Rouleau, T; Lévy, E; Moreau, A; Nuyt, A.M. (2009). "Neonatal oxygen exposure in rats is associated with impaired glucose tolerance in adult life " Pediatr Res(5508): 155.

Zhang, H. S., A. A. Postigo and D. C. Dean (1999). "Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition." Cell **97**(1): 53-61.

Zicha, J. and J. Kunes (1999). "Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat." Physiol Rev **79**(4): 1227-1282.