

Université de Montréal

**RÔLE DU STRESS OXYDANT EN PÉRIODE NÉONATALE
DANS L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE ET LA
DYSFONCTION VASCULAIRE ET MÉTABOLIQUE DE
L'ADULTE**

par

Catherine Yzydorczyk

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de PhD

en Sciences Biomédicales

janvier 2011

© Catherine Yzydorczyk, 2011.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**RÔLE DU STRESS OXYDANT EN PÉRIODE NÉONATALE DANS
L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE ET LA DYSFONCTION VASCULAIRE ET
MÉTABOLIQUE DE L'ADULTE**

Présentée par :

Catherine Yzydorczyk

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Présidente: Pr Marie Piat d'Ortho (Université Denis Diderot - Paris 7)

Membres: Dr André Mazur (Université d'Auvergne) Evalueur

Pr Régean Couture (Université de Montréal) Evalueur

Dre Blandine Comte (Université d'Auvergne) Co-directrice

Pr Anne Monique Nuyt (Université de Montréal) Co-directrice

RÉSUMÉ

Introduction

De nombreuses études indiquent que la prématurité, qui représente 8 % des naissances, est associée à des indices précoces de dysfonction vasculaire, d'élévation de la pression sanguine et de survenue de diabète de type 2. Les enfants nés prématurément sont plus sujets aux blessures oxydatives de par l'immaturation de leurs défenses antioxydantes et de leur exposition à des situations pro-oxydantes (exposition à l'air ambiant, à un supplément d'oxygène, ou à une exposition aux infections). Cependant, les conséquences à long terme des blessures oxydatives induites par une exposition à l'oxygène en période périnatale restent méconnues. Le but de ce doctorat a été de mettre en évidence certains mécanismes pouvant relier les dommages de la prématurité induits par l'oxygène, et le risque à long terme de développer des maladies cardiovasculaires et métaboliques dans le concept global d'une programmation développementale de l'hypertension et des pathologies liées au syndrome métabolique.

Matériels et méthodes

Des rats Sprague-Dawley (SD) ont été exposés à 80 % O₂ (O₂) vs air ambiant (AA) du 3^{ème} au 10^{ème} jour de vie. **Concernant les paramètres cardiovasculaires**, nous avons mesuré au cours de la croissance, la pression sanguine à la queue (de la 4^{ème} semaine à la 15^{ème} semaine) et à l'âge adulte : la réactivité vasculaire à l'angiotensine II (AngII) et au carbachol (*ex vivo*, carotides) avec ou sans le tempol; la production d'oxyde nitrique (NO) en présence ou non L-arginine et de L-sépiaptérine (aorte, immunohistochimie) ainsi que l'expression de la nitric oxyde synthase endothéliale (eNOS) (aorte, immunohistochimie et

western blot); le stress oxydant vasculaire (aorte, chemiluminescence) par la mesure de la production d'anions superoxide en présence ou non des inhibiteurs de la nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADPH oxydase) et de la nitric oxyde synthase endotheliale (eNOS), l'apocynine, et *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) respectivement, ainsi que le stress oxydant circulant par la mesure des niveaux plasmatiques de malondialdéhyde (MDA, HPLC); la densité microvasculaire a été évaluée au niveau du muscle tibial antérieur, immunohistochimie); la vitesse d'onde pulsée (VOP) (entre la valve aortique et juste avant la bifurcation ilio-fémorale) a été mesurée par ultrason; le nombre de néphrons a été compté par digestion acide. L'ontogenèse de la plupart de ces mécanismes a été regardée à l'âge de 4 semaines.

Concernant les paramètres métaboliques, le poids a été mesuré au cours de la croissance. À l'âge adulte, la composition corporelle et la tolérance au glucose ont été évaluées.

Résultats

À l'âge de 4 semaines, aucune différence n'a été observée dans la pression sanguine, la réactivité vasculaire et le stress oxydant, mais chez les rats O₂ vs AA, la densité microvasculaire est moindre, et des changements histologiques suggèrent la présence d'une rigidité artérielle augmentée.

À l'âge adulte chez les rats O₂ vs AA (n = 6-8 /groupe) : **i)** les pressions sanguines systoliques et diastoliques sont augmentées; **ii)** la réactivité vasculaire à l'AngII est augmentée et celle au carbachol est diminuée, le tempol prévient ces dysfonctions; **iii)** la production de NO est plus faible au niveau basal et après stimulation par le carbachol, mais est restaurée après la pré-incubation avec L-arginine et L-sépiaptérine; **iv)** l'expression d'eNOS est diminuée par immunohistochimie et augmentée par western blot; **v)** les niveaux

d'anions superoxide, au niveau basal et en réponse à l'AngII, sont augmentés et sont induits par la NADPH oxydase et le non-couplage d'eNOS; **vi)** les niveaux plasmatiques de MDA sont augmentés; **vii)** La densité microvasculaire est moindre; **viii)** la VOP est augmentée; **ix)** le nombre de néphrons par rein est réduit; **x)** le poids est plus faible au cours de la croissance et un catch up est observé à l'âge adulte; la composition corporelle n'est pas différente entre les groupes; **xi)** la tolérance au glucose est diminuée.

Conclusion

Ces résultats supportent l'hypothèse d'une programmation développementale des maladies cardiovasculaires et métaboliques à l'âge adulte à la suite d'un stress hyperoxique néonatal.

Mots clés : Hypertension, réactivité vasculaire, stress oxydant, intolérance au glucose, résistance à l'insuline, syndrome métabolique.

ABSTRACT

Introduction

Many studies showed that prematurity, which represents 8 % of birth, is associated with early indices of vascular dysfunction, increased blood pressure and Type 2 diabetes. Prematurity babies are more susceptible to oxidative injury, consequence of the immaturity of their antioxidant defences, and exposure to pro-oxidant situations (oxygen supplementation, infection). However, the long-term consequences of oxidative injury induced by oxygen exposure in the neonatal period are unknown.

The aim of these PhD studies was to unravel some mechanisms that might underlie the damage induced by oxygen and the long-term risk of developing vascular and metabolic diseases in the overall concept of developmental programming of hypertension and metabolic syndrome-related diseases.

Materials and methods

Sprague-Dawley pups were kept with their mother in 80 % O₂ (O₂) or room air (RA) from day 3 to 10 of life. **Cardiovascular parameters**, tail blood pressure was measured between 4 and 15 weeks of life. In adulthood : vascular reactivity (*ex vivo* carotid rings) to angiotensine II (AngII) and carbachol with and without tempol was studied; studies of nitric oxide (NO) production with and without L-arginine and L-sépiaptérine (aorta, immunohistochemistry) and endothelial nitric oxide synthase expression (eNOS; aorta, immunohistochemistry, western blot) were performed; vascular oxidative stress (aorta, using chemiluminescence) by measuring superoxide anion production with and without inhibitors of nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADPH oxydase) and nitric

oxyde synthase endotheliale (eNOS), apocynin and N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) respectively, and circulating oxidative stress by measuring the plasma levels of malondialdéhyde (MDA, HPLC) were evaluated; microvascular density was assessed on tibialis anterior muscle sections; pulse wave velocity (PWV) was measured by ultrasound, between aortic valve and ilio-femoral bifurcation; nephrons were counted after hydrochloric acid digestion. The main observations were also evaluated at 4 weeks of age. **Metabolic parameters:** body weight has been measured during the growth. In adulthood, body composition, glucose tolerance were evaluated.

Results

A 4 weeks of age, no difference was observed regarding blood pressure, vascular reactivity, and oxidative stress indices, but in rats O₂ vs. RA (n = 6-8 /group), microvascular rarefaction and histological changes suggesting enhanced vascular stiffness were present.

To adulthood, rats O₂ vs. RA (n = 6-8/group) : **i)** systolic and diastolic blood pressures are increased; **ii)** vascular reactivity to Ang II is increased and to carbachol is decreased, these dysfunction were totally abolished by co-incubation of the vessel rings with tempol; **iii)** NO-production is decreased in basal condition and after carbachol stimulation, but is restored after pre-incubation of aorta sections with L- arginine and L-sépiaptérine; **iv)** eNOS expression is decreased by immunohistochemistry but increased by western blot; **v)** vascular superoxide anion levels are increased in basal condition, after AngII stimulation and this is mediated by NADPH oxydase and eNOS uncoupling; **vi)** the plasma levels of MDA are increased; **vii)** microvascular density is decreased; **viii)** PWV is increased; **ix)** nephron count per kidney is decreased; **x)** body weight is less during growth, but a catch up

is observed in adulthood, body composition is similar; **xi)** the glucose tolerance is decreased in adults.

Conclusion

These results support the hypothesis of developmental programming of vascular and metabolic diseases in adulthood, after exposure to hyperoxic stress in the neonatal period.

Key words: Hypertension, vascular reactivity, oxidative stress, glucose intolerance, insulin resistance, metabolic syndrome.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-------|
| RÉSUMÉ | iii |
| ABSTRACT | vi |
| TABLE DES MATIÈRES | ix |
| LISTE DES TABLEAUX..... | xvi |
| LISTE DES ABREVIATIONS..... | xviii |
| REMERCIEMENTS | xxii |
| I - INTRODUCTION..... | 1 |
| I - A LES ORIGINES DÉVELOPPEMENTALES DES MALADIES SURVENANT À L'ÂGE ADULTE..... | 2 |
| I - A-1 HISTORIQUE..... | 5 |
| I - A-2 ÉVIDENCES ÉPIDÉMIOLOGIQUES DU LIEN ENTRE LE POIDS DE NAISSANCE ET LES PATHOLOGIES CHEZ L'ADULTE..... | 7 |
| I - A-2-1 Poids de naissance, âge gestationnel et prématurité | 7 |
| I - A-2-2 Poids de naissance et pathologies cardiovasculaires..... | 8 |
| I - A-2-3 Poids de naissance, rattrapage de croissance et pression sanguine..... | 9 |
| I - A-2-4 Poids de naissance, rattrapage de croissance et diabète de type 2/syndrome métabolique | 11 |
| I - B HYPOTHÈSES ET MÉCANISMES | 14 |
| I - B-1 DU THRIFTY GÉNOTYPE A LA PLASTICITÉ DÉVELOPPEMENTALE | 14 |
| I - B-1-1 Interaction gène-environnement: le thrifty génotype (génotype d'épargne) | 15 |
| I - B-1-2 Le thrifty phénotype (phénotype d'épargne)..... | 16 |
| I - B-1-3 Programming | 17 |
| I - B-1-4 Empreinte métabolique..... | 18 |
| I - B-1-5 Controverses et plasticité développementale..... | 18 |
| I - B-2 MÉCANISMES | 19 |
| I - B-2-1 Nutrition..... | 19 |
| I - B-2-1-1 Études animales..... | 19 |

| | | |
|---------------|--|----|
| I - B-2-1-1-1 | Restriction en protéines et calories | 19 |
| I - B-2-1-1-2 | Régime riche en acides gras..... | 21 |
| I - B-2-1-1-3 | Micronutriments | 21 |
| I - B-2-1-2 | Études humaines | 22 |
| I - B-2-1-2-1 | Macronutriments..... | 23 |
| I - B-2-1-2-2 | Micronutriments | 24 |
| I - B-2-1-2-3 | Importance du lait maternel | 26 |
| I - B-2-1-2-4 | Alimentation artificielle..... | 28 |
| I - B-2-2 | Les glucocorticoïdes | 29 |
| I - B-2-2-1 | Études animales..... | 29 |
| I - B-2-2-2 | Études humaines | 32 |
| I - B-2-3 | Modulations rénales..... | 35 |
| I - B-2-3-1 | Études animales..... | 35 |
| I - B-2-3-2 | Études humaines | 37 |
| I - B-2-3-3 | Changements dans le nombre de néphrons et pression sanguine..... | 38 |
| I - B-2-4 | Le système rénine angiotensine | 39 |
| I - B-2-4-1 | Études animales..... | 39 |
| I - B-2-4-2 | Études humaines | 40 |
| I - B-2-5 | Insuffisance placentaire | 41 |
| I - B-2-5-1 | Études animales..... | 41 |
| I - B-2-5-2 | Études humaines | 43 |
| I - B-2-6 | Système nerveux sympathique..... | 45 |
| I - B-2-6-1 | Études animales..... | 45 |
| I - B-2-6-2 | Études humaines | 45 |
| I - B-2-7 | Hormones sexuelles | 46 |
| I - B-2-7-1 | Études animales..... | 46 |
| I - B-2-7-2 | Études humaines | 47 |
| I - B-2-8 | Facteurs épigénétiques..... | 49 |
| I - B-2-8-1 | Définition | 50 |
| I - B-2-8-2 | Facteurs influençant la méthylation | 50 |
| I - B-2-8-3 | Altération de la méthylation..... | 51 |

| | | |
|-----------------|---|----|
| I - B-2-8-4 | Effet transgénérationnel | 53 |
| I - B-2-9 | Stress oxydant | 54 |
| I - B-2-9-1 | Définition du stress oxydant..... | 54 |
| I - B-2-9-2 | Les radicaux libres | 56 |
| I - B-2-9-3 | Les Espèces Réactives de l'Oxygène..... | 58 |
| I - B-2-9-4 | Les Espèces Réactives de l'Azote..... | 62 |
| I - B-2-9-5 | Principales sources d'espèces réactives | 62 |
| I - B-2-9-5-1 | La chaîne respiratoire mitochondriale | 64 |
| I - B-2-9-5-2 | Les NADPH oxydases | 65 |
| I - B-2-9-5-3 | La xanthine oxydoréductase | 71 |
| I - B-2-9-5-4 | Les oxyde nitrique synthase endothéliales..... | 72 |
| I - B-2-9-6 | Les antioxydants | 75 |
| I - B-2-9-6-1 | Systèmes antioxydants enzymatiques..... | 75 |
| I - B-2-9-6-1-a | Les superoxide dismutases | 76 |
| I - B-2-9-6-1-b | La catalase | 78 |
| I - B-2-9-6-1-c | Les glutathion peroxydases..... | 79 |
| I - B-2-9-6-1-d | Les thiorédoxines et glutarédoxines | 82 |
| I - B-2-9-6-1-e | Les hème oxygénase | 83 |
| I - B-2-9-6-2 | Les systèmes antioxydants non enzymatiques..... | 86 |
| I - B-2-9-6-2-a | Le glutathion..... | 86 |
| I - B-2-9-6-2-b | L'acide ascorbique..... | 88 |
| I - B-2-9-6-2-c | L'acide urique..... | 89 |
| I - B-2-9-6-2-d | La bilirubine, l'albumine et protéines liant les métaux | 89 |
| I - B-2-9-6-2-e | Vitamine E..... | 90 |
| I - B-2-9-6-2-f | Le coenzyme Q10 | 91 |
| I - B-2-9-7 | Balance oxydants-antioxydants..... | 92 |
| I - B-2-9-7-1 | Le potentiel redox | 93 |
| I - B-2-9-7-2 | Le statut redox | 94 |
| I - B-2-9-7-3 | Les réactions redox et la signalisation cellulaire | 94 |
| I - B-2-9-8 | Stress oxydant et dommages aux biomolécules..... | 95 |
| I - B-2-9-8-1 | Lipides | 95 |
| I - B-2-9-8-2 | Protéines | 99 |

| | | |
|------------------|---|-----|
| I - B-2-9-8-3 | Acides nucléiques | 101 |
| I - B-2-9-9 | Effets du stress oxydant sur les fonctions vasculaires | 102 |
| I - B-2-9-10 | Stress oxydant et hypertension..... | 104 |
| I - B-2-9-10-1 | Hypertension expérimentale | 104 |
| I - B-2-9-10-2 | Hypertension humaine | 106 |
| I - B-2-9-10-3 | Stress oxydant : primaire ou secondaire à l'hypertension | 107 |
| I - B-2-9-11 | Raccourcissement télomérique..... | 108 |
| I - B-2-9-12 | Stress oxydant et diabète de type 2 | 109 |
| I - B-2-9-12-1 | Stress oxydant et glucotoxicité | 109 |
| I - B-2-9-12-2 | Mécanismes d'action du stress oxydant dans le diabète..... | 110 |
| I - B-2-9-12-2-a | Stress oxydant et cellule β de Langerghans..... | 110 |
| I - B-2-9-12-2-b | Stress oxydant et sécrétion d'insuline | 111 |
| I - B-2-9-12-2-c | Stress oxydant et sensibilité à l'insuline..... | 112 |
| I - B-2-9-12-3 | Études humaines | 113 |
| I - B-2-9-12-4 | Complications macro et microvasculaires du diabète..... | 114 |
| I - B-2-9-12-4-a | Complications microvasculaires..... | 114 |
| I - B-2-9-12-4-b | Complications macrovasculaire..... | 117 |
| I - C | MODÈLES UTILISÉS | 118 |
| I - C-1 | DIÈTES FAIBLES EN PROTÉINES DURANT LA GESTATION | 118 |
| I - C-1-1 | Différentes diètes | 118 |
| I - C-1-2 | Choix de la diète utilisée..... | 119 |
| I - C-1-2-1 | Implication du SRA | 120 |
| I - C-1-2-2 | Altération de la vasoréactivité à l'Angiotensine II et de la production d'anions superoxide | 120 |
| I - C-1-2-3 | Implication d'un stress oxydant périnatal | 122 |
| I - C-2 | EXPOSITION A UNE HYPEROXIE EN PÉRIODE NÉONATALE..... | 123 |
| I - C-2-1 | Environnement hyperoxique : une définition | 124 |
| I - C-2-2 | Sensibilité du nouveau-né à l'oxygène | 124 |
| I - C-2-3 | Modulation de la tolérance à l'oxygène..... | 125 |
| I - C-2-3-1 | Les défenses antioxydantes | 125 |
| I - C-2-3-2 | Exposition préalable à l'oxygène..... | 126 |

| | | |
|---------------|--|-----|
| I - C-2-3-3 | Effet nutritionnel | 126 |
| I - C-2-3-4 | Exposition aux glucocorticoïdes | 126 |
| I - C-2-3-5 | Exposition à l'endotoxine | 127 |
| I - C-2-4 | Modèle animal utilisé pour les études de doctorat..... | 127 |
| II - | BUT ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE..... | 128 |
| III - | RÉSULTATS..... | 135 |
| III - A | PREMIER ARTICLE: NEONATAL OXYGEN EXPOSURE IN RATS LEADS TO CARDIOVASCULAR AND RENAL ALTERATIONS IN ADULTHOOD | 136 |
| III - B | DEUXIÈME ARTICLE: eNOS UNCOUPLING IN PROGRAMMED ADULT ENDOTHELIAL DYSFUNCTION ASSOCIATED WITH NEONATAL OXYGEN EXPOSURE | 152 |
| III - C | TROISIÈME ARTICLE: NEONATAL OXYGEN EXPOSURE LEADS TO INCREASED AORTIC WALL STIFFNESS IN ADULT RATS: A DOPPLER ULTRASOUND STUDY | 176 |
| III - D | RÉSULTATS ADDITIONNELS..... | 201 |
| III - D-1 | MATERIELS ET METHODES..... | 202 |
| III - D-1-1 | Histologie et immunohistochimie..... | 202 |
| III - D-1-2 | Mesure de l'activité des MMPS et de l'expression des TIMPS | 202 |
| III - D-1-3 | Courbe de croissance et consommation alimentaire..... | 204 |
| III - D-1-4 | Composition corporelle | 204 |
| III - D-1-5 | Tolérance au glucose et résistance à l'insuline | 205 |
| III - D-1-6 | Evaluation d'indices de stress oxydant..... | 205 |
| III - D-1-6-1 | MDA | 205 |
| III - D-1-6-2 | Glutathion..... | 205 |
| III - D-1-7 | Lipides plasmatiques : cholestérol total, triglycérides et acides gras non estérifiés | 206 |
| III - D-1-8 | Leptine | 206 |
| III - D-1-9 | Expression d'Akt-1 et GLUT-4 par western blot | 206 |

| | | |
|--------------|---|-----|
| III - D-2 | ONTOGENÈSE DE LA DYSFONCTION VASCULAIRE | 207 |
| III - D-2-1 | Effets de l'exposition néonatale à l'oxygène sur la vasomotricité ex-vivo à 4 semaines | 207 |
| III - D-2-2 | Effets de l'exposition néonatale sur la production vasculaire d'anions superoxyde à l'âge de 4 semaines | 209 |
| III - D-2-3 | Effets sur l'architecture de la media à 4 semaines..... | 210 |
| III - D-2-4 | Effets sur l'activité et l'expression des MMPS et TIMPS à l'âge de 4 semaines | 212 |
| III - D-3 | CONSÉQUENCES MÉTABOLIQUES | 214 |
| III - D-3-1 | Croissance, consommation alimentaire et composition corporelle | 214 |
| III - D-3-2 | Tolérance au glucose et résistance à l'insuline..... | 217 |
| III - D-3-3 | Paramètres plasmatiques lipidiques | 219 |
| III - D-3-4 | Effets sur des paramètres de stress oxydant..... | 219 |
| III - D-3-5 | Expression d'Akt-1 et de GLUT-4 | 221 |
| IV - | DISCUSSION..... | 223 |
| IV - A | EFFETS D'UN STRESS OXYDANT NÉONATAL SUR LA FONCTION ET STRUCTURE CARDIOVASCULAIRE..... | 224 |
| IV - A-1 | EFFETS D'UN STRESS OXYDANT NÉONATAL SUR LA PRESSION SANGUINE ET LE RYTHME CARDIAQUE | 224 |
| IV - A-2 | EFFETS D'UN STRESS OXYDANT NÉONATAL SUR LA RÉACTIVITÉ VASCULAIRE..... | 226 |
| IV - A-2-2 | Réactivité à l'Angiotensine II..... | 227 |
| IV - A-2-3 | Réactivité endothélium dépendante et indépendante..... | 228 |
| IV - A-3 | EFFETS D'UN STRESS OXYDANT NÉONATAL SUR LA PRODUCTION DE NO..... | 229 |
| IV - A-4 | PRÉSENCE D'UN STRESS OXYDANT..... | 235 |
| IV - A-4-1 | Défenses antioxydantes | 235 |
| IV - A-4-2 | Mesure de la production d'anions superoxyde | 235 |
| IV - A-4-2-1 | La lucigénine..... | 236 |

| | | |
|--------------|---|-----|
| IV - A-4-2-2 | Le dihydroéthidium..... | 237 |
| IV - A-4-3 | Mise en évidence du non-couplage d'eNOS..... | 238 |
| IV - A-5 | HYPEROXIE NÉONATALE ET ANOMALIES STRUCTURALES..... | 239 |
| IV - A-5-1 | Remodelage vasculaire | 239 |
| IV - A-5-2 | Raréfaction microvasculaire | 239 |
| IV - A-5-3 | Diminution du nombre de néphrons | 241 |
| IV - A-5-4 | Rigidité artérielle | 241 |
| IV- B | ONTOGENÈSE DES PHÉNOMÈNES DÉCRITS | 242 |
| IV - B-1 | ONTOGENÈSE DE L'ÉLEVATION DE LA PRESSION SANGUINE ET DE LA DYSFONCTION VASCULAIRE | 242 |
| IV - B-2 | ONTOGENÈSE DU STRESS OXYDANT..... | 242 |
| IV - B-3 | STRUCTURE VASCULAIRE À 4 SEMAINES | 243 |
| IV - B-4 | REMODELAGE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE | 244 |
| IV - C | EFFETS MÉTABOLIQUE D'UN STRESS OXYDANT NÉONATAL | 245 |
| IV - C-1 | EFFETS SUR LA CROISSANCE ET LA COMPOSITION CORPORELLE..... | 245 |
| IV - C-2 | EFFETS SUR LA TOLÉRANCE AU GLUCOSE ET LES PARAMÈTRES LIPIDIQUES..... | 247 |
| IV - C-3 | EFFETS SUR L'ÉTAT RÉDOX ET LES CAPACITÉS ANTI-OXYDANTES | 248 |
| IV - C-4 | EFFETS SUR LA CASCADE DE SIGNALISATION DE L'INSULINE | 248 |
| V - | CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 250 |
| VI - | RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 257 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Stratification de la pression sanguine..... | 9 |
| Tableau 2 : Critères de diagnostique du SM..... | 13 |
| Tableau 3 : Principales espèces réactives dans les systèmes biologiques. | 55 |
| Tableau 4 : Les différents membres de la NADPH oxydase | 69 |
| Tableau 5 : Les isoformes de glutathion peroxydases chez les mammifères. | 80 |
| Tableau 6 : Composition corporelle des animaux mâles. | 216 |
| Tableau 7 : Réponse des animaux mâles adultes après une la charge de glucose. | 217 |
| Tableau 8 : Concentrations plasmatiques de paramètres lipidiques | 219 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Relation entre un défaut de nutrition fœtale durant la grossesse et la survenue de pathologies à l'âge adulte..... | 23 |
| Figure 2 : Principaux mécanismes conduisant à une élévation de la pression sanguine et à la survenue d'un diabète de type 2 à la suite d'une exposition fœtale aux glucocorticoïdes | 34 |
| Figure 3 : Insuffisance utéro-placentaire et l'augmentation de la pression sanguine | 36 |
| Figure 4 : Programmation développementale de l'hypertension et du diabète de type 2 à la suite d'une insuffisance utéro-placentaire..... | 44 |
| Figure 5 : Modulation de la pression sanguine par les hormones sexuelles. | 49 |
| Figure 6 : Enzymes impliquées dans la génération et l'inactivation des ERO | 61 |
| Figure 7 : Les principales sources d'ERO..... | 63 |
| Figure 8 : Chaîne respiratoire mitochondriale..... | 65 |
| Figure 9 : Activation de la NADPH oxydase..... | 67 |
| Figure 10 : Représentation schématique de la eNOS..... | 74 |
| Figure 11 : Le système thiorédoxine | 83 |
| Figure 12 : Mécanisme enzymatique des HO | 84 |
| Figure 13 : Effets protecteurs de HO-1 | 85 |
| Figure 14 : Régulation redox et stress oxydant..... | 93 |
| Figure 15 : La peroxydation lipidique..... | 96 |
| Figure 16 : Mécanismes électrogéniques conduisant à la sécrétion d'insuline..... | 112 |
| Figure 17 : Hyperglycémie et complications microvasculaires. | 115 |
| Figure 18 : Voies impliquées dans les complications microvasculaires. | 117 |
| Figure 19 : Nos groupes expérimentaux | 133 |
| Figure 20 : Réponse vasocontractile à l'angiotensine II et vasodilatatrice au carbachol .. | 208 |
| Figure 21 : dihydroéthidine sur l'aorte de 4 semaines | 209 |
| Figure 22 : Mesure de la densité de fibres d'élastine et de collagène | 210 |
| Figure 23 : Coloration de Verhoeff et du Trichrome de Masson | 211 |
| Figure 24 : Mesure de l'activité des MMPs et de l'expression des TIMPs | 213 |
| Figure 25 : Courbe de croissance entre la 7 ^{ème} et 25 ^{ème} semaine. | 215 |
| Figure 26 : Aire sous la courbe de l'excursion glycémique (ASC) | 218 |
| Figure 27 : Concentrations plasmatiques de malondialdéhyde (MDA)..... | 220 |
| Figure 28 : Rapport GSSG/GSH (A) et le potentiel redox (E) | 221 |
| Figure 29 : Expression d'Akt-1 hépatique | 222 |
| Figure 30 : Mécanisme d'action de DAF-2DA..... | 231 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | | |
|-----------------|---|---|
| AG | : | Age gestationnel |
| AngII | : | Angiotensine II |
| AT1R | : | Récepteur de type-1 de l'angiotensine II |
| AT2R | : | Récepteur de type-2 de l'angiotensine II |
| AVC | : | Accidents vasculaires cérébraux |
| ACTH | : | Hormone adrénocorticotrophine |
| AGEs | : | Produits finaux de la glycation |
| AGL | : | Acides gras libres |
| ADMA | : | Asymmetric dimethylarginine |
| ASC | : | Aire sous la courbe |
| BH ₄ | : | Tetrahydrobioptérine |
| 11 β HSD2 | : | 11 β hydroxystéroïde deshydrogénase-2 |
| CMLV | : | Cellules musculaires lisses vasculaires |
| CAT | : | Catalase |
| CE | : | Cellules endothéliales |
| DOHAD | : | Origines développementales de la santé et des maladies à l'âge adulte |
| DUOX | : | Dual oxydases |
| E | : | Potentiel redox |
| ECA | : | Enzyme de conversion de l'angiotensine II |
| EGFR | : | Epidermal growth factor receptor |
| ERO | : | Espèces réactives de l'oxygène |
| ET-1 | : | Endothéline-1 |

| | | |
|---------------------------------|---|--|
| ECE | : | Enzyme de conversion de l'endothéline-1 |
| ERN | : | Espèces réactives de l'azote |
| eNOS | : | Nitric oxide synthase endotheliale (ou isoforme III) |
| F2 | : | Deuxième génération |
| GAPDH | : | Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase |
| GPx | : | Glutathion peroxydase |
| GRx | : | Glutathion rédoxine |
| GSH | : | Glutathion réduit |
| GSSG | : | Glutathion oxydé |
| HDL | : | High-density-lipoproteins |
| HHS | : | Axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien |
| HNE | : | 4- hydroxynonanal |
| 8-OHdG | : | 8-hydroxy-désoxyguanosine |
| H ₂ O ₂ | : | Peroxyde d'hydrogène |
| HO | : | Heme oxygénase |
| IMC | : | Index de masse corporelle |
| iECA | : | Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'AngII |
| iNOS | : | Nitric oxide synthase inductible (ou isoforme II) |
| IGF-1R | : | Insulin-like Growth Factor 1 receptor |
| IGF-2 | : | Facteur de croissance ressemblant à l'insuline |
| 8-iso-PGF ₂ α | : | 8-iso-Prostaglandines F ₂ α |
| LDL | : | Low-density-lipoproteins |
| MDA | : | Malondialdéhyde |
| mm Hg | : | Millimètre de mercure |

| | | |
|------------------------------|---|---|
| MMPs | : | Métalloprotéinases |
| NAC | : | N-acétylcystéine |
| NADPH | : | Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate |
| NFκB | : | Nuclear factor-kappa B |
| NO | : | Oxide nitric |
| nNOS | : | Nitric oxide synthase neuronale (ou isoforme I) |
| NO ⁺ | : | Cation nitronium |
| NO ⁻ | : | Anion nitroxyl |
| NOX | : | NADPH oxydase |
| O ₂ ^{-•} | : | Anions superoxide |
| OH [•] | : | Radical hydroxyl |
| ONOO ⁻ | : | Péroxynitrites |
| ONE | : | 4-oxy-2-nonenal |
| 8-OHdG | : | 8-hydroxy-2-deoxyguanosine |
| PEPCK | : | Phosphoenolpyruvate carboxykinase |
| PDGF | : | Platelet-derived growth factor receptor |
| PKC | : | Protéine réactive C |
| PON | : | Paraoxonase |
| PHOX | : | Phagocyte oxydase |
| Rat SHR | : | Rats spontanément hypertendus |
| Rats SD | : | Rats Sprague Dawley |
| RCIU | : | Retard de croissance intra-utérin |
| SA | : | Semaines d'aménorrhée |
| SM | : | Syndrome métabolique |

| | | |
|--------------|---|--------------------------------------|
| SNP | : | Nitroprussiate de sodium |
| SRA | : | Système rénine angiotensine |
| SOD1 | : | Superoxyde dismutase cuivre/zinc |
| SOD2 | : | Superoxyde dismutase manganèse |
| SOD3 | : | Superoxyde dismutase extracellulaire |
| TG | : | Triglycérides |
| TNF α | : | Facteur de nécrose tumorale alpha |
| TRX | : | Thiorédoxine |
| VOP | : | Vitesse d'onde pulsée |
| XDH | : | Xanthine déshydrogénase |
| XO | : | Xanthine oxydase |

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais adresser mes plus sincères remerciements à :

1) Mes deux directrices de recherche, Madame le Professeur Anne Monique Nuyt et Madame le Docteur Blandine Comte pour leur encadrement durant toutes ces années. Je vous adresse à toutes les deux ma reconnaissance et ma profonde gratitude, car vous m'avez inculqué la rigueur, la passion de la recherche et la persévérance, et vous m'avez appris à travailler (notamment à améliorer mon écriture...). Merci de votre grande patience, de votre aide, de m'avoir encouragée durant ces années et pour votre amitié fidèle et constante.

2) Aux partenaires financiers qui m'ont fait confiance durant mon doctorat :

- Madame le Professeur Anne Monique Nuyt, qui m'a financée entièrement ou partiellement et s'est toujours assurée que je puisse avoir un toit sur la tête et de quoi manger. Je n'oublierai jamais.
- La Fondation des Étoiles et la Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine pour m'avoir octroyé une bourse pendant les 3 premières années de mon doctorat, et à Monsieur le Professeur Alain Moreau pour avoir autorisé chaque année son renouvellement.
- La Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal (FESP) pour la bourse de fin d'études doctorales.
- Monsieur le Pr Daniel Lajeunesse, directeur du programme des Sciences Biomédicales à l'Université de Montréal, qui m'a accordé chaque année une bourse d'excellence et dernièrement une bourse de rédaction. J'en profite pour remercier

chaleureusement la secrétaire de mon département de Sciences Biomédicales, Madame France Fauteux pour sa disponibilité et sa gentillesse durant toutes ses années.

- Monsieur le Dr André Mazur, pour m'avoir aidé à me loger à Clermont-Ferrand et à Madame le Dr Blandine Comte pour m'avoir accueillie chez elle pendant 15 jours.
- La société Québécoise d'Hypertension Artérielle pour m'avoir octroyé en 2008 et 2011 le prix de la meilleure affiche niveau doctorat lors de leur congrès annuel.

3) Aux membres de mon jury :

- À Madame le Professeur Marie Pia d'Ortho pour avoir accepté d'en être la présidente.
- À Messieurs les Professeurs Siméoni et Cailhier d'être les rapporteurs de ma thèse.
- À Monsieur le Dr André Mazur et à Monsieur le Professeur Régean Couture pour avoir accepté d'y siéger.

4) Au personnel du CHU Sainte Justine :

- Les secrétaires passées ou actuelles d'Anne Monique : Mesdames Claire St Onge, Nathalie Lebreux, Yun Gao, pour les services rendus durant toutes ces années toujours dans la bonne humeur et la rapidité d'exécution.
- Les responsables des étudiants : Mesdames Pauline Barette (retraîtée) et Sandy Lalonde, pour leurs sens de l'écoute, encouragements et conseils, et respectivement pour l'organisation de mon examen prédoctoral et ma soutenance de thèse.

- Madame Dominika Kozubska pour son aide précieuse dans la mise en page, sa gentillesse et sa bonne humeur contagieuse.
- Madame Carmen Gagnon, pour son soutien, ses conseils durant toutes ces années et son amitié.
- Le personnel de l'animalerie sous la direction de Madame Denise Carrier pour les bons soins prodigués à mes rats et pour leurs compétences techniques.
- Les membres du CIBPAR, dont j'ai fait partie. Je voudrais notamment remercier Madame le Dr Carolina Alfieri et Madame Lucie Martinelli.

5) Les membres de mon laboratoire de Montréal :

- Les principales assistantes de recherche : Mesdames Nathalie Germain et Anik Cloutier, merci pour leur aide, leur patience à devoir me supporter et leur soutien moral.
- Les étudiants passés et présents : Pr Patrick Pladys, Pr Gilles Cambonie, Dr Yvan Mivelas, Dre Niina Kleiber, Dre Wissal Ben Jmaa, Dr Frank Cloutier, Dr Alexandre Barbier, Dre Mariane Bertagnolli, Mme Fanny Huyard, Dr Constantin Popescu, M Zack Anstey. Deux mentions particulières, une pour Monsieur le Professeur Gilles Cambonie qui a participé à ma formation en 2004, merci de tes conseils, de ton aide, de ton soutien dans toutes les épreuves, de ta grande gentillesse et simplicité. L'autre pour Monsieur le Docteur Alexandre Barbier, pour ton aide, ta gentillesse, ton soutien ainsi que pour tous les cafés et discussions que nous avons partagés.

6) Aux membres de l'équipe MiMes UNH-UMR 1019 à l'INRA de Clermont-Ferrand pour m'avoir accueillie parmi eux à plusieurs reprises :

- Dr Patrick Brachet, Dre Claudine Manach, Dr Dragan Milenkovic, Dre Christine Morand, Dr Edmond Rock, Dre Marie Anne Verny. Mesdames Dominique Bayle, Séverine Thien et Christiane Deval, Messieurs Martin Rambeau, Nicolas Gérard, George Da Silva. Les étudiants: Audrey Chanet, Sylvain Claude, Dilek Coban, Émilie Martinez, Sadok Yakoub. Avec une mention particulière pour Madame Catherine Besson, pour ta gentillesse et tes bisous quotidiens.
- Madame Bouzaboune de l'Université d'Auvergne pour la partie administrative du dépôt et de la soutenance de mon doctorat.

7) À ma famille, notamment à mes parents et grands-parents pour leur amour, pour leur soutien moral et surtout financier durant toutes ces années, ils m'ont appris à me battre et à ne jamais baisser les bras dans la difficulté. Une pensée aussi aux personnes disparues trop tôt, notamment Monsieur Serge Derue, dit Tonton d'Amour qui m'a toujours encouragée à aller jusqu'au bout.

8) À mes amis, pour les remercier d'avoir compris mes silences, mes refus de sorties faute de temps, et surtout pour leur soutien et leur encouragement.

9) A mon chat, Typo, pour m'avoir réveillée au petit matin, me permettant ainsi de me lever de bonne heure pour travailler!!!

À ma famille

I - INTRODUCTION

La mise en évidence de l'importance de la programmation fœtale des maladies se développant à l'âge adulte est grandissante. L'objectif de mon travail de thèse était d'aborder, dans ce contexte, le rôle du stress oxydant et de ses différentes composantes en période néonatale dans le développement de l'hypertension artérielle et de la dysfonction vasculaire et métabolique de l'adulte. Le manuscrit de thèse est organisé principalement autour de 2 articles et de résultats complémentaires.

L'introduction est divisée en 3 chapitres. Dans le premier, une brève présentation des évidences épidémiologiques entre le poids de naissance et la survenue de pathologies cardiométaboliques à l'âge adulte. Le deuxième aborde les différents mécanismes associés, notamment l'implication du stress oxydant. Le troisième chapitre est consacré à la présentation des modèles animaux que nous avons utilisés au laboratoire.

Suivent les buts et hypothèses de recherche, les résultats des 2 articles et des données additionnelles, puis une discussion générale et quelques perspectives terminent ce manuscrit.

I - A LES ORIGINES DÉVELOPPEMENTALES DES MALADIES SURVENANT À L'ÂGE ADULTE

L'origine développementale de la santé et des maladies (DOHAD) est une aire de recherche qui combine des informations provenant de nombreux domaines de savoir et représente une interface intéressante entre les sciences biologiques et de la santé. Pour cela différentes approches sont nécessaires [696] :

des études épidémiologiques comprennent l'étude de larges cohortes basée sur les données qui ont été compilées au début du 20^e siècle et qui ont servi de base aux travaux de Barker *et coll.* Bien qu'il existe une forte association entre les événements survenant précocement et les conséquences plus tard dans la vie, les études épidémiologiques ne prouvent pas la causalité. Également, les études de cohortes sont coûteuses et nécessitent une forte implication non seulement de l'équipe scientifique, mais également des participants.

des études cliniques, dont l'objectif pour le DOHAD est de comparer les individus avec diverses histoires périnatales en termes de caractérisation clinique et/ou de réponse aux interventions. Les études cliniques sont relativement plus rapides à mettre en œuvre que les études de cohorte et ont permis d'élucider des questions importantes cependant elles restent limitées par les considérations éthiques.

des études expérimentales, qui sont relativement faciles à mettre en œuvre, moins coûteuses. L'utilisation d'animaux a fortement contribué à fournir de nombreuses informations notamment concernant les mécanismes potentiellement incriminés pour le DOHAD. Cependant, l'extrapolation de ces résultats à l'homme est délicate.

Et finalement, *des études translationnelles* qui par la relative facilité d'exécution permettent aux chercheurs d'appliquer leur connaissance pour générer des hypothèses pertinentes pour la physiologie humaine. Par conséquent, la combinaison entre les avantages des études épidémiologiques, cliniques, expérimentales et translationnelles a permis d'apporter un grand volume d'informations importantes, faisant avancer la connaissance sur l'origine développementale des maladies adultes.

Dans cette introduction, je vais vous présenter les grandes lignes de ces différentes études avant d'aborder ensuite les différents mécanismes pathophysiologiques suggérés, plus

précisément le stress oxydant et son rôle dans la programmation de la dysfonction vasculaire et métabolique chez l'adulte.

I - A-1 HISTORIQUE

Le début du 20^e siècle a été marqué dans les pays industrialisés par une augmentation de l'incidence des maladies coronariennes jusqu'à en devenir l'une des principales causes de mortalité. De nombreuses études ont proposé qu'il puisse exister une association entre les événements apparaissant très tôt dans la vie et le développement de maladies cardiovasculaires au cours de la vie adulte. En 1934, Kermarck *et coll.* [384] démontrèrent que le taux de mortalité toutes causes confondues en Grande-Bretagne et en Suède chutait entre 1751 et 1930, le résultat selon eux, de conditions de vie optimales dans l'enfance durant cette période. Forsdahl *et coll.* rapportèrent qu'il existait une corrélation dans une vingtaine de comtés en Norvège entre la survenue de maladies athérosclérotiques du cœur entre 1964 et 1967 et le taux de mortalité infantile quelque 70 ans plus tôt. Ils ont été les premiers à suggérer que des conditions de vie difficiles durant l'enfance et l'adolescence pouvaient être un facteur de risque pour la survenue de maladies coronariennes plus tard dans la vie. Wadsworth *et coll.* [798] en 1985, rapportèrent que l'élévation de la pression sanguine à l'âge adulte (36 ans) pour les deux sexes pouvait être inversement liée au poids de naissance, mais également être fortement associée à la masse corporelle, aux antécédents sociaux (faibles revenus), familiaux (exemple : avoir perdu son père d'une maladie hypertensive ou d'une ischémie du cœur) et à la consommation de cigarettes. Barker *et coll.* en 1986 ont été les premiers à mettre en évidence que les maladies coronariennes pourraient être liées à un défaut de croissance fœtale [56]. Ils ont étudié les différences dans les taux de mortalité par maladies cardiovasculaires (maladies ischémiques du cœur) et les hémorragies cérébrales dans différentes régions de Grande-Bretagne et d'Écosse (plus de 1300 localités). Ces chercheurs ont démontré que les maladies ischémiques du cœur étaient fortement associées avec la mortalité post- mais aussi

néonatale [56] et qu'il existait une forte relation géographique entre le taux de mortalité par maladies ischémiques du cœur et d'hémorragies cérébrales entre 1968 et 1978 [252] et la mortalité infantile entre 1921-1925 [56] (dont le facteur principal était un faible poids de naissance). Ils conclurent qu'une mauvaise santé et une mauvaise condition physique (faible poids) des mères étaient des facteurs de risque importants de maladies ischémiques du cœur et d'hémorragies cérébrales chez leurs enfants [56]. Ces mêmes chercheurs proposèrent alors les premières données suggérant que les pathologies adultes pourraient être liées aux conditions de vie anténatales par une étude démontrant une corrélation inverse entre le poids à la naissance et l'incidence de mortalité par maladies cardiovasculaires tant chez les hommes que chez les femmes [57].

Par la suite, toute une série d'études épidémiologiques a confirmé cette association entre un faible poids de naissance et les maladies cardiovasculaires à la fois chez les hommes et chez les femmes aussi bien en Europe, qu'en Amérique du Nord ou en Inde. Cette association initiale a été étendue pour inclure l'association entre la trajectoire de croissance en période pré- et postnatale et l'augmentation du risque de survenue d'hypertension, d'intolérance au glucose, de résistance à l'insuline, de diabète de type 2, d'obésité et plus généralement du syndrome métabolique. On attribue à Barker *et coll.* l'hypothèse d'une origine fœtale (ou développementale) des maladies survenant à l'âge adulte. Des facteurs environnementaux, notamment nutritionnels, peuvent agir précocement dans la vie pour programmer la survenue de maladies cardiovasculaires et métaboliques à l'âge adulte et ainsi conduire à une mort prématurée. Les données épidémiologiques supportant cette hypothèse sont présentées ci-dessous.

I - A-2 ÉVIDENCES ÉPIDÉMIOLOGIQUES DU LIEN ENTRE LE POIDS DE NAISSANCE ET LES PATHOLOGIES CHEZ L'ADULTE

I - A-2-1 Poids de naissance, âge gestationnel et prématurité

Il existe en effet un classement dans le poids de naissance. On retrouve un poids de naissance extrême < 1 kg, un très faible poids de naissance < 1,5 kg, et un petit poids de naissance < 2,5 kg. Il est cependant plus juste, plutôt que de regarder uniquement le poids de naissance, de considérer les enfants nés petits pour l'âge gestationnel (poids de naissance < au 10^{ème} percentile pour l'âge gestationnel (AG)) et ceux avec un poids de naissance adapté pour AG (poids de naissance > 10^{ème} percentile pour AG) [748].

A titre d'exemple, un enfant né avec un poids de naissance de 1,5 kg mais petit pour l'âge gestationnel, a déjà subi une programmation prénatale défavorable, le conduisant à répondre différemment à la nutrition et aux traitements médicaux en comparaison à un enfant né avec le même poids de naissance mais adapté pour AG [542]. Voici les poids de naissance moyens correspondant pour certains AG : 26 semaines d'aménorrhées (SA) : 900 g; 28 SA : 1,2 kg; 30 SA : 1,5 kg; 32 SA : 1,75 kg.

Concernant la prématurité, elle est définie comme toute naissance survenant avant 37 SA. L'organisation mondiale de la santé (OMS) définit un prématuré comme un nouveau né, qui pèse au moins 500 g qui respire par lui même et demande d'inclure tous les accouchements après 22 SA. Au sein de la prématurité, l'on distingue 1) la prématurité moyenne qui concerne les accouchements de 32 SA à 36 SA + 6 jours, 2) la grande prématurité avant 33 SA, 3) la très grande prématurité avant 29 SA, et 4) l'extrême prématurité qui concerne les accouchements avant 27 SA.

I- A-2-2 Poids de naissance et pathologies cardiovasculaires

L'étude réalisée à Hertfordshire en Grande Bretagne (5654 hommes nés entre 1911-30 chez qui le poids de naissance et à l'âge d'un an ont été enregistrés) [58] a été la première étude qui a mis en évidence que les maladies coronariennes (maladies ischémiques du cœur) survenant à l'âge adulte pouvaient trouver leurs origines durant la vie fœtale et néonatale. Les taux de mortalité par maladies ischémiques du cœur les plus élevés ont été trouvés chez les hommes qui avaient eu un faible poids à la naissance ainsi qu'à l'âge d'un an. La cohorte d'Helsinki (8760 individus chez qui des mesures de taille et de poids ont été prises entre la naissance et l'âge de 2 ans) a permis de montrer qu'un petit poids durant la jeune enfance (entre 0 et 2 ans) est associé avec une augmentation du risque de survenue d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) à l'âge adulte [346]. La sténose carotidienne est un facteur de risque important pour les formes occlusives d'AVC. Cette sténose peut être mise en évidence par un doppler carotidien permettant de mesurer l'épaisseur intima-média. L'association entre un petit poids de naissance et l'augmentation de l'épaisseur intima-média n'a été observée que chez les individus qui ont eu un petit poids à la naissance suivi d'un rattrapage de croissance (catch up) dans les deux premières années de vie [566].

Aussi, des individus issus de la cohorte d'Helsinki qui ont eu une faible croissance à la fois durant la période fœtale (traduit par un faible poids de naissance et un faible indice de masse corporelle (IMC)) mais également durant les 2 premières années de vie (traduit par un IMC de 16 kg/m^2 vs. $> 18 \text{ kg/m}^2$) présentent à l'âge adulte un profil lipidique athérogénique [372].

Par conséquent ces données suggèrent qu'un faible poids à la naissance et durant l'enfance est associé avec la survenue de pathologies cardiovasculaires à l'âge adulte.

I - A-2-3 Poids de naissance, rattrapage de croissance et pression sanguine

D'un point de vue clinique, la pression sanguine est classée suivant différents stades. Cette stratification date de 1977 avec le premier rapport de "Joint National Committee on Detection Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC)". Par la suite six autres rapports ont été émis (1980, 1984, 1988, 1993, 1997) jusqu'au plus récent JCN7 (2003) [4;143]. Ce dernier rapport a classifié la pression sanguine (Tableau 1).

Tableau 1 : Stratification de la pression sanguine; SBP, pression artérielle systolique; DBP, pression artérielle diastolique. Adapté d'après [143].

| ÉTAT | VALEURS DE PRESSION SANGUINE |
|----------------------|--------------------------------------|
| normal | SBP < 120 et DBP < 80 mmHg |
| préhypertensif | SBP 120-139 ou DBP 80-89 mmHg |
| hypertension stade 1 | SBP 140-159 ou DBP 90-99 mmHg |
| hypertension stade 2 | SBP > 160 ou DBP > 100 mmHg |

L'association inverse entre le poids de naissance et la pression sanguine à l'âge adulte a été démontrée tant chez les hommes que chez les femmes, dans les pays industrialisés mais aussi en voie de développement.

Une corrélation inverse entre la pression sanguine systolique et le poids à la naissance devient évidente dans les premiers mois de la vie postnatale et augmente fortement avec l'âge, suggérant que la relation initiée *in utero* s'amplifie avec le temps [435]. Il a été

envisagé une augmentation de la pression sanguine de 1 à 4 mm Hg pour chaque kg de diminution dans le poids de naissance [345].

Cette corrélation est visible aussi bien chez l'enfant (7-10 ans) [57;129;699], qu'à l'âge adulte [57;262;496], et semble être indépendante de la consommation de cigarettes [434] et de facteurs génétiques [74].

Les enfants prématurés sont probablement les individus les plus à risque pour le développement de pathologies à l'âge adulte en comparaison à des individus nés à terme. En effet, il a été montré une relation inverse entre l'AG et la pression systolique chez le jeune adulte [450], et cette association semble être amplifiée pour les AG les plus bas [695]. Il est intéressant de noter qu'il n'existe pas de corrélation entre la pression sanguine à l'âge adulte et l'AG chez des individus nés à terme.

De plus, certains paramètres anthropométriques semblent également avoir une influence sur la pression sanguine. La circonférence de la tête prise à la naissance paraît être inversement associée avec la pression systolique [345;834] même si ceci n'est pas toujours observé [409]. Il a été aussi montré une relation entre la taille à la naissance et la pression systolique à l'âge adulte, parfois positive [409] ou inverse [496]. Enfin, concernant la relation entre la pression sanguine et le poids du placenta, les résultats ne sont pas homogènes, des études ayant montré l'existence d'une association inverse [825], positive [51;434], voire même une absence d'association [230;554].

Un faible poids de naissance peut avoir des conséquences sur la structure vasculaire. En effet, un faible poids de naissance (< 2,5 kg) a aussi été associé avec une augmentation de la vitesse d'onde pulsée (VOP) à l'âge adulte, par conséquent une augmentation de la rigidité artérielle [496].

Un rattrapage de croissance en période postnatale, semble être un composant clé dans la pression sanguine plus tard dans la vie. Des études ont proposé une association positive entre l'élévation de la pression sanguine durant l'enfance et à l'âge adulte et le rattrapage de croissance soit immédiatement après la naissance (0-5 mois) et entre 21 mois et 5 ans [68]; durant la première année de vie [230]; entre l'âge de 2 ans et 11 ans [214]. Il est possible qu'une accélération de la croissance postnatale programme le développement de l'arbre vasculaire. Chez des enfants prématurés, un gain de poids durant les deux premières semaines de vie est associé à l'adolescence avec une diminution de la dilatation endothélium dépendante [701].

I - A-2-4 Poids de naissance, rattrapage de croissance et diabète de type 2/syndrome métabolique

L'insuline joue un rôle central dans la croissance fœtale et post-natale. Par conséquent des perturbations dans le métabolisme du glucose et de l'insuline pourraient expliquer le lien entre la croissance fœtale et le développement de maladies cardiovasculaires par la suite. Hales *et coll.* ont été les premiers à rapporter qu'un petit poids (à la naissance < 2,5 kg et à l'âge d'un an < 8,1 kg) était fortement associé avec un défaut de tolérance au glucose et un diabète de type 2 à l'âge adulte [295]. Par la suite de nombreuses études ont confirmé cette relation en montrant une diminution de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 avec l'augmentation de l'index pondéral à la naissance [602] et du poids de naissance [469]. Les enfants prématurés sont plus vulnérables pour développer un diabète de type 2 à l'âge adulte. En effet, avec un très faible poids de naissance (600 g – 1,5 kg avec un AG entre 24 et 36,5 SA), ils présentent à l'âge adulte un défaut de tolérance au glucose et de

sensibilité à l'insuline en comparaison à des enfants nés à terme (poids de naissance entre 2,5 kg et 4,9 kg, avec un AG entre 37 et 42,9 SA) [336].

Le syndrome métabolique (SM) a été décrit à l'origine par Reaven *et coll.* en 1988 comme le syndrome X ou syndrome de résistance à l'insuline [628]. Plusieurs définitions existent concernant le SM. Les critères de diagnostique ont été initialement émis par l'OMS en 1998 [17] et repose sur la résistance à l'insuline. Il existe cependant un problème majeur associé à cette évaluation. La méthode de référence développée par De Fronzo [178] en 1979 utilise la technique de clamp hyperglycémique euglycémique qui consiste en une perfusion d'insuline à débit constant pendant 3 heures, couplée à une infusion de glucose. La quantité de glucose infusée pour maintenir la glycémie est directement proportionnelle à la résistance périphérique à l'insuline. Cependant, c'est une technique lourde et impossible à mettre en application en routine d'un point de vue clinique. De nouveaux critères ont donc été établis, plus facile dans leur application : the National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) modifia les définitions émises par l'OMS [2]. Les différents facteurs de risque en fonction des critères émis par l'OMS et NCEP ATP III sont répertoriés ci-dessous (Tableau 2).

Tableau 2 : Critères de diagnostic du SM émis par l’OMS et NCEP ATP III, issu de [617]

| Facteurs de risques | OMS | NCEP ATP III |
|---|---|--|
| Critères diagnostiques | DT2 ou IG et au moins 2 facteurs de risque | 3 facteurs de risque |
| Obésité | Ratio taille/hanche > 0,9 (hommes) ou > 0,85 (femmes), et/ou IMC > 30 | Circonférence de la taille > 40 (males) ou > 35 (femmes) |
| Triglycérides sériques (mg/dL) | ≥ 150 | ≥ 150 |
| HDL sériques (mg/dL) | < 35 (males) et < 39 (femmes) | < 40 (mâles) et < 50 (femmes) |
| Pression artérielle (mm Hg) | ≥ 140/90 | ≥ 130/85 |
| Glucose plasmatique à jeun (mg/dL) | Pas de données | > 100 |
| Microalbuminurie | 30 mg d’albumine/g créatinine | Pas utilisée |

DT2 : diabète de type 2; **IG** : intolérance au glucose évaluée par un test de tolérance au glucose après ingestion orale de 75 g de glucose; **IMC** : index de masse corporelle; **HDL** : lipoprotéines à haute densité.

Une forte relation inverse existe entre le poids de naissance et la présence du SM [112]. Il a été montré que le risque de le développer était 10 fois plus élevé chez les hommes qui avait eu un petit poids de naissance en comparaison aux individus qui étaient plus lourds à la naissance [54].

Il a été montré également que la prévalence à l’âge adulte est inversement associée à la circonférence crânienne, l’index pondéral et le poids à l’âge d’un an, et l’éruption dentaire [826]. Et, cette association entre poids de naissance et SM semble être indépendante de la consommation de cigarettes, de la consommation d’alcool et de la classe sociale à la naissance ou au moment de l’étude [603].

Il existe chez l’homme des évidences qu’un petit poids à la naissance suivi par un rapide gain de poids durant l’enfance (défini par une augmentation du Z-score du rapport poids/âge de plus d’une déviation standard au moment de l’étude; un Z-score représente la différence entre la moyenne et les valeurs de l’ensemble de la cohorte, et il est exprimé en

déviations standard) peut conduire chez le jeune enfant à une altération de la sensibilité à l'insuline [707] et plus tard dans la vie, à la survenue d'un diabète de type 2 [52;213;229;469] et d'une obésité [563].

Chez les femmes, un petit poids de naissance ainsi qu'un faible AG peut conduire plus tard dans la vie, au moment de la grossesse, au développement d'un diabète gestationnel. L'augmentation du risque est de 80 % chez celles dont le poids de naissance est < 2,5 kg, en comparaison au poids d'un groupe de référence (4,0 – 4,5 kg); il est de 60 % chez celles dont l'AG est compris entre 28 et 34 SA (en comparaison à 40 SA) [205]. Par la suite ces femmes sont plus à risque de développer un syndrome métabolique [795]. De plus, les descendants de mères diabétiques sont plus à risque de devenir obèses durant l'enfance et de développer à leur tour un diabète de type 2 [168;597].

Par ailleurs, l'association entre un rattrapage de croissance en période postnatale et la survenue d'un surpoids plus tard peut s'opérer indépendamment du poids de naissance. Des études ont montré qu'un rattrapage de la croissance ou une croissance trop rapide dans les toutes premières semaines de vie [717], à 4 mois [716] mais également jusqu'à l'âge de 4 ans [521] est relié plus tard à l'obésité [718].

I - B HYPOTHÈSES ET MÉCANISMES

I - B-1 DU THRIFTY GÉNOTYPE A LA PLASTICITÉ DÉVELOPPEMENTALE

L'hypothèse fondamentale à la base du DOHAD est que les facteurs de l'environnement agissant précocement dans la vie ont des conséquences sur le risque de survenue de maladies plus tard dans la vie.

I - B-1-1 Interaction gène-environnement: le thrifty génotype (génotype d'épargne)

Le concept de thrifty génotype émis par Neel *et coll.* [540] a été suggéré comme étant à la base de la relation poids de naissance/risque de survenue de maladies plus tard dans la vie. Les individus qui vivent dans des conditions difficiles où l'apport nutritionnel est instable peuvent augmenter leur survie s'ils emmagasinent un surplus énergétique (quand les conditions nutritionnelles sont optimales) sous forme de gras plutôt que sous forme de glycogène. Cela permet de fournir de l'énergie durant les périodes où l'apport nutritionnel est moindre (notamment durant les périodes de disette). Il n'est effectivement pas évident de comprendre comment un phénotype avec des effets négatifs (accumulation de gras) peut devenir favorable dans un processus de sélection naturelle. Pour cela, Neel *et coll.* suggèrent l'existence de gènes thrifty (gènes d'épargne métabolique) qui prédisposent au diabète. Ces gènes permettent une meilleure utilisation des surplus d'énergie et ainsi de mieux supporter et donc de survivre aux périodes de disette. Parmi les gènes thrifty, sont concernés des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, de l'insuline [187]. A titre d'exemple, prenons la glucokinase qui est une enzyme qui phosphoryle le glucose en glucose-6-phosphate au niveau hépatique et pancréatique et dont le taux est important pour le métabolisme du glucose [624]. Des mutations hétérozygotes dans le gène de la glucokinase se traduisent par une réduction de la sécrétion d'insuline et par conséquent à une réduction de la croissance intra-utérine [304] et à une légère hyperglycémie tout au long de la vie due à un défaut de sensibilité au glucose par les cellules bêta [247;305].

Cependant, dans nos sociétés modernes où l'abondance de nutriments prédomine ainsi qu'un mode de vie sédentaire, Neel *et coll.* suggèrent que le thrifty génotype, qui prépare les individus à une hypothétique famine qui n'arrivera jamais, peut conduire à des

phénotypes métaboliques désavantageux aboutissant à l'obésité et aux problèmes de santé qui sont reliés tels que le diabète de type 2.

Bien que l'hypothèse des gènes thrifty soit populaire et fréquemment évoquée, elle a été sujet à de nombreux débats les dernières décennies.

I - B-1-2 Le thrifty phénotype (phénotype d'épargne)

Par la suite, l'hypothèse du thrifty phénotype proposée par Hales et Barker [294] a été créée pour essayer d'expliquer la relation entre une faible croissance fœtale et durant l'enfance, et une augmentation du risque de développer une intolérance au glucose [295] et un syndrome métabolique à l'âge adulte. Une malnutrition à différentes périodes de développement durant la vie fœtale et l'enfance est l'élément central à l'origine de cette hypothèse. Lorsque l'environnement du fœtus est pauvre (sous nutrition), il se met alors en place une résistance à l'insuline qui est une réponse adaptative permettant d'optimiser la croissance des organes clés en réduisant la croissance des cellules somatiques afin que l'énergie soit disponible pour le cerveau et le cœur, au détriment des autres organes tels que le muscle, le foie et le pancréas. Une telle adaptation permet tout d'abord d'aider le fœtus à survivre à court terme, en ralentissant la croissance viscérale réduisant par conséquent la demande en nutriments. Cependant, cette résistance à l'insuline peut devenir délétère si la situation nutritionnelle change au cours de la vie postnatale et la nourriture s'avère abondante, favorisant l'accumulation de tissus adipeux et l'obésité, perpétuant la résistance à l'insuline [573]. Aujourd'hui cette hypothèse est connue sous le nom de programming métabolique.

Par conséquent, les adaptations faites par des manipulations nutritionnelles sur le fœtus pourraient conduire à repositionner à long terme l'homéostasie énergétique cellulaire, plus

probablement via des modifications épigénétiques de gènes impliqués dans de nombreuses voies clés de régulation [733], programmant ainsi la survenue d'un diabète de type 2 plus tard dans la vie.

I - B-1-3 Programming

Le terme programming qui a été défini par Lucas *et coll.* en 1991 a été utilisé pour décrire un processus par lequel un stimulus ou une insulte appliqué à un moment crucial du développement peut conduire à des effets à long terme sur la structure ou fonction d'un organisme [478]. Vu l'importance de la nutrition sur la croissance et le développement, il n'est pas surprenant qu'une insulte nutritionnelle survenant à un moment critique (appelé période sensible ou critique) de la différenciation ou division cellulaire puisse altérer de manière permanente la structure et fonction d'un organe, affecter par conséquent les processus métaboliques. Les tissus ou systèmes corporels traversent des périodes critiques, souvent brèves, de croissance et de développement durant la vie fœtale et très tôt durant l'enfance. La croissance normale peut être divisée en 3 phases : une division cellulaire seule (hyperplasie), une division cellulaire avec l'élargissement concomitant des cellules (hypertrophie), et finalement l'hypertrophie seule sans augmentation du nombre de cellules [829]. Cette division de la croissance en 3 phases permet de mieux comprendre pourquoi une restriction calorique survenant très tôt dans la croissance affecte principalement la division cellulaire et conduit ainsi à un arrêt quasi définitif de la croissance, tandis qu'une restriction calorique survenant plus tard affecte alors la taille des cellules (réduction) et peut conduire à une reprise de la croissance, une fois la restriction calorique arrêtée [503;830].

I - B-1-4 Empreinte métabolique

Le terme d'empreinte métabolique [809] a été utilisé pour décrire les phénomènes biologiques incriminés dans la relation entre les expériences nutritionnelles survenant précocement dans la vie et le développement de pathologies plus tard dans la vie. Ce terme englobe les réactions adaptatives de l'organisme vis-à-vis de conditions nutritionnelles précocement dans la vie et se caractérisent par :

- 1) une susceptibilité limitée à une fenêtre critique ontogénique très tôt dans le développement;
- 2) un effet persistant tout au long de la vie d'adulte;
- 3) des effets spécifiques et mesurables qui pourraient différer de manière quantifiable parmi les individus;
- 4) une relation, de type dose-réponse ou seuil-dépendant, entre une exposition spécifique et ses conséquences (outcomes).

I - B-1-5 Controverses et plasticité développementale

Il existe un débat sur la pertinence de l'utilisation des termes "programming" (ce terme pourrait être mal utilisé car il fait davantage référence aux événements qui sont réversibles, plutôt qu'à ceux irréversibles) et "d'empreinte métabolique" (ce terme implique les événements précoces d'origine exclusivement métabolique, et il y a aussi un risque de possible confusion entre l'empreinte métabolique et les gènes d'empreintes).

Les physiologistes développementaux et les médecins utilisent le terme "programming" pour décrire le processus par lequel un stimulus ou une insulte à un moment critique du développement exerce des effets à long terme sur la structure et la fonction du corps. Barker recommande que le terme "programming" ne soit plus utilisé dans le contexte des origines développementales des maladies adultes [50], mais, de privilégier l'utilisation du terme plasticité développementale (la capacité que possède un simple phénotype à produire plusieurs formes alternatives de structure, d'état physiologique ou comportemental en réponse aux conditions environnementales) [50].

I - B-2 MÉCANISMES

I - B-2-1 Nutrition

L'hypothèse des origines développementales propose qu'une augmentation du risque de survenue de maladies à l'âge adulte soit induite par une réponse adaptative du fœtus vis-à-vis de conditions néfastes telle qu'une déficience dans le statut nutritionnel de la mère [61].

I - B-2-1-1 Études animales

I - B-2-1-1-1 Restriction en protéines et calories

Une restriction en protéines [419;611] et calorique [240;837] administrées durant toute la gestation chez la rate, ainsi qu'une restriction calorique administrée en période périconceptuelle chez le mouton [204] ont conduit dans leur descendance directe à l'âge adulte avoir une pression sanguine augmentée, une fonction vasculaire altérée, notamment

par modification de la vasocontraction à l'Angiotensine II (AngII) tel qu'il a été mis en évidence tant *in vivo* [611] qu'*ex vivo* [855], de la vasorelaxation à l'acétylcholine [240], au carbachol et au SNP [117;611]. Les réponses des barorécepteurs en réponse à l'AngII [253] et à la phényléphrine [610] sont également changées.

Également, une restriction en protéines durant la gestation conduit dans la descendance directe à une augmentation des niveaux circulants d'homocystéine ($9,64 \pm 4,10 \mu\text{M}$ vs. $5,67 \pm 1,14 \mu\text{M}$) [644]. En effet, chez l'animal, une augmentation des concentrations plasmatiques postprandiales de méthionine a été observée à la suite d'une restriction en protéines. Une hyperméthionémie peut conduire à une hyperhomocystéinémie à long terme [644]. Celle-ci peut également être la conséquence d'une diminution de certaines activités enzymatiques (cystathionine γ -lyase) se traduisant par une diminution du métabolisme de l'homocystéine. Un excès d'homocystéine pouvant affecter la méthylation de l'ADN, et ainsi altérer le développement du fœtus [495]. Une hyperhomocystéinémie a d'ailleurs été associée avec une augmentation de la pression sanguine diastolique [644], un défaut de relaxation induit par l'oxide nitrique [446] et à une intolérance au glucose [631].

Concernant les paramètres métaboliques, une restriction en protéines chez la rate gestante peut également conduire dans sa descendance à l'âge adulte à une intolérance au glucose [418] et à des changements dans l'activité des enzymes hépatiques [183]. Il a été aussi montré une diminution au niveau musculaire de l'expression de protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline ((PKC) zeta, p85 α , et du transporteur de glucose 4 (GLUT4)) précédant le défaut de tolérance au glucose [574]. Les effets d'une restriction protéique sur le métabolisme du glucose sont graduels dans le temps : chez le jeune rat adulte (6 semaines), la tolérance au glucose est meilleure que pour les animaux contrôle [685], puis la tendance s'inverse pour développer un diabète en vieillissant [594]. Les

mécanismes pouvant expliquer une dégradation de la tolérance au glucose avec l'âge sont à ma connaissance, encore grandement inconnus, cependant une résistance à l'insuline serait plus impliquée chez les mâles tandis qu'une déficience en insuline serait plus importante chez les femelles [296]. Ce processus de dégradation de la tolérance au glucose pourrait être accéléré. En effet, une restriction en protéines durant la gestation, puis l'administration d'un régime riche en gras en période postnatale amplifie l'intolérance au glucose [828] et conduit également au développement d'individus obèses [596].

I - B-2-1-1-2 Régime riche en acides gras

L'administration d'un régime riche en gras chez la souris (avant et durant la gestation et la lactation) et chez la rate (durant la gestation) ont conduit dans la descendance directe à l'âge adulte, à une élévation de la pression sanguine associée à une dysfonction des artères de résistance [666], un défaut de relaxation endothélium dépendant [385] et d'un point de vue métabolique, à une augmentation du rapport insuline/glucose dès la naissance [288].

I - B-2-1-1-3 Micronutriments

L'apport en micronutriments au cours de la gestation est également important. Parmi les micronutriments les plus couramment mentionnés comme ayant un rôle dans la programmation développementale notamment de l'hypertension, il a été montré qu'une restriction en fer [458] et en calcium [73] durant la gestation chez la rate, conduit dans la descendance directe à l'âge adulte à une élévation de la pression sanguine.

L'utilisation de modèles animaux a permis de montrer qu'une malnutrition (sous ou sur-nutrition) administrée lors de la gestation et lactation peut programmer à long terme une augmentation de la pression sanguine associée à une dysfonction vasculaire et également conduire à des perturbations métaboliques.

I - B-2-1-2 Études humaines

L'importance de la nutrition maternelle est également supportée par de nombreuses études épidémiologiques. Un des meilleurs exemples pour étudier la malnutrition (sous-nutrition) durant la gestation et la survenue de pathologies à l'âge adulte provient des données épidémiologiques issues de la famine en Hollande entre 1944 et 1945. Les impacts à longs termes de la famine dépendent du moment d'exposition des mères (début, milieu ou fin de gestation). Les bébés les plus petits à la naissance ont été observés chez des femmes ayant été exposées en milieu et fin de gestation à la famine (poids des bébés à la naissance: 3,2 kg vs 3,4 kg pour une exposition à une famine en début de gestation vs pas d'exposition du tout à la famine), et ces enfants à l'âge adulte ont présenté une réduction de la tolérance au glucose [627], avec une augmentation de la pression sanguine. Cependant il n'y a pas eu de démonstration de l'effet d'une exposition prénatale à la famine sur la pression sanguine [647]. Dépendamment du trimestre d'exposition à une sous nutrition fœtale, les maladies cardiovasculaires développées par la suite ne sont pas les mêmes (Figure 1).

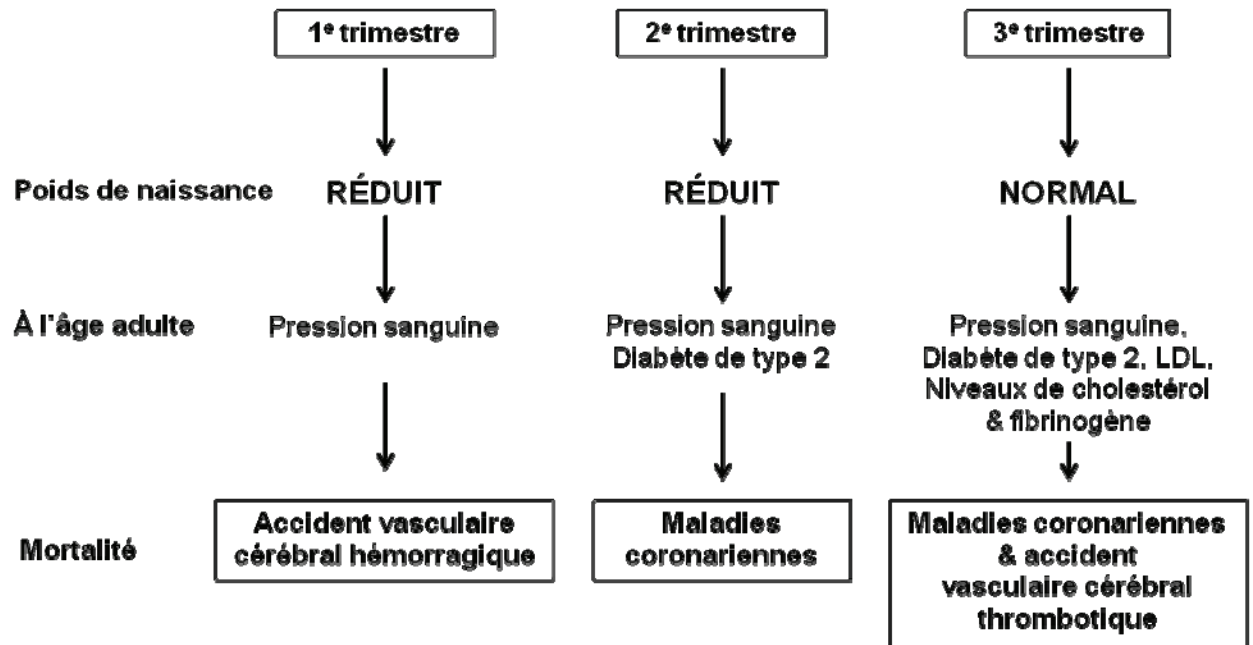


Figure 1 : Relation entre un défaut de nutrition fœtale durant la grossesse chez la femme et la survenue de pathologies à l'âge adulte, adapté de [48].

Tout comme il a été montré dans les modèles animaux, une malnutrition implique une déficience d'apports non seulement en macronutriments mais également en micronutriments.

I - B-2-1-2-1 Macronutriments

Parmi les constituants de l'alimentation les plus importants, Roseboom *et coll.* ont mis en évidence l'importance du ratio protéines/glucides équilibré durant la grossesse, particulièrement durant le dernier trimestre. Les recommandations durant la grossesse sont respectivement de l'ordre de 70 g/j pour les protéines et 50-55 % de la ration calorique journalière en glucides. Les enfants dont la mère a eu un déséquilibre entre l'apport de protéines par rapport aux glucides lors du dernier trimestre de grossesse présentent à l'âge

adulte, une élévation de la pression sanguine. Cette pression sanguine diminue de 0,6 mm Hg pour chaque augmentation de 1 % dans le rapport protéines/glucides lors du dernier trimestre de grossesse [648]. Le rapport protéines animales/glucides durant la grossesse et l'élévation de la pression sanguine dans la descendance est complexe [119]. Si la mère a consommé une quantité de protéines animales inférieure à 50 g/j, la pression sanguine dans sa descendance augmente avec l'augmentation de la consommation de glucides, alors que dans le cas où la consommation maternelle de protéines animales a été supérieure à 50 g/j, la pression sanguine chute avec l'augmentation de la consommation de glucides.

Cela soulève l'importance d'une consommation plus importante de protéines que de glucides. Une consommation élevée de glucides par rapport aux protéines en début de gestation a été associée à un faible poids placentaire et un petit poids de naissance, ce qui pourrait expliquer l'élévation de la pression sanguine plus tard dans la vie [119]. Concernant les paramètres métaboliques, une diète maternelle contenant une importante quantité de protéines (112 g/j, à la fois animales (40 g/j) et végétales (72 g/j)) a été associée dans la descendance à l'âge de 40 ans, avec une déficience en insuline et un défaut de tolérance au glucose [687].

I - B-2-1-2-2 Micronutriments

Le rôle de plusieurs micronutriments a été particulièrement mis en évidence dans le contexte qui nous intéresse.

Le fer est un micronutriment essentiel qui a une fonction importante dans le métabolisme de l'hémoglobine et dans les processus oxydatifs. Une déficience en fer est la déficience nutritionnelle la plus communément rencontrée à l'échelle de la planète [3]. On estime que

20 % des femmes sont déficientes en fer, ce chiffre passe à 50 % chez les femmes enceintes [220]; la consommation journalière en fer augmente avec la grossesse, passant de 16 mg/j avant la conception à 30 mg/j lors du dernier trimestre. Une déficience en fer est aussi la principale cause d'anémie, qui se caractérise par de faibles concentrations d'hémoglobine. Une anémie maternelle durant la grossesse (taux d'hémoglobine < 11 g/dL) est associée avec une augmentation de la pression sanguine chez l'enfant (7-12 ans) [102;270].

Concernant le calcium, les recommandations journalières sont plus importantes pendant la grossesse, passant de 0,9 g/j avant la conception à 1,3 g/j afin d'assurer une bonne minéralisation des os du fœtus notamment lors du dernier trimestre. Hatton *et coll.* montrèrent que l'administration quotidienne de 2 g de calcium durant la gestation (de la 13^{ème} semaine jusqu'à la délivrance) diminue la pression sanguine de sa descendance à 3 mois et 2 ans d'âge [306].

Le magnésium quant à lui ne semble pas être affecté par la programmation développementale [25].

L'acide folique est très important dans l'alimentation de la femme enceinte pour le développement normal du fœtus. Au cours de la grossesse, la demande en acide folique augmente due notamment au transport de l'acide folique au fœtus, à la croissance placentaire, à la synthèse des érythrocytes et au remplacement des pertes urinaires [682]. Les recommandations journalières sont de 0,6 mg/j chez la femme enceinte. Parmi les nombreuses complications associées à un déficit en folates, nous trouvons un décollement prématuré du placenta, une toxémie de grossesse, un avortement spontané et mort fœtale, un défaut de formation du tube neural incluant spina-bifida et anencéphalie, hydrocéphalie, prématurité et faible poids de naissance, anémie hémolytique, malformations congénitales

anatomiques et grossesse gémellaire [516]. Une déficience en folates (mais également en vitamine B12 et B6) augmente les niveaux d'homocystéine plasmatique. Des études ont montré qu'une augmentation dans ces concentrations de 1 μM pendant la grossesse (passant de 5 μM durant les 2 premiers trimestres à 6 μM dans le dernier trimestre) pouvait être associée à la fois avec un faible poids de naissance et une élévation de la pression sanguine chez l'enfant [342;735].

I - B-2-1-2-3 Importance du lait maternel

En terme de nutrition postnatale, de nombreuses études ont noté des patterns de croissance différents entre les enfants nourris au sein et ceux nourris avec un lait de formule maternisé [13]. Les enfants nourris au sein sont plus minces durant les premières années de vie [471] et sont mieux protégés d'un risque d'obésité à l'adolescence [267]. Ces différences pourraient être le résultat en partie de réponses endocrines différentes vis-à-vis de l'alimentation, orchestrées par la leptine exogène présente dans le lait maternel [670]. C'est un peptide anorexigène très important principalement sécrété par le tissu adipeux blanc mais aussi le muscle, l'estomac et le foie, qui contribue à la régulation de la satiété et à la balance énergétique [720]. Les enfants nourris au sein semblent mieux réguler leur prise alimentaire aussi bien pendant l'allaitement [186] qu'une fois l'alimentation solide introduite [591]. Les niveaux plasmatiques de leptine diminuent rapidement chez les nouveau-nés après la naissance et ce déclin pourrait être associé au comportement alimentaire dans les premières semaines de vie. Ce processus pourrait expliquer pourquoi chez les enfants avec une restriction de croissance, chez qui les niveaux de leptine sont plus bas à la naissance, ils ont une accélération de la croissance très rapide en période postnatale

en favorisant la prise alimentaire [720]. L'allaitement maternel d'enfants nés prématurément [702] et à terme [827] a été associé avec une diminution de la pression sanguine respectivement chez le jeune enfant et à l'adolescence. Les mécanismes incriminés ne sont pas clairement définis, mais l'influence bénéfique de l'allaitement maternel sur la pression sanguine pourrait s'expliquer par la différence de composition entre le lait maternel et le lait de formule, notamment dans leur contenu en sodium et acides gras. Dans les pays occidentaux jusque dans les années 1980, le niveau de sodium contenu dans les laits formulés étaient plus élevés que dans le lait maternel [565]. Une faible consommation de sodium durant l'enfance a d'ailleurs été associée avec une faible pression sanguine tant à court qu'à long terme [261;327]. De plus, les acides gras à longue chaîne sont présents dans le lait maternel mais pas ou peu dans les laits de formule. Ils ont été montrés comme jouant un rôle important dans l'endothélium vasculaire et peuvent contribuer à un abaissement de la pression sanguine chez l'enfant [237] et l'adulte [523]. Aussi, chez les enfants prématurés allaités par leur mère, Lucas *et coll.* suggérèrent qu'une croissance relativement lente pourrait favoriser une faible pression sanguine [478]. D'un point de vue métabolique, un allaitement maternel pendant 6 à 8 semaines réduit le risque d'élévation de marqueurs d'insulino résistance (32,33 split proinsuline, rapport leptine/adiponectine) [6] et il assurerait une protection contre le développement de l'obésité durant l'enfance (39-42 mois) [32]. Par conséquent, il semble que l'allaitement maternel peut limiter le développement de pathologies cardiométaboliques survenant plus tard dans la vie.

I - B-2-1-2-4 Alimentation artificielle

Depuis plusieurs années, il a été établi que les enfants prématurés possèdent de faibles défenses antioxydantes, les exposant par conséquent à des blessures oxydatives lorsqu'ils se retrouvent dans des conditions pro-oxydantes. Celles-ci pourraient être la résultante d'une part d'activités enzymatiques plus basses, telles que la catalase (CAT), la superoxyde dismutase cuivre/zinc (Cu/Zn SOD) ou la glutathion peroxydase (GPx) dont les différents rôles seront détaillés plus loin [263]. D'autre part, des niveaux plus bas de vitamines C, E et A ont été retrouvés chez des enfants prématurés (29-36 semaines d'aménorrhée) en comparaison à des enfants nés à terme (39-41 semaines d'aménorrhée) [63]; enfin les niveaux tissulaires de glutathion réduit (GSH) sont retrouvés jusqu'à 50 fois plus bas que chez les adultes [282] (voir la partie sur le stress oxydant, paragraphe I - B-2-9).

Du fait de l'immaturation de leur système digestif, les enfants prématurés ne peuvent pas être immédiatement nourris oralement, ils reçoivent une nutrition parentérale durant les premiers jours/semaines de vie. Il semble que les solutés infusés contenant une émulsion lipidique, peuvent affecter la pression sanguine du fait de contaminations par les produits issus de la photo-oxydation, tels les peroxydes organiques [543] et inorganiques [431], médiateurs de la vasomodulation [800]. Dans un modèle animal d'alimentation parentérale, Lavoie *et coll.* ont montré que l'infusion d'émulsion lipidique contaminée par des peroxydes augmente la pression sanguine, associée avec une altération de la vasomotricité [432]. De plus, les peroxydes peuvent également altérer certains paramètres métaboliques : une augmentation de la glycémie chez les enfants ayant reçu une solution de nutrition parentérale non protégée de la lumière a récemment été rapportée [386]. Ces données soulèvent l'importance de la protection de l'exposition à la lumière des solutions de

nutrition parentérales. Des recherches sont actuellement en cours afin de trouver des systèmes plus efficaces pour mieux protéger les nouveau-nés de ce stress oxydant postnatal.

I - B-2-2 Les glucocorticoïdes

La programmation développementale de l'hypertension et du diabète de type 2 a été associée avec une exposition durant la vie fœtale à un excès de glucocorticoïdes [679]. La 11 β hydroxystéroïde deshydrogénase de type 2 (11- β HSD-2) est une enzyme présente en abondance dans le placenta qui inactive les glucocorticoïdes en métabolisant le cortisol chez l'homme et la corticostérone chez le rat respectivement en cortisone et en 11-dehydrocorticostérone. Elle protège le fœtus d'une exposition à un excès de glucocorticoïdes maternels, par conséquent dans les conditions normales, les concentrations fœtales de cortisol sont plus basses que celles retrouvées dans la circulation maternelle [202].

I - B-2-2-1 Études animales

Une restriction durant la gestation aussi bien en protéines chez la rate [423] qu'en calories chez la brebis [822] ont conduit à une diminution de l'activité de la 11- β HSD-2, exposant par conséquent le fœtus aux forts niveaux de corticostérone endogène de la mère et cela pourrait expliquer l'augmentation de la pression sanguine observée à l'âge adulte. Également, l'inhibition de la 11- β HSD-2 par le carbenoxolone durant la gestation conduit à une diminution du poids de naissance et à une élévation de la pression sanguine à l'âge adulte [467].

Ces données montrent l'importance que la 11- β HSD-2 soit fonctionnelle pour assurer une protection du fœtus vis-à-vis des corticoïdes maternels et le prévenir d'une augmentation de sa pression sanguine plus tard dans la vie.

L'implication des glucocorticoïdes dans la programmation développementale de l'hypertension à l'âge adulte a été démontrée notamment par l'administration de dexaméthasone (qui n'est pas inactivée par la 11- β HSD-2, par conséquent peut traverser le placenta), durant la gestation chez la rate [69] et la brebis [589]. Cela a conduit dans la descendance directe à une augmentation de la pression sanguine non seulement chez l'adulte mais aussi chez le fœtus [182;394]. Cette augmentation de la pression sanguine s'accompagne chez le mouton de modifications dans la fonction vasculaire se manifestant par une augmentation de la résistance vasculaire fémorale chez le fœtus [182] et à l'âge de 4mois d'une altération de la vasoréactivité des artères coronaires notamment à l'AngII [642]. Parmi les mécanismes (Figure 2) reliant une exposition aux glucocorticoïdes en période fœtale et l'élévation de la pression sanguine on trouve une réduction dans le capital néphronique à la fois chez les rongeurs [189;568] et le mouton [832], une altération de l'activité du système rénine angiotensine (SRA), avec une augmentation de l'expression des récepteurs-1 et -2 de l'AngII (AT1R et AT2R) et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) [831;866].

L'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien (HHS) est une cible importante dans le programming et de nombreux modèles animaux ont montré qu'un excès de glucocorticoïdes prénataux affecterait l'activité de cet axe. En effet, une exposition au dexaméthasone ou à un inhibiteur de la 11- β HSD-2 augmente le niveau basal de la corticostérone plasmatique et la réactivité de l'axe HHS chez les rats adultes [455], chez le mouton [704], le cochon d'Inde [175;470] et chez les primates [771]. Cela peut s'exercer

via des effets permanents sur l'expression des gènes des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) et/ou minéralocorticoïdes (MR) présents au niveau de l'hippocampe, conduisant ainsi à une élévation de la pression sanguine [817].

La période d'exposition aux glucocorticoïdes semble être importante pour programmer une hypertension par la suite. Il semble exister chez le mouton une fenêtre critique en fin de gestation (au 139^e jour de gestation chez le mouton) durant laquelle les actions du cortisol contribuent au développement de la réactivité vasculaire à l'AngII [805], alors qu'une exposition aux glucocorticoïdes dès le début de la gestation est suffisante pour conduire à une élévation de la pression sanguine [193]. Chez le rat, une exposition survenant soit la dernière semaine de gestation, ou même simplement pendant 2 jours durant cette dernière semaine peut programmer une hypertension à l'âge adulte [455].

D'un point de vue métabolique, l'utilisation de dexaméthasone durant la gestation chez la rate a permis de montrer qu'une exposition excessive du fœtus aux glucocorticoïdes le programme pour développer une hyperglycémie et une hyperinsulinémie à l'âge adulte et ne semble pas être le résultat d'une activité anormale de l'axe HHS [553]. L'altération du métabolisme du glucose à la suite de l'administration de glucocorticoïdes anténataux semble être indépendante d'une restriction de croissance *in utero* (RCIU) [527].

Les mécanismes par lesquels des niveaux supra-physiologiques de glucocorticoïdes programment une hyperglycémie ne sont pas totalement élucidés (Figure 2). Ces effets pourraient être la conséquence d'altérations de la structure ou fonction du pancréas endocrine et/ou de la sensibilité à l'insuline des tissus cibles. Les glucocorticoïdes peuvent réguler l'expression d'enzyme hépatiques, notamment la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) qui est une enzyme limitante de la gluconéogenèse [608]. Chez le rat, à la suite d'une exposition prénatale aux glucocorticoïdes, uniquement durant la

dernière semaine de gestation, une augmentation dans l'activité et dans l'expression de PEPCK [552] a été observée. Une surexpression de PEPCK a été associée à une intolérance au glucose [778] et à un défaut de suppression de la gluconéogenèse par l'insuline [649].

I - B-2-2-2 Études humaines

Les glucocorticoïdes sont utilisés en pratique obstétricale principalement pour accélérer la maturation pulmonaire dans les cas de naissance d'enfants prématurés à venir [380], par conséquent réduisant la mortalité de ces enfants [166] et ne provoquent pas de retard de croissance comme chez le rat. La 11- β HSD-2 a été montrée comme étant diminuée dans les grossesses compliquées par une restriction de croissance intra utérin [508;683]. Chez l'homme la 11- β HSD-2 peut être inhibée par des xénobiotiques tels que la licorice ainsi que par des mutations dans le gène codant pour la 11- β HSD2 [221]. Les patients atteints du syndrome d'excès apparent en minéralocorticoïdes présentent des mutations dans le gène codant pour la 11- β HSD2, principalement dans les exons 3, 4 ou 5, par conséquent une non-expression de la 11- β HSD2 permettant ainsi la stimulation par les glucocorticoïdes des récepteurs de l'aldostérone. Cela est associé entre autres avec une réduction significative du poids de naissance [172] et à une hypertension hypokaliémique juvénile [769].

Les études à long terme d'une exposition fœtale aux glucocorticoïdes chez l'homme ne sont pas très nombreuses et ont peu de recul [11]. Les enfants prématurés ayant été exposés aux glucocorticoïdes et qui ont survécu ont simplement atteint la trentaine.

Certaines études montrent aussi bien une augmentation de la tension artérielle à l'adolescence chez des enfants qui ont été exposés *in utero* aux glucocorticoïdes [196], ou une absence d'augmentation voir même une tension artérielle plus basse [185]. La

comparaison entre l'administration de glucocorticoïdes sous forme d'une injection ou d'injections répétées pour regarder les effets à long terme sur la tension artérielle, n'a, à ma connaissance, jamais été réalisée.

Concernant les paramètres métaboliques, des enfants ayant été exposés *in utero* aux glucocorticoïdes présentent à l'âge adulte non pas une augmentation dans la prévalence mais dans le risque de survenue du diabète de type 2 [169].

Comme chez l'animal, l'axe HHS chez l'homme peut être programmé par l'environnement *in utero*, notamment après une exposition aux glucocorticoïdes [500] Chez l'homme, l'accès à la sensibilité des récepteurs aux glucocorticoïdes est difficile à mettre en évidence. Des niveaux élevés de cortisol urinaire et plasmatique ont été retrouvés respectivement chez des enfants [147] et des adultes [601] avec un petit poids de naissance, ainsi qu'une augmentation de l'axe HHS en réponse à une stimulation par l'hormone adrenocorticotrophique (ACTH) [634].

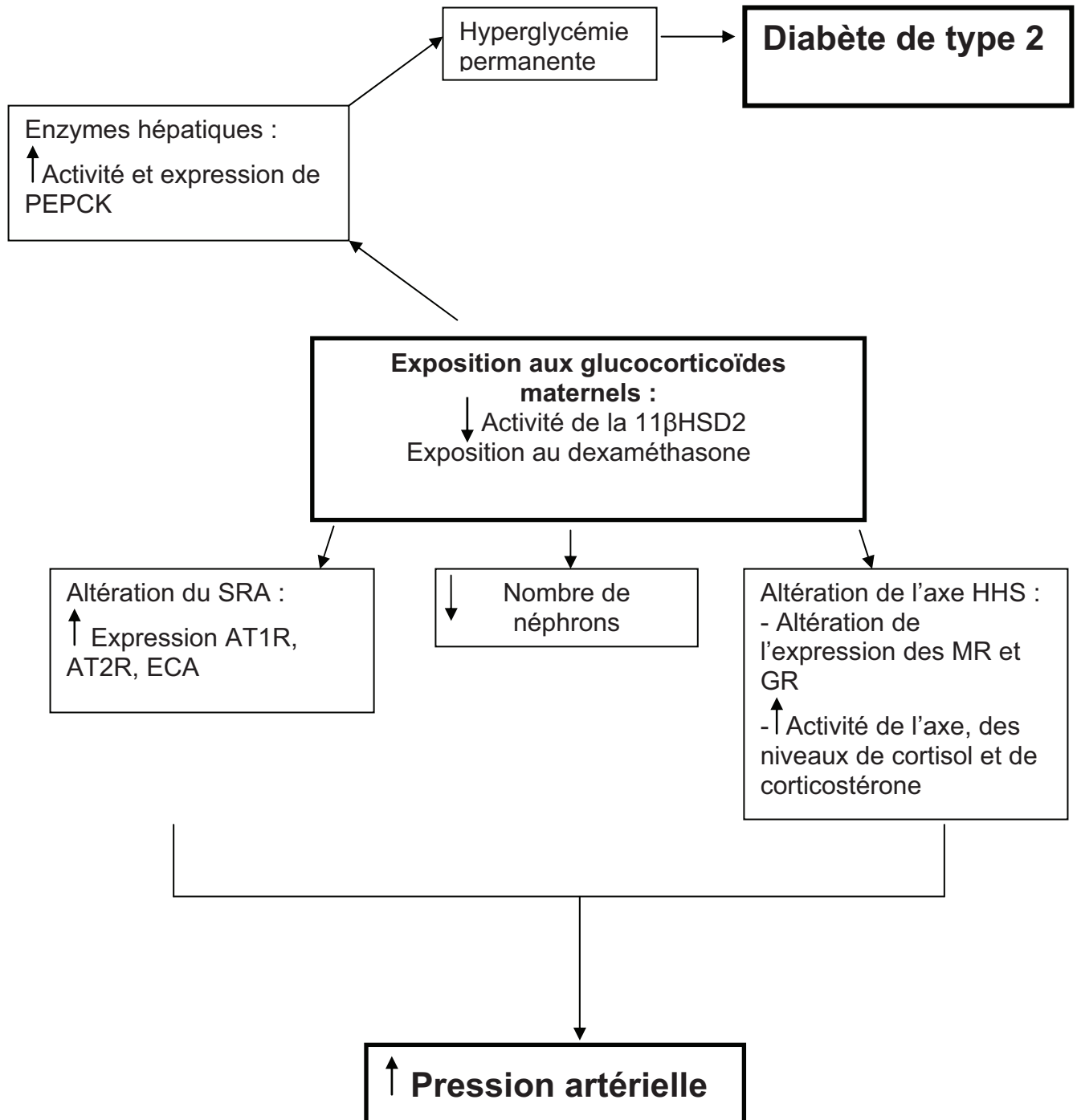


Figure 2 : Principaux mécanismes conduisant à une élévation de la pression sanguine et à la survenue d'un diabète de type 2 à la suite d'une exposition fœtale aux glucocorticoïdes d'origine maternelle.

PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase; **11-βHSD-2** : 11β hydroxystéroïde deshydrogénase de type 2; **SRA**: système rénine angiotensine; **AT1R** : récepteur de type-1 de l'angiotensine II; **AT2R** : récepteur de type-2 de l'angiotensine II;

ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine II; **HHS** : axe hypothalamo hypophysaire; **MR** : récepteur aux minéralocorticoïdes; **GR** : récepteur aux glucocorticoïdes

I - B-2-3 Modulations rénales

Le rein joue un rôle important dans la programmation développementale de l'hypertension artérielle. Une réduction du nombre de néphrons a été impliquée à la fois dans l'augmentation de la pression sanguine et dans l'altération de la fonction rénale à long terme [97;786].

I - B-2-3-1 Études animales

Durant la gestation, une restriction protéiques [425], une ligature partielle des artères utérines [509;599], une exposition à de hauts niveaux de glucocorticoïdes (dexaméthasone) [130], un diabète maternel [541], une hyperinsulinémie maternelle [613], une déficience en vitamine A [79] ont conduit dans la descendance à avoir un faible poids de naissance et un nombre réduit de néphrons. Cela peut avoir comme conséquences des altérations dans l'expression des gènes et des facteurs de croissance nécessaires au bon déroulement de la néphrogenèse [7] et dans les cas d'insuffisance placentaire, il a été montré qu'une perte de néphrons pouvait être la conséquence d'une augmentation au niveau rénal de l'apoptose (diminution des protéines anti-apoptotiques et augmentation des protéines pro-apoptotiques), ce qui conduit à une glomérulosclérose et à une augmentation de la pression sanguine artérielle [599]. Ces mécanismes sont mentionnés ci-dessous dans la Figure 3.

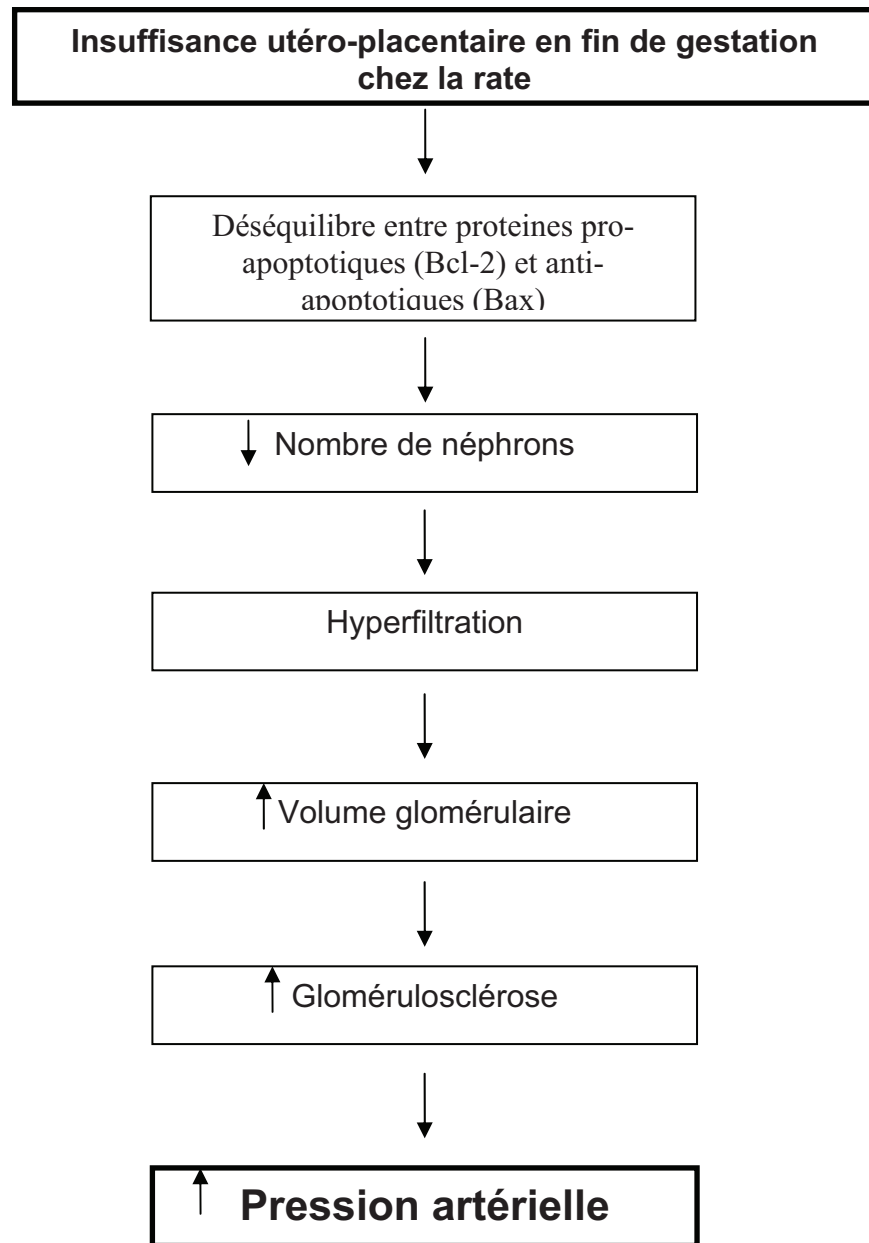


Figure 3 : Relation entre insuffisance utéro-placentaire et l'augmentation de la pression sanguine implication des protéines clés de l'apoptose. Adaptée à partir de [506].

La néphrogenèse chez le rat se termine entre le 8^e et le 10^e jour de vie postnatale, par conséquent elle peut être influencée par l'environnement postnatal, notamment par la nutrition postnatale. En effet, Boubred *et coll.* [89] ont montré qu'une surnutrition dès la naissance (obtenue par une réduction dans la taille des portées) conduit à une augmentation de la prise de poids pendant la période de lactation, une augmentation du nombre de glomérules et à une réduction du volume glomérulaire. Mais cela s'accompagne d'une élévation de la pression sanguine et d'une glomérulosclérose à l'âge adulte. Par conséquent ces dysfonctions peuvent se développer indépendamment d'un nombre réduit de néphrons. Les mécanismes ne sont pas clairement établis mais une sur-activation de l'axe HHS induite par une hyperinsulinémie et une hyperleptinémie après une surnutrition en période postnatale pourrait être envisagée [612].

I - B-2-3-2 Études humaines

Chez l'homme, le nombre total de néphrons est compris entre 300 000 à 1 million, avec une moyenne à 600 000. La néphrogenèse est complétée vers 32-34 semaines de grossesse, et il est admis qu'il n'y a pas de formation de nouveaux néphrons après la naissance, par conséquent un déficit néphronique observé à la naissance persistera tout au long de la vie. Après la naissance, la maturation postnatale consiste entre autre à une augmentation de la taille glomérulaire et de la longueur tubulaire, processus impliquant le SRA rénal.

Pour Brenner *et coll.* [97;98], l'hypertension essentielle observée à la suite d'un RCIU est la conséquence d'une réduction du nombre de néphrons qui conduit à une rétention en sodium et à une hypertension. Plus précisément, une réduction dans le nombre de néphrons conduit à une hyperfiltration, une élévation de la pression dans les néphrons présents, suivie

d'une glomérulosclérose aboutissant à la perte des néphrons. Par conséquent, chez ces individus la pression sanguine moyenne continue à augmenter pour permettre le maintien de la fonction hémodynamique avec comme conséquence une blessure rénale progressive et irréversible [99;483;484].

Les données issues de la famine en Hollande ont permis de montrer qu'une malnutrition survenant en milieu de gestation, correspondant à la période de néphrogenèse, conduit dans la descendance à l'âge adulte à une albuminurie et à une diminution dans le nombre de néphrons [579]. Les individus nés petits pour l'AG sont à risque de développer des maladies chroniques du rein [297;337;792], les enfants prématurés sont plus vulnérables pour le développement de pathologies rénales. Il a été montré que chez ces enfants, il y avait un arrêt de la néphrogenèse, avec une formation incomplète de néphrons [641], et durant l'enfance la taille des reins était plus petite [675].

I - B-2-3-3 Changements dans le nombre de néphrons et pression sanguine

Concernant l'association entre une réduction du nombre de néphrons et la programmation à long terme de l'hypertension et des maladies rénales que je viens de vous décrire à la fois chez l'animal et l'homme, une précision s'impose. Brenner *et coll.* ont suggéré qu'une réduction relativement importante dans le nombre de néphrons chez l'homme (de plus de 50 %) [98] et chez l'animal (de plus de 70 %) [700] conduira au développement d'une hypertension relativement rapidement. Alors que dans le cas d'une réduction modérée dans le nombre de néphrons, l'hypertension et les maladies rénales se développeront mais en présence de facteurs additionnels, notamment des facteurs nutritionnels [41;98;785].

Par conséquent ces données suggèrent que des perturbations durant la période de néphrogenèse peuvent programmer à long terme le développement d'une hypertension et de maladies rénales chroniques.

I - B-2-4 Le système rénine angiotensine

Depuis les travaux de Goldblatt *et coll.* en 1934 sur l'hypertension rénovasculaire, il est devenu évident que le SRA joue un rôle majeur dans l'hypertension [271]. En effet, il régule la pression sanguine, l'homéostasie des fluides dans les conditions physiologiques et cela grâce à son effecteur principal, l'AngII. Brièvement, la formation de l'AngII est initiée par la rénine qui clive l'angiotensinogène en Angiotensine I qui est ensuite clivé par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) en AngII. Dans des conditions pathologiques telles que l'hypertension, l'athérosclérose et le diabète de type 2, l'AngII contribue au travers de ses actions vasoconstrictrices, mitogéniques, pro-inflammatoires et pro-fibrotiques, à altérer le tonus vasculaire, la dysfonction endothéliale, le remodelage vasculaire, et l'inflammation vasculaire [281;752;757;823]. Le fait que le SRA soit un facteur causal [422;686] ou un facteur contributeur [203] de l'hypertension artérielle fait encore débat.

I - B-2-4-1 Études animales

Une restriction de protéines administrée durant toute la gestation chez la rate conduit à une augmentation de l'expression du récepteur AT1 aussi bien au niveau cérébral qu'au niveau des artères carotidiennes, associée avec une augmentation de la pression sanguine [610;855]. L'infusion intracébroventriculaire ou intraveineuse d'antagoniste d'AT1 chez la descendance de mères ayant été exposées à une diète faible en protéines *in utero* a

normalisé la pression artérielle [610;855]. Également, une restriction de protéines administrée durant la gestation chez la rate conduit dans la descendance à augmenter la vasoréactivité à l'AngII [855], l'activité de la rénine plasmatique et les niveaux de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). L'utilisation d'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'AngII (iECA) a permis de normaliser l'élévation de la pression sanguine rencontrée dans ces modèles [422;491;611].

Le SRA est fortement exprimé durant le développement rénal [291]. L'administration d'une diète faible en protéines *in utero* [838], ou une insuffisance placentaire [283] chez la rate en gestation ont conduit dans la descendance au niveau rénal à une suppression du SRA qui s'accompagne d'une réduction du nombre de néphrons et d'une augmentation de la pression sanguine à l'âge adulte.

Ces données ont permis de montrer un rôle majeur du SRA central et périphérique dans la programmation développementale de la pression sanguine à l'âge adulte à la suite d'une privation anténatale en nutriments.

L'exposition aux glucocorticoïdes chez le fœtus peut aussi modifier le SRA, en augmentant l'expression d'AT1 [14] chez le rat, ainsi que la vasoréactivité à l'AngII [642;643] chez le mouton nouveau-né pouvant ainsi expliquer l'augmentation de la pression sanguine à l'âge adulte.

I - B-2-4-2 Études humaines

Une augmentation de l'activité de la rénine dans le sang de cordon, ainsi que du nombre de cellules contenant la rénine au niveau rénal a été retrouvée chez les nouveau nés avec un retard de croissance [388;740]. Le traitement avec un iECA après le premier trimestre de

gestation chez la femme conduit au développement chez le fœtus de malformations congénitales [155] (oligohydramnios, retard de croissance intra-utérin, dysplasie rénale, blessure rénale, anurie et même conduire au décès) qui sont sûrement la conséquence d'un défaut de développement rénal induit par l'administration d'iECA [734].

Ces données suggèrent un rôle important du SRA dans le développement rénal et vasculaire normal chez l'homme.

I - B-2-5 Insuffisance placentaire

La croissance fœtale est dépendante du transfert continu d'oxygène et de nutriments à travers le placenta. Il semble bien établi que l'insuffisance utéro placentaire, plus qu'une malnutrition maternelle, soit la principale cause de RCIU dans les pays occidentaux [315]. Un faible poids de naissance pour l'âge gestationnel est associé avec une augmentation du risque de développer des maladies cardiovasculaires et métaboliques à l'âge adulte [449]. Les facteurs qui pourraient être responsables de ce défaut de croissance et de développement sont nombreux. Il a entre autre été montré que le facteur de croissance ressemblant à l'insuline (IGF)-2 est important pour le développement et la croissance fœtale, notamment parce que IGF-2 est produit par le placenta [177;684].

I - B-2-5-1 Études animales

L'utilisation de modèles animaux semble être le meilleur modèle pour étudier les effets d'une restriction de croissance intra utérine (RCIU) sur les paramètres vasculaires et métaboliques. Pour cela, l'artère utérine va être ligaturée (une ou les deux), conduisant à une réduction de l'apport sanguin au fœtus. Une insuffisance placentaire chronique chez le

cochon d'Inde conduit à une diminution de l'expression d'insuline-like growth factor-2 (IGF-2) au niveau placentaire [126], alors que chez le rat l'expression d'IGF-2 se trouve être augmentée, cela peut sûrement s'expliquer comme étant un mécanisme compensatoire pour favoriser la croissance fœtale [312].

Chez la rate gestante, une réduction de la perfusion placentaire a conduit dans la descendance directe à un petit poids de naissance, à une augmentation dès l'âge de 4 semaines de la pression sanguine [20] associée à une altération de la vasoréactivité [587], et en vieillissant à une augmentation de la pression pulsée [678]. Pour expliquer ces phénomènes, un nombre réduit de néphrons à la suite d'une diminution de la perfusion placentaire peut être envisagé (voir mécanismes décrits dans le paragraphe I - B-2-3, ci-dessus).

Une insuffisance placentaire peut aussi altérer les paramètres métaboliques. En effet, une ligature des artères utérines chez la rate conduit sa descendance à développer une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline [357] et une hyperleptinémie [312]. Cela pourrait s'expliquer par une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique qui pourrait contribuer à la relâche de la noradrénaline [444] et de l'adrénaline [179] induisant une résistance à l'insuline dans le muscle squelettique. Également, une augmentation du stress oxydant a été retrouvée dans le liquide amniotique après réduction de la perfusion utéro-placentaire [312]. Il n'est pas à exclure que cela conduise à un diabète de type 2 par la suite [698]. Un diabète gestationnel chez la rate après une insuffisance utéro-placentaire chez la mère de ces rates, conduit dans la descendance à l'âge adulte (deuxième génération) au développement d'un diabète de type 2, la conséquence d'un défaut à la fois dans la sécrétion et l'action de l'insuline [85].

I - B-2-5-2 Études humaines

Il a été montré dans des grossesses compliquées par un RCIU et une prééclampsie, que le flot sanguin était diminué [301], que la taille du placenta était réduite soit due à un défaut dans les mécanismes de croissance et d'angiogenèse placentaire ou bien à la suite d'une invasion endovasculaire inadéquate des artères spirales du trophoblaste [103]. Par conséquent, cela réduit le flot sanguin à l'intérieur de l'espace intervilloux du placenta et pourrait conduire à diminuer l'apport du fœtus en nutriments notamment en oxygène. L'hypoxie et les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) altèrent la fonction des protéines du placenta et les voies métaboliques [536]. En effet, un RCIU est associé avec une augmentation au niveau placentaire des cytokines inflammatoires, un défaut d'angiogenèse et dans l'expression de gènes régulant le métabolisme des nutriments, et une diminution de l'expression de facteurs de croissance [257;358;724].

Depuis la fin des années 1980, de nombreuses études ont montré une association entre un RCIU et le développement du syndrome métabolique plus tard dans la vie, incluant une hypertension artérielle, une hypercholestérolémie, un défaut de tolérance au glucose, et un diabète de type 2 [53;54;295;451;569;646]. Aussi bien en Europe [451;646], initialement à Hertfordshire en Grande Bretagne [49;295;569], qu'en Asie [715] et en Afrique [454].

Les mécanismes programmant le développement d'une hypertension et d'un diabète de type 2 après une insuffisance utero placentaire sont mentionnés ci-dessous (Figure 4).

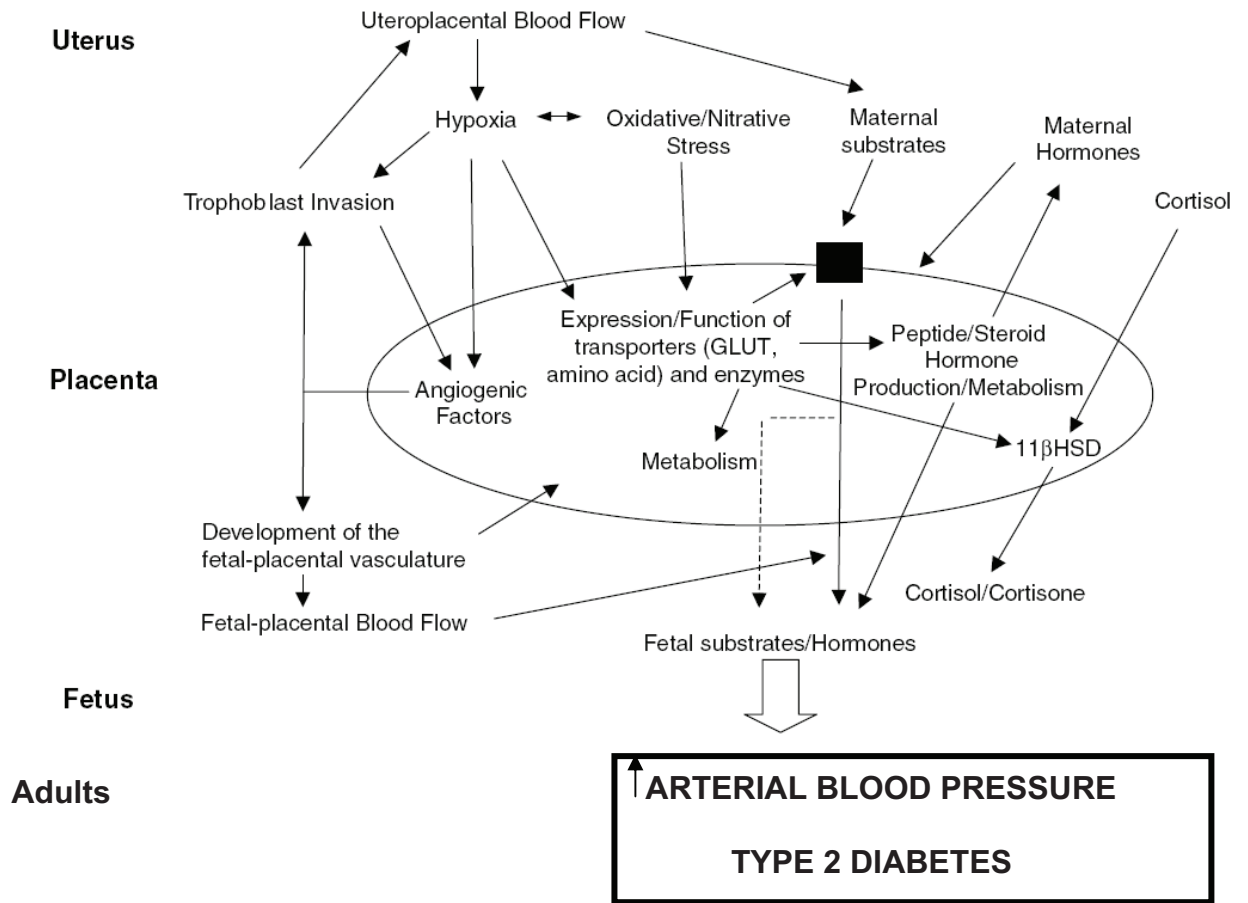


Figure 4 : Programmation développementale de l’hypertension et du diabète de type 2 à la suite d’une insuffisance utéro-placentaire. Adaptée de [536].

11-βHSD-2 : 11β hydroxystéroïde deshydrogénase de type 2

I - B-2-6 Système nerveux sympathique

I - B-2-6-1 Études animales

Une altération du système nerveux sympathique mise en évidence par une augmentation des niveaux de catécholamines circulantes [322;364;595] a été observée dans des modèles animaux avec RCIU et peut contribuer à altérer le métabolisme énergétique et la fonction cardiovasculaire. Cela a été observé aussi bien chez des rats ayant été exposés à une diète faible en protéines *in utero* [595], qu'après une insuffisance placentaire chez le rat [322] et le mouton [364].

La dénervation rénale chez des rats avec RCIU, à la suite d'une insuffisance placentaire, a permis de normaliser la pression sanguine, traduisant par conséquent l'importance des nerfs rénaux afférents, et donc du système nerveux sympathique, dans la programmation de l'hypertension à l'âge adulte [21].

I - B-2-6-2 Études humaines

Chez l'homme, plusieurs études ont rapporté une augmentation de l'activité sympathique aussi bien par une mesure indirecte, en mesurant le pouls au repos [600], que de manière directe en étudiant la réponse de la fonction cardiaque au stress [349] et en mesurant l'activité nerveuse sympathique au niveau musculaire [84]. Une activité efférente sympathique réduite en conditions basales, mais similaire en conditions de stress a été rapportée dans une étude de 9 jeunes adultes nés avec un petit poids de naissance (< 2500g)

vs 9 contrôles [816]; cette étude suggère que la réponse sympathique au stress est majorée chez les individus nés avec un petit poids de naissance.

Par conséquent, une altération du système nerveux sympathique à la suite d'une perturbation du milieu *in utero* pourrait participer à la programmation développementale de l'hypertension et du diabète de type 2.

I - B-2-7 Hormones sexuelles

I - B-2-7-1 Études animales

Des différences de genre ont été observées dans la programmation développementale de l'hypertension. Plusieurs études ont rapporté chez des RCIU à la suite d'une insuffisance placentaire [20], d'une restriction calorique ou protéique maternelle [572;839], d'une surnutrition [385] ou d'une hyperinsulinémie maternelle [111] une augmentation de la pression sanguine uniquement chez les mâles, les femelles étant épargnées. Également, des dysfonctions vasculaires après une exposition à une hypoxie ou à une restriction calorique maternelle [313;572] ont été uniquement observées chez les mâles.

La castration abolit l'hypertension observée chez les mâles [561] tandis qu'une ovariectomie induit une augmentation de la pression sanguine chez les femelles [560] avec RCIU. Ces données suggèrent un rôle protecteur des œstrogènes sur l'élévation de la pression sanguine

« programmée » par des conditions délétères en période anténatale, tandis que la testostérone contribuerait au développement de l'hypertension (voir Figure 5).

Cet effet protecteur des œstrogènes vis à vis de l'élévation de la pression sanguine pourrait impliquer entre autre le SRA rénal. Les œstrogènes peuvent moduler les actions

vasoconstrictrices et vasodilatatrices du SRA [104] notamment par la voie de l'enzyme de conversion de type 2 de l'AngII (ECA2) qui génère l'Angiotensine (1-7) et favorise un effet vasodilatateur. Cela conduit à une normalisation de la pression sanguine chez des femelles avec RCIU [560].

La testostérone est un important régulateur de la croissance et la différenciation durant le développement fœtal [174;791]. Une perturbation de l'environnement intra utérin peut conduire à des changements de l'axe HHS et ainsi altérer l'axe hypophyso-gonadique [668], menant à une altération des niveaux de testostérone. La testostérone peut aussi influencer le SRA au niveau du tubule proximal en augmentant l'activité de l'échangeur NA/H (favorisant la réabsorption du sodium) pouvant ainsi augmenter la pression sanguine [618]. L'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène au niveau du rein et du foie est dépendante de la testostérone [141;210].

D'un point de vue métabolique, peu d'études animales à ma connaissance ont montré une différence de genre dans la programmation fœtale des maladies métaboliques. Une restriction de protéines durant la gestation conduit dans la descendance à une différence de comportement dans la consommation de macronutriments selon le sexe: les mâles consomment plus de gras et moins de glucides, tandis que les femelles consomment plus de protéines et moins de glucides et ont une masse adipeuse abdominale augmentée par conséquent sont plus obèses et plus enclines à développer un diabète de type 2.

I - B-2-7-2 Études humaines

Le risque de survenue de pathologies cardiovasculaires n'est pas le même entre les femmes et les hommes dans la population générale. Dans le contexte de l'étude des influences de la

période périnatale sur les pathologies adultes, des différences entre les sexes sont aussi notées. Chez les femmes le taux de mortalité par maladies cardiovasculaire (maladies coronariennes, AVC, maladies circulatoires) est le plus élevé chez celles dont le poids à la naissance était en dessous de la moyenne et chez celles dont le poids à l'âge d'un an était supérieur à la moyenne. Chez les hommes, ce même taux est le plus élevé chez ceux dont le poids à la naissance et le poids à l'âge d'un an étaient sous la moyenne [569].

Une relation inverse entre le poids à la naissance et la pression sanguine a été montrée tant chez les hommes que les femmes [635;745] mais la relation inverse entre le poids de naissance et les maladies coronariennes à l'âge adulte est plus importante chez les femmes dont le poids de naissance était dans les plus petits percentiles [635].

Un petit poids de naissance est associé avec des altérations dans la physiologie cardiovasculaire genre-dépendante durant l'enfance : les garçons ont une résistance vasculaire systémique plus élevée tandis que les filles ont une augmentation de l'activité sympathique cardiaque [363]. Une association entre un faible poids de naissance et le développement chez le jeune adulte de maladies chroniques rénales a été observée uniquement chez les hommes [462].

D'un point de vue métabolique, une résistance à l'insuline chez la mère est associée à une résistance à l'insuline uniquement chez ses filles [533]. Également, le fait d'avoir un père diabétique augmente le risque de développer un diabète de type 2 plus tard dans la vie uniquement pour la descendance mâle [466].

Ces données suggèrent que des facteurs liés au genre, comme les œstrogènes, ont un effet protecteur sur le risque de développer une hypertension et un diabète de type 2.

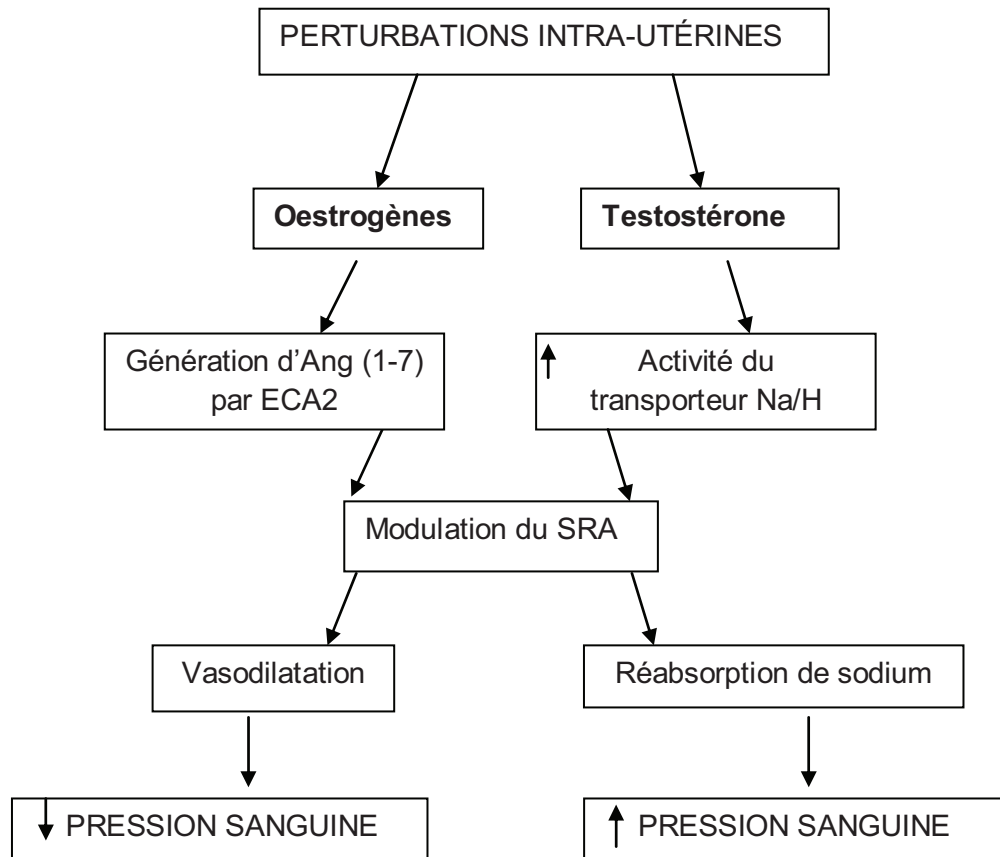


Figure 5 : Modulation de la pression sanguine par les hormones sexuelles.

ECA2 : enzyme 2 de conversion de l'angiotensine II; **SRA** : système rénine angiotensine

I - B-2-8 Facteurs épigénétiques

Il est envisagé que des influences environnementales précoces dans le développement pouvaient induire des variations épigénétiques pouvant par conséquent affecter de manière permanente le métabolisme et le risque de maladies cardiovasculaires.

I - B-2-8-1 Définition

L'épigénétique peut se définir comme l'étude des changements dans l'expression des gènes qui ne sont pas provoqués par des changements dans la séquence d'ADN [636]. Cela permet à plusieurs gènes d'être actifs alors que d'autres restent silencieux de manière transitoire ou permanente. Les mécanismes épigénétiques peuvent déterminer non seulement l'expression constitutive des gènes, mais également altérer de manière inappropriée l'expression des gènes en réponse aux signaux extracellulaires. Les facteurs épigénétiques comprennent plusieurs strates interconnectées et interdépendantes : des changements chimiques de l'ADN, tels que les méthylations, l'interaction protéines-ADN tels que les histones qui interagissent avec la molécule d'ADN au niveau du nucléosome pour former la chromatine, des coactivateurs et des corépresseurs. La meilleure caractérisation des modifications épigénétiques de l'ADN est la méthylation des résidus cytosine à l'intérieur des dinucléotides CpG. Les modifications épigénétiques ont en principe un certain degré d'instabilité et sont réversibles, contrairement aux mutations dans la séquence de l'ADN qui elles sont irréversibles. Elles ont ainsi un caractère transitoire dans la vie courante: au cours de la journée, l'expression des gènes est modulée par les signaux moléculaires des rythmes circadiens.

I - B-2-8-2 Facteurs influençant la méthylation

Des patterns spécifiques de méthylation CpG sont établis très tôt durant le développement et se propagent durant la réplication de l'ADN par la DNA méthyltransférase-1 [367]. Par conséquent, il a été envisagé qu'une altération de la nutrition très tôt dans le développement pourrait altérer les processus de méthylation. En effet, la nutrition précoce peut influencer

la méthylation de l'ADN en fournissant des groupements méthyl pour les réactions de méthylation, ces réactions sont fortement dépendantes des donneurs de methyl et des cofacteurs alimentaires. Par exemple, la choline et la méthionine provenant de l'alimentation sont des sources majeures d'unité à un carbone, l'acide folique, la vitamine B12 et le pyridoxal phosphate sont des cofacteurs critiques dans le métabolisme du méthyl [782]. L'administration d'une diète faible en protéines à une rate gestante est associée avec une réduction globale de la méthylation, traduisant un déficit en acides aminés spécifiques tels que la glycine [631]. Un déficit en glycine peut conduire à une augmentation dans les niveaux de méthionine et d'homocystéine altérant ainsi les processus de méthylation [354]. Par conséquent la glycine exerce un effet protecteur vis-à-vis d'une augmentation des niveaux de méthionine et d'homocystéine qui ultimement affecteront la méthylation de l'ADN.

D'autres éléments peuvent moduler la méthylation au cours du développement fœtal : les glucocorticoïdes peuvent avoir une action déméthylante [862] et les espèces réactives de l'oxygène (ERO) pourraient aussi modifier la méthylation des cytosines [131;779]. Une des hypothèses envisagée pourrait être que la guanine serait remplacée par l'adduit 8-hydroxyguanosine altérant par conséquent la méthylation des cytosines adjacentes par le stress oxydant (voir chapitre sur le stress oxydant introduction I - B-2-9).

I - B-2-8-3 Altération de la méthylation

L'activité de méthylation de l'ADN est la plus importante durant la vie fœtale. Des altérations de la méthylation vont se traduire soit par une augmentation de la méthylation (hyperméthylation) ou par une inhibition de la méthylation (hypométhylation).

Une modification de la méthylation de certains gènes impliqués dans la régulation de la pression sanguine a été observée dans certains modèles animaux. L'administration d'une diète faible en protéines durant la gestation de la rate a conduit dans sa descendance à une réduction de la méthylation du gène codant pour le récepteur AT1b de l'AngII [83], et du gène codant pour l'enzyme de conversion de l'endothéline-1 (ECE-1) [250]. Cela traduit un lien direct entre les facteurs environnementaux maternels qui sont à l'origine de l'hypertension et les modifications épigénétiques du promoteur du gène. Un RCIU, conséquence d'une insuffisance placentaire chez la rate en gestation à la suite d'une ligature de l'artère utérine, conduit dans sa descendance à une hypométhylation de l'ADN et une altération de l'acétylation des histones en relation avec des modifications du métabolisme hépatique monocarboné de la voie des folates-méthionine, pouvant contribuer à la pathogénèse du diabète et de dyslipidémie [485].

Une hyperméthylation a aussi été observée et pourrait être indirectement associée à l'hypertension. L'activité de la 11 β -HSD-2 est une enzyme importante pour la régulation de la pression sanguine. Une méthylation plus importante des îlots CpG au niveau du promoteur et de l'exon 1 de la 11- β HSD-2 a été trouvée dans les tissus et lignées cellulaires exprimant faiblement 11- β HSD-2, (et pas dans les tissus et lignées cellulaires exprimant fortement la 11 β -HSD-2). La diminution d'expression de cette enzyme est associée avec une sur-activation des récepteurs aux minéralocorticoïdes par le cortisol, conduisant à une rétention de sodium, une hypokaliémie et une augmentation de la pression sanguine (sensible au sel) [23].

I - B-2-8-4 Effet transgénérationnel

Il est envisagé maintenant que des modifications épigénétiques de la lignée germinale par des méthylations stables peuvent être transmises aux générations futures.

La première étude qui montra qu'une restriction maternelle en protéines chez la rate peut conduire à une diminution dans la méthylation des promoteurs de gènes des récepteurs aux glucocorticoïdes et aux peroxisome proliferator activated receptors alpha (PPAR α) dans la descendance directe, mais également dans la génération F2 a été faite par Burdge *et coll.* [109], suggérant par conséquent que la nutrition durant la gestation a un impact critique non seulement sur sa propre descendance, mais également sur les générations futures.

Chez l'humain, des études ont aussi rapporté des éléments indiquant une transmission intergénérationnelle, conséquences de perturbations anténatales. Dans l'étude de trois générations successives nées dans les années 1890, en Suède, une bonne récolte survenant durant la période prépubertaire du grand-père s'est traduite par une consommation plus importante de glucides et un risque relatif significativement augmenté de développer un diabète de type 2 chez le petit fils. Une consommation plus importante de glucides en période pré-pubertaire chez le père n'a pas été associée avec une augmentation du risque de développer un diabète [370], alors que si cela se produit pendant la lactation, une hyperinsulinémie peut se développer à la première génération, qui se maintiendra à la seconde [710].

Il est intéressant de remarquer que les modifications épigénétiques ne s'établissent pas forcément en période fœtale. Il a été montré qu'une augmentation des soins maternels à des rats nouveau-nés se traduit par une meilleure réponse au stress à l'âge adulte. Les rats qui ont reçu des soins maternels importants présentent dès les premières semaines de vie

une déméthylation dans le promoteur du gène du récepteur aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe (dans le cas de " mauvaise mère ", le promoteur du gène du récepteur aux glucocorticoïdes restera méthylé). À l'âge adulte, les femelles auront à leur tour un comportement maternel positif. Il est important de noter ici que ces modifications épigénétiques ne se mettent en place que pendant une courte période, durant les tous premiers jours de vie [812].

Les modifications épigénétiques pourraient très probablement participer à la programmation de l'hypertension artérielle et des maladies métaboliques et restent un champ d'investigation en pleine expansion.

I - B-2-9 Stress oxydant

I - B-2-9-1 Définition du stress oxydant

La notion de stress oxydant dans les systèmes biologiques a été initiée suite aux connaissances obtenues sur l'activation de l'oxygène moléculaire (O_2) et sa potentielle toxicité. Le concept de stress oxydant, développé initialement par Sies *et coll.* [694] a évolué et on définit maintenant le stress oxydant comme un déséquilibre entre les niveaux d'oxydants et antioxydants en faveur des oxydants, déséquilibre pouvant causer des dommages [693]. Un oxydant est défini comme toute molécule acceptant un ou plusieurs électrons, devenant ainsi une substance réduite. La molécule d' O_2 , du fait de sa configuration électronique, a un caractère oxydant qui se manifeste par son avidité vis-à-vis des électrons. L'oxygène est à l'origine de la formation d'oxydants radicalaires, capables d'exister avec un électron non apparié, et d'oxydants non radicalaires ayant une configuration électronique stable. Ces deux classes d'oxydants sont regroupées sous la

catégorie des ERO et des espèces réactives de l'azote (ERN). Elles comprennent des espèces radicalaires et non radicalaires (Tableau 3).

Tableau 3 : Principales espèces réactives dans les systèmes biologiques.

| Radicaux libres | | Espèces non-radicalaires | |
|--|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| ERO | ERN | ERO | ERN |
| $O_2^{\bullet-}$: anion superoxide | $\bullet NO$: monoxyde d'azote | $ONOO^-$: anion peroxydrite | $ONOO^-$: anion peroxydrite |
| $\bullet H_2O$: radical hydroperoxyl | $\bullet NO_2$: dioxyde d'azote | $OONOO^-$: anion peroxydrite | $OONOO^-$: anion peroxydrite |
| $\bullet OH$: hydroxyl | $\bullet NO_3$: nitrate | H_2O_2 : peroxide d'hydrogène | $ONOOH$: acide peroxydriteux |
| $RO\bullet$: radical alkoxyl | | O_2 : oxygène singulet | $ROONO$: alkyl peroxydrite |
| $ROO\bullet$: radical alkoperoxyl | | O_3 : ozone | HNO_2 : acide nitreux |
| $ROOH\bullet$: radical hydroxyperoxyl | | $HOCl$: acide hypochloreux | NO^+ : cation nitrosyl |
| | | $ROOH$: peroxides organiques | NO^- : anion nitrosyl |

La perturbation du statut oxydant intracellulaire peut être induite soit par la production excessive d'oxydants radicalaires (radicaux libres) et/ou non radicalaires, principalement dérivés de l'oxygène, soit par la diminution de la capacité de défense antioxydantes, pouvant causer des dégâts plus ou moins irréversibles. Des oxydants, dits primaires ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet NO$, $\bullet OH$), sont générés physiologiquement. Leurs effets sont proportionnels à l'intensité et à la durée de leur production qui, lorsqu'elle est transitoire et modérée, participe à la régulation redox de l'expression de nombreux gènes afin de moduler certaines fonctions cellulaires, aux mécanismes de défense permettant la destruction des agents

pathogènes ou potentiellement de cellules tumorales par apoptose. D'un point de vue vasculaire, ils participent à la signalisation cellulaire normale [280] en régulant la contraction, la relaxation et la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) [625;756;856]. Lorsque cette production devient récurrente ou chronique, la balance entre la production d'oxydants et les systèmes de détoxification cellulaire est perturbée de manière continue; on parle alors de stress oxydant. Un contrôle précis du niveau d'oxydants par les différents systèmes antioxydants intra- et extracellulaires est donc indispensable pour maintenir l'intégrité cellulaire et tissulaire. Les défenses antioxydantes permettent à la cellule de s'adapter continuellement à la quantité d'ERO/ERN générée (homéostasie redox cellulaire) afin de limiter leurs effets nocifs et de prévenir le stress oxydant. Même si celles-ci sont essentielles dans divers processus cellulaires, elles peuvent aussi s'avérer hautement nocives : elles peuvent se lier à certaines macromolécules (lipides, protéines et glucides) en induisant leur oxydation qui, en retour, peut causer des dommages membranaires, structuraux et fonctionnels (exemple : inactivation d'enzymes) [497]. La production excessive ou incontrôlée d'ERO et/ou d'ERN est souvent associée au développement de nombreuses pathologies incluant l'athérosclérose, le diabète, le cancer et certaines maladies dégénératives [393].

I - B-2-9-2 Les radicaux libres

Un radical libre est un atome, une molécule ou une espèce chimique contenant un ou plusieurs électrons non appariés [24]. Généralement transitoire, ce déséquilibre structural est comblé par l'acceptation d'électrons venant d'une autre molécule ou par le transfert des électrons non appariés vers une autre molécule. Les électrons libres augmentent grandement la réactivité des molécules et les rendent instables. Les réactions d'acceptation

et de transfert d'électrons dépendent de l'instabilité du radical libre considéré : lorsque modérée, l'instabilité va favoriser l'acceptation d'électrons alors que le transfert d'électrons se produira en cas de grande instabilité. De plus, la spécificité du radical va diminuer avec la grandeur de son instabilité. C'est ainsi en raison de leur manque de spécificité réactionnelle, que les radicaux libres sont susceptibles de réagir avec de nombreuses et diverses molécules biologiques (ADN, protéines, lipides, glucides), les oxyder et alors retrouver un état énergétique plus stable.

Une grande variété de radicaux libres peut être produite dans les systèmes biologiques, et leur réactivité dépend de leur nature et de celle des molécules rencontrées. Un radical libre est capable de soustraire un atome d'hydrogène au sein de molécules stables produisant des composés radicalaires qui sont alors susceptibles de réagir avec d'autres molécules avoisinantes en induisant des réactions radicalaires en chaîne. La peroxydation lipidique représente un exemple de réactions en chaîne dans lequel les radicaux libres attaquent principalement du fait de leur insaturation, les acides gras polyinsaturés (AGPI) des membranes cellulaires, altérant alors leurs structures et leurs fonctions. Deux radicaux libres peuvent établir un lien covalent pour former des espèces non radicalaires stables, cependant un radical libre doit être considéré comme un agent oxydant acceptant un simple électron d'un composé non-radicalaire, ou un agent réducteur donnant un simple électron à un composé non-radicalaire [721]. La nature, l'abondance et la localisation (en grande partie membranaire) des AGPI en font une des cibles privilégiées des attaques radicalaires.

I - B-2-9-3 Les Espèces Réactives de l'Oxygène

L'oxygène moléculaire (O_2) possède une faible réactivité vis-à-vis des molécules organiques contrairement à ses formes activées.

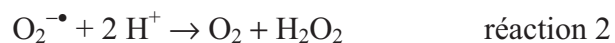
L' O_2 intervient dans des réactions radicalaires et par gain d'un électron, se transforme en radical ou **anion superoxyde** (*réaction 1*) [513] sous l'action d'enzymes telles que la NADPH oxydase qui a été montrée comme étant la principale source d'anions superoxyde dans le mur vasculaire [755], la xanthine oxydase ou par des composés non enzymatiques tels que le semi-ubiquinone au niveau de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons.



L'anion superoxyde est très réactif, son temps de demi-vie est court de l'ordre de **10^{-6} sec.** Il est rapidement dismuté pour former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) soit de façon spontanée, soit via l'action des superoxydes dismutases (SOD).

L' O_2 , dans son état excité, donne naissance à l'**oxygène singulet** pouvant réagir avec des molécules organiques stables.

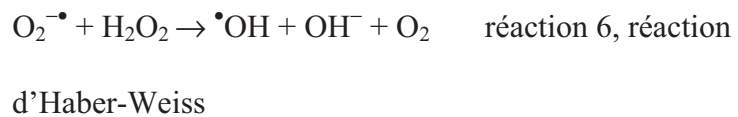
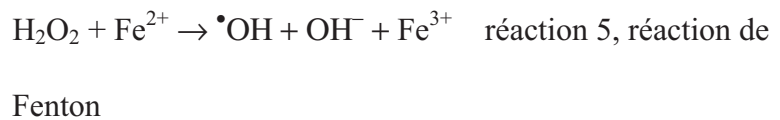
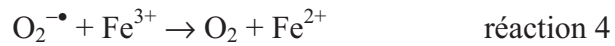
Le **peroxyde d'hydrogène** (H_2O_2) est produit soit par la dismutation de l'anion superoxyde (*réaction 2*) soit par la réduction bivalente de l'oxygène (*réaction 3*).



H_2O_2 est considéré comme une ERO de par sa contribution essentielle à d'autres réactions radicalaires. Le peroxyde d'hydrogène n'est pas une espèce très réactive; son temps de demi-vie de l'ordre de 10^{-3} secondes est long. Il peut par conséquent diffuser loin de son

site de production et même traverser les membranes biologiques. H₂O₂ va être métabolisé par la CAT ou GPx. S'il n'est pas éliminé et en présence de NO, il réagit plus rapidement avec ce dernier qu'avec la superoxide dismutase (SOD) [272], conduisant à la formation de péroxynitrite, une des espèces les plus réactives et toxiques.

Le **radical hydroxyle** ($\bullet\text{OH}$) est produit à partir de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, en présence d'ions ferriques (*réactions 4 à 6*).



Il a été proposé par F Haber et J Weiss dès 1934, que le radical hydroxyle puisse être généré par l'interaction entre l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ et l' H_2O_2 . L' $\text{O}_2^{\bullet-}$ étant un métabolite cellulaire présent physiologiquement, la réaction d'Haber-Weiss (*réaction 6*) est donc considérée dans les systèmes biologiques, comme un moyen de production de radicaux plus toxiques tels que l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ et le H_2O_2 . D'un point de vue thermodynamique, *la réaction 6* n'étant pas très favorable en milieu aqueux, elle nécessite des catalyseurs pour se produire. Dans leur travail initial, Haber et Weiss ont évoqué la nécessité d'un métal de transition comme catalyseur et ont proposé que la réaction nette de production d' $\bullet\text{OH}$ (*réaction 6*) soit issue de deux réactions distinctes (*réactions 4 et 5*). Aujourd'hui, la production d' $\bullet\text{OH}$ par la réaction d'Haber-Weiss catalysée par le fer et dans une moindre mesure le cuivre, est considérée comme le mécanisme principal *in vivo* [383]. Dans les conditions physiologiques, la disponibilité du fer catalytique libre est relativement faible en raison de

sa séquestration par les protéines [373]. Cependant, la quantité de fer libre peut augmenter dans certaines conditions (hémochromatose, β -thalassémie, hémodialyse) avec des effets délétères pour la cellule.

Le radical hydroxyle est extrêmement réactif; sa demi-vie de l'ordre de 10^{-9} sec à 37°C implique des effets délétères vis-à-vis des molécules avoisinantes. Il est parmi les radicaux libres les plus toxiques. En effet, $\bullet\text{OH}$ peut oxyder un substrat par arrachement d'un atome d'hydrogène (*réaction 7*), par arrachement d'un électron (*réaction 8*) ou par simple addition sur une double liaison (*réaction 9*). Le radical hydroxyle serait d'ailleurs le principal initiateur du processus de peroxydation lipidique au niveau des AGPI et des lipoprotéines. En vertu de sa réactivité non spécifique, $\bullet\text{OH}$ est capable de soustraire un atome d'hydrogène dans une chaîne d'acides gras (LH; *réaction 7*).



Il est capable d'oxyder également les protéines, l'ADN et les glucides, étant ainsi à l'origine de radicaux libres dits "secondaires". Parmi ceux-ci, l'**acide hypochloreux**, hautement réactif, est produit via la myéloperoxydase qui peut réagir avec H_2O_2 [114;114] et va pouvoir contribuer à l'oxydation des LDL.

La formation des ERO est répertoriée dans la Figure 6 ci-dessous.

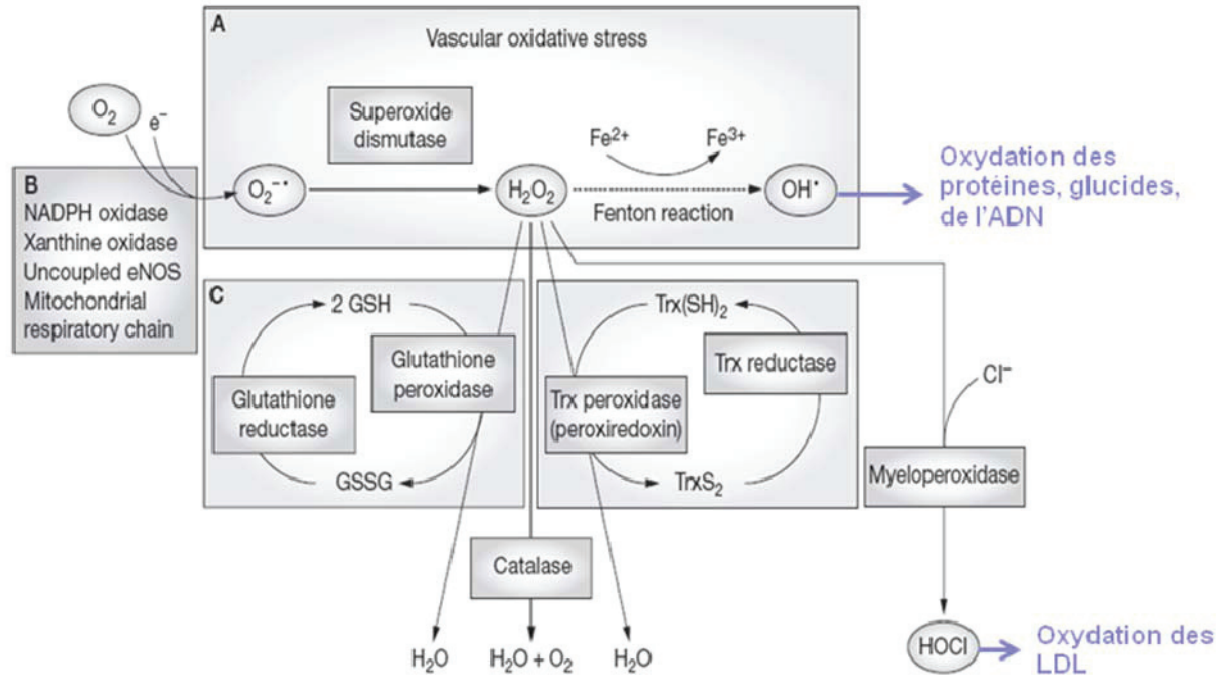


Figure 6 : Enzymes impliquées dans la génération et l'inactivation des espèces réactives de l'oxygène (ERO), adaptée de [233].

$O_2^{\cdot-}$: anion superoxyde; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène; OH^{\cdot} : radical hydroxyle; GSH : glutathion réduit; GSSG : glutathion oxydé; HOCl : acide hypochloreux; Trx : thioredoxine

I - B-2-9-4 Les Espèces Réactives de l'Azote

Concernant les ERN, le **monoxyde d'azote** ($\bullet\text{NO}$) est produit sous l'action des NO synthases (NOS) constitutives et induites par l'oxydation de la L-arginine, présentes au sein des cellules endothéliales, vasculaires et neuronales ainsi que dans les macrophages et les neutrophiles [520;580]. Même si le $\bullet\text{NO}$ n'est pas une ERO *per se*, il réagit avec $\text{O}_2^{\bullet-}$, produisant un puissant agent oxydant, le **péroxynitrite** (ONOO^-). Dépendamment du microenvironnement, le $\bullet\text{NO}$ peut être également converti en **cation nitronium** (NO^+) ou en **anion nitroxyl** (NO^-). Par ailleurs, il est bien établi que le $\bullet\text{NO}$ est une molécule de signalisation clé puisqu'il favorise la relaxation endothéliale, régule le tonus vasculaire et participe à la transduction du signal au niveau neuronal [65;360;658]. Le radical $\bullet\text{NO}$ est la seule espèce radicalaire contenant un atome d'azote qui, dans les conditions aérobiques est capable de réagir avec l'oxygène moléculaire pour donner naissance au dioxyde d'azote ou **nitrite** ($\bullet\text{NO}_2$; *réaction 10*) et au **nitrate** ($\bullet\text{NO}_3$). Du fait de son grand pouvoir oxydant, le $\bullet\text{NO}_2$ est impliqué dans plusieurs voies oxydatives [326;391], incluant la peroxydation lipidique au sein des molécules de cholestérol (LDL) en circulation [113;359] et la formation de résidus de nitrotyrosine [59].



I - B-2-9-5 Principales sources d'espèces réactives

La production cellulaire des ERO/ERN est physiologique et continue *via* différents processus incluant le transfert mitochondrial d'électrons (cytochrome C), l'activation des

cellules phagocytaires (NADPH oxydase), l'activation de certaines enzymes (oxydases) localisées dans différents compartiments cellulaires, le métabolisme intracellulaire des toxines et drogues (cytochrome P450, mono-oxygénases) et l'exposition à des facteurs environnementaux (ex : exposition aux rayons ultra-violet). Des oxydants tels que l' H_2O_2 et le ONOO^- , même s'ils ne possèdent pas d'électrons non appariés, peuvent être générés au niveau cellulaire et comme mentionné précédemment, agir en qualité de pro-oxydants. Au niveau du mur vasculaire, plusieurs enzymes et systèmes enzymatiques peuvent produire des ERO. On en trouve principalement quatre : la chaîne respiratoire mitochondriale, la NADPH oxydase, la xanthine oxydase et l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) (Figure 7). D'autres ont un rôle plus secondaire telles que la cytochrome P450 mono-oxygénase, la cyclo-oxygénase et la lipoxygénase.

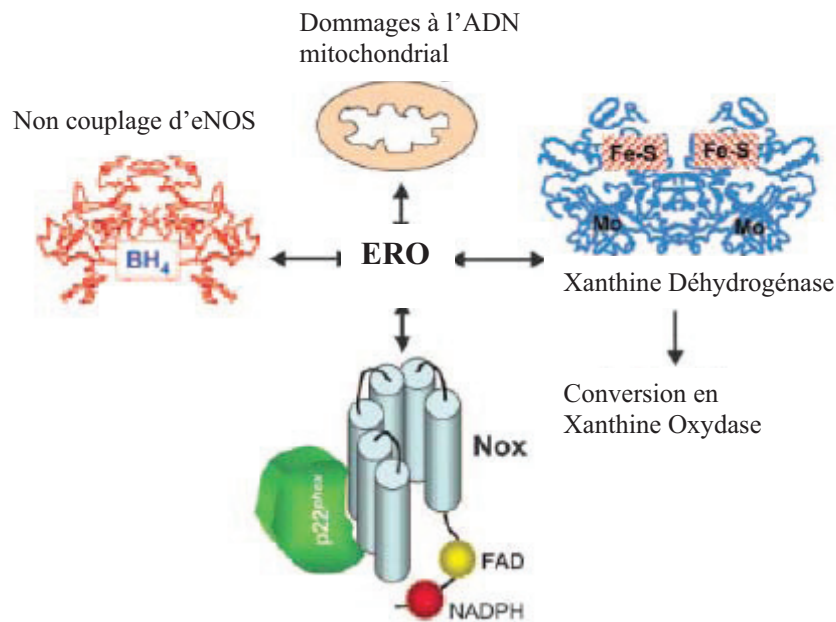


Figure 7 : Les principales sources d'espèces réactives de l'oxygène (ERO); adaptée de [528].

ERO : espèces réactives de l'oxygène; **BH₄** : tétrahydrobioptérine; **eNOS** : NOS endothéliale; **NOX** : NADPH oxydase

I - B-2-9-5-1 La chaîne respiratoire mitochondriale

Dans la cellule aérobie, les ERO/ERN sont produits à différents niveaux/compartiments et par plusieurs systèmes/enzymes. Cependant, il semble clair que près de 90 % de ces molécules sont d'origine mitochondriale, produites au cours de la phosphorylation oxydative au niveau de la chaîne mitochondriale de transport des électrons (Figure 8). La respiration mitochondriale est la première source d'énergie cellulaire avec la production d'ATP *via* la réduction de l'O₂ en H₂O. La production d'O₂^{-•} par la phosphorylation oxydative est donc continue et ubiquitaire au cours du métabolisme par réaction de l'oxygène avec un radical semi-ubiquinone [361;412]. Au cours de ce processus, l'oxydation de coenzymes réduits (NADH et FADH₂) et le transport des électrons par les différents complexes de la chaîne respiratoire produisent un gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Cependant, à plusieurs endroits de cette chaîne, les électrons peuvent réagir prématurément avec l'O₂ et former l'O₂^{-•}. D'après certaines études *in vitro*, l'importance du phénomène est estimée entre 1 et 4 % de l'O₂ consommé qui serait ainsi converti en anion superoxyde. Ils sont particulièrement produits au niveau du complexe I mais également au niveau du complexe III [532]. Cette fuite d'électrons et la production nette d'ERO mitochondriaux dépendent d'une part de l'état énergétique de la mitochondrie, du potentiel de membrane [403] mais aussi de l'activité des systèmes antioxydants mitochondriaux, particulièrement de la superoxyde dismutase à manganèse (Mn-SOD, voir ci-dessous) [70;134]. Les mécanismes de découplage mitochondriaux entre flux d'électrons et production d'énergie peuvent également être à l'origine d'une surproduction d'ERO/ERN. Et leur production continue par les mitochondries n'est pas spécifiquement liée à une pathologie. Cependant, certains

défauts de l'ADN mitochondrial innés ou acquis par la résultante d'une maladie sont capables d'augmenter la production de ERO/ERN par ces organelles [44;765;799]. Néanmoins, au niveau vasculaire, la contribution de la mitochondrie dans la production totale d'ERO n'est pas parfaitement définie. On peut citer par exemple l'utilisation du roténone [22] qui a montré un effet stimulateur de la production radicalaire à la place de jouer un rôle d'inhibiteur [461].

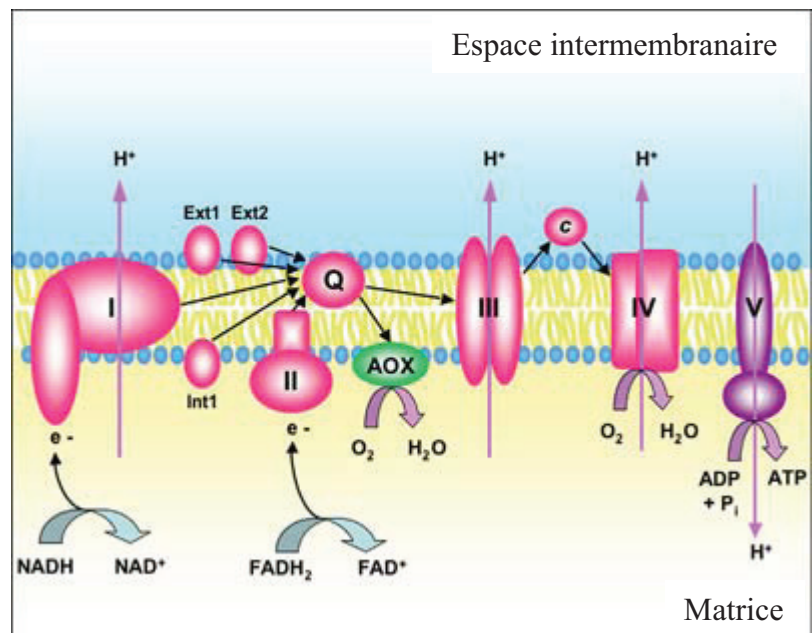


Figure 8 : Chaîne respiratoire mitochondriale, adaptée de www.cgm.cnrs-gif.fr.

I - B-2-9-5-2 Les NADPH oxydases

Plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales vasculaires, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les polynucléaires, les neutrophiles et les macrophages possèdent la NADPH oxydase (NOX), enzyme membranaire spécialisée dans la production de $O_2^{\bullet-}$ à partir d'électrons dérivés de la NAD(P)H pour réduire l'oxygène moléculaire

(*réaction 11*) [281]. La NADPH oxydase est une enzyme avec plusieurs multi-sous-unités qui semble être l'enzyme en amont des autres sources de production d'ERO, dû au fait que les anions superoxide dérivés de la NADPH oxydase ont été impliqués dans l'activation de la xanthine oxydase et dans le découplage d'eNOS. L'activation de la NADPH oxydase dans le système vasculaire a été montrée dans des modèles animaux d'hypertension induite par l'AngII [249;855], d'hypertension génétique [460], de diabète [321] et d'hypercholestérolémie [806].



11

Il existe actuellement sept membres, incluant la NOX des phagocytes initialement identifiée (NOX2 ou gp91^{phox}) : NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DuOX1 et DuOX2 [260;414]. La NOX2 est constituée de cinq sous-unités dont deux sous-unités membranaires, p22^{phox} et gp91^{phox}, deux sous-unités cytosoliques p67^{phox}, p40^{phox} et p47^{phox} et la GTPase rac1. La sous-unité p22^{phox} a un rôle d'encrage des autres sous-unités en même temps qu'elle stabilise le complexe multiprotéiques [26]. Lorsque la cellule est stimulée à travers un processus qui débute avec la phosphorylation de p47^{phox}, la NOX2 normalement dormante, est activée entraînant son association avec le cytochrome *b*₅₅₈ [171;760;761]. Il s'ensuit alors une production accrue de O₂^{•-} soupçonnée d'être à l'origine du "burst oxydatif" responsable de la synthèse d'H₂O₂ ou de l'hypochlorite (ClO⁻) (Figure 10). Cette voie de production des ERO est particulièrement stimulée au cours des processus infectieux [721] (Figure 9). La génération d'anions superoxide au niveau de la surface des cellules endothéliales, lieu de production du NO, en limite sa biodisponibilité [275] comme rencontré dans l'hypertension induite par AngII [369].

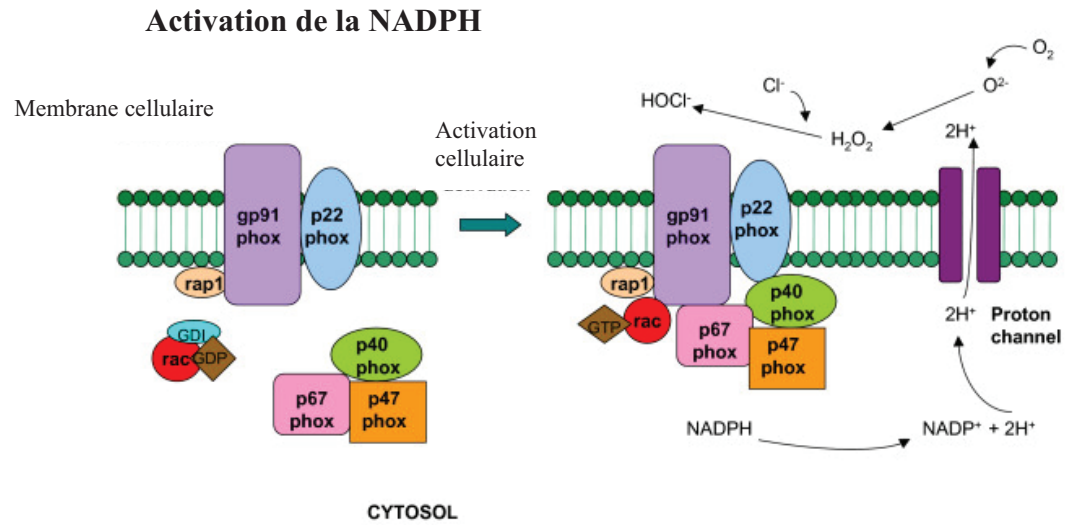


Figure 9 : Activation de la nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADPH) oxydase, adaptée de [35].

Les NOX sont classées en trois groupes qui se distinguent par la présence de domaines additionnels, en plus de la sous-unité catalytique NADPH oxydase. Le premier groupe comprend les NOX1 à 4 qui possèdent uniquement la sous-unité catalytique [413]. La NOX5 possède un domaine calmodulin-like additionnel [45]. Le troisième groupe comprend les Dual oxydases ou DUOX, nommées ainsi car en plus de la sous-unité NADPH oxydase, d'un domaine calmodulin-like, il existe un domaine homologue aux peroxydases à hème comme les myéloperoxydases et les lactoperoxydases. L'expression des différents membres de la famille NADPH oxydase au niveau cardiovasculaire est résumée dans le Tableau 4 ci-dessous.

NOX1

Dans les conditions physiologiques, NOX1 est sélectivement exprimée dans les cellules musculaires lisses et au niveau vasculaire, d'une part, participe à la prolifération cellulaire

et d'autre part joue un rôle central dans l'hypertension. L'hypertension artérielle se caractérise par une augmentation de la contractilité, une hypertrophie et une prolifération des cellules vasculaires musculaires lisses. Plusieurs facteurs dont l'AngII, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et les produits finaux de la glycation (AGEs) augmentent l'expression de NOX1 [428]. Il a été montré que NOX1 pouvait limiter la production de NO et ainsi contribuer au développement d'une hypertension induite par l'AngII et d'une dysfonction endothéliale [258;498]. Une surexpression de cette enzyme a été montrée chez les rats stroke-prone SHR (spSHR) qui développent une hypertension [16]. De plus, il a été montré d'une part que le 'platelet derived growth factor 2 α ' (PGF2 α) induit une hypertrophie des cellules musculaires lisses associées avec une augmentation de NOX1, d'autre part, que la déplétion de l'ARNm de NOX1 par l'utilisation de ribozymes assure une protection contre l'hypertrophie [379], enfin qu'une diminution de l'expression de NOX1 dans des cellules musculaires lisses vasculaires par l'utilisation d'ARN antisens, résulte en une réduction de la prolifération cellulaire [728]. Dans une étude récente, Gavazzi *et coll.* ont montré chez des souris déficientes en NOX1, une augmentation de l'expression des inhibiteurs des métalloprotéinases, prévenant ainsi le remodelage vasculaire induit par l'AngII [259].

Tableau 4 : Les différents membres de la NADPH oxydase, issue de [279].

| | Nox 1 | Nox 2 | Nox 3 | Nox 4 | Nox 5 | Duox 1 |
|---|-----------|-----------|-----------|------------------------|------------|-----------|
| CMLV issues de vaisseaux de conductance | + | - | - | +++ | + * | + |
| CMLV issues de vaisseaux de résistance | - | + | ND | ND | ND | ND |
| Cellules endothéliales | + | + | ND | +++ + | + * | ND |
| Myocytes cardiaques | ND | ++ | ND | + | ND | ND |
| Fibroblastes cardiaques | + | + | ND | +++ | ND | ND |

* : uniquement chez l'homme; **CMLV** : cellules musculaires lisses vasculaires;
ND : non déterminé

NOX2

En plus des granulocytes, NOX 2 est exprimée dans les cellules endothéliales, les fibroblastes et monocytes [66]. Le rôle de NOX2 dans la biologie de l'endothélium est complexe. Il est intéressant de noter que celle-ci pourrait avoir des propriétés angiogéniques dans les cas de stress oxydant comme dans le diabète de type 2 [321]. NOX2 a aussi été impliquée dans quelques modèles d'hypertension : dans la génération d'ERO dans les cellules musculaires lisses vasculaires des artères de résistance [755], ainsi qu'au niveau de l'endothélium [95]. Dans un modèle d'hypertension rénovasculaire, la génération de superoxydes par NOX2 diminue la biodisponibilité du NO, par conséquent, les souris déficientes en NOX2 se trouvent être protégées du développement d'une hypertension rénovasculaire et d'une dysfonction endothéliale [369]. Par ailleurs, chez le rat, dans un modèle d'hypertension sensible au sel, l'administration d'un inhibiteur (le gp91ds-tat, 10

mg/kg, 3 semaines) de l'assemblage des sous unité p47^{phox} avec gp91^{phox} de la NADPH oxydase, a permis de normaliser la génération d'ERO ainsi que la vasorelaxation endothélium dépendante [863].

NOX4

NOX4 contribue à la production basale d'ERO, est impliquée dans la migration cellulaire, la prolifération, et la différenciation cellulaire [139;775] dans les cellules endothéliales et musculaires lisses [12;211]. Cependant, des données conflictuelles existent concernant son expression. En effet, en culture cellulaire, il a été montré que l'AngII en diminuait l'expression [427], alors que chez des animaux atteints de diabète de type 2, l'expression vasculaire était augmentée [667] tout comme chez le rat hypertendu à la suite de l'administration d'une eau riche en sel (1 %) [548].

NOX5

NOX5 est un homologue calcium-dépendant. Le génome de rat et de souris ne contient pas le gène NOX5. Quatre variants ont été identifiés: Nox5 α , - β , - γ et - δ [67]. La liaison au calcium induit un changement de conformation avec une augmentation de la production d'ERO [208].

Au niveau vasculaire, la NADPH oxydase a été montrée comme étant la principale source d'ERO [428] non phagocytaire présente et active dans l'endothélium [535], au niveau des cellules musculaires lisses de la média [76] et dans l'adventice [633]. Elle est modulée par différents facteurs, tels que les cytokines, les facteurs de croissance et les peptides

vasoactifs [428], notamment l'AngII qui peut non seulement la stimuler, mais aussi augmenter l'expression de ses sous-unités.

I - B-2-9-5-3 La xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase (XOR) existe sous deux formes inter-convertibles, la xanthine déshydrogénase (XDH) et la xanthine oxydase (XO) [302]. Un des rôles les mieux connus de cette enzyme ubiquitaire consiste en la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique [575]. Elle est impliquée dans le catabolisme de l'ATP qui utilise le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) pour capter les électrons de l'hypoxanthine et de la xanthine afin de former le NADH et l'acide urique. Lors de changement de la pression partielle d'O₂ comme durant le phénomène d'ischémie/reperfusion, la XDH est modifiée en XO. À la différence de la précédente, la XO utilise l'O₂ comme accepteur d'électrons des mêmes substrats pour former l'O₂^{•-} et l'H₂O₂. Dans les cellules de mammifères, l'activité de la XOR représente une source importante d'ERO, surtout dans des conditions pathologiques et le ratio XO/XDH cellulaire détermine la quantité d'ERO produite. Néanmoins, la production des ERO dépend essentiellement de la XO car son activité change dans certaines pathologies comme l'athérosclérose, impliquant le stress oxydant [122;709]. La conversion de XDH en XO est stimulée par des cytokines inflammatoires (TNF α) et par l'oxydation de résidus cystéines par des oxydants tels que les peroxy-nitrites [662]. L'implication de la XO dans l'augmentation du stress oxydant a également été mise en évidence par l'utilisation de NG-nitro-L-arginine méthyle ester, un inhibiteur de XO qui a conduit à prévenir l'augmentation des niveaux d'anions superoxyde dans la microcirculation de rats SHR [731].

Alors que des études immunohistochimiques sur tissu humain n'ont pas permis de démontrer la présence de XDH dans les cellules endothéliales ou autres tissus vasculaires [465], il a été démontré que la XO peut produire des ERO et affecter la fonction endothéliale conduisant alors à des pathologies chez l'homme [122;292;708]. L'activité de XO est induite par l'hypoxie dans des cellules de veine ombilicale humaine [705], son activité vasculaire corrèle inversement avec la fonction endothéliale de patients avec blessure cardiaque [417;708]. Enfin, l'administration chez l'homme d'oxypurinol, un inhibiteur de la genèse d'anions superoxyde par la XO, favorise une vasodilatation chez des patients hypercholestérolémiques [122].

I - B-2-9-5-4 Les oxydes nitriques synthases endothéliales

Les NOS représentent une famille de protéines qui catalysent l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline pour produire du \bullet NO. Trois isoenzymes ont été référencées. L'isoforme I ou NOS neuronale (nNOS) retrouvée dans les cellules neuronales et épithéliales, l'isoforme II ou NOS inductible (iNOS) est en général exprimée dans le contexte d'une réponse inflammatoire, tel qu'un choc septique, une relâche de cytokines ou un infarctus [348;529] et l'isoforme III ou eNOS est retrouvée dans les cellules endothéliales [234;236]. Les isoformes nNOS et eNOS sont exprimées constitutivement et influencées par les concentrations intracellulaires de calcium. Le complexe calcium-calmoduline est nécessaire pour maintenir l'enzyme active [604]. En contraste, l'isoforme iNOS est exprimée après une induction transcriptionnelle et est indépendante du calcium intracellulaire [18].

L'activité de la NOS endothéliale (eNOS) a été étudiée en détails pour son implication dans la protection des dommages vasculaires et de ce fait, est la mieux connue.

Les électrons sont fournis par la NADPH oxydase au domaine réductase de l'enzyme, puis sont transportés par des transporteurs redox, FAD et FMN, au domaine oxygénase. Le passage du flot d'électrons au travers le domaine réductase de l'enzyme requiert la présence de calmoduline liée au calcium. Les électrons vont interagir avec le fer (hème) et tétrahydrobioptérine (BH₄) au niveau du site actif pour catalyser la réaction de l'oxygène avec la L-arginine qui conduit à générer la citrulline et le NO (Figure 10).

En absence de L-arginine et surtout de BH₄, eNOS utilise l'O₂ et produit ainsi O₂^{•-} et H₂O₂ à travers un phénomène qualifié de *découplage* [783].

Le découplage de cette enzyme peut générer des ERO *via* 3 mécanismes : (i) la réduction de la production enzymatique de [•]NO permet aux radicaux avec lesquels il réagit habituellement, d'attaquer d'autres molécules; (ii) la production d'O₂^{•-} peut engendrer de nouveaux processus radicalaires; (iii) la production simultanée de O₂^{•-} et de [•]NO peut favoriser la production de ONOO⁻ et de ONOOH [115]. Le découplage d'eNOS a été mis en évidence dans plusieurs situations pathologiques telles que le diabète de type 2 [321], l'hypercholestérolémie [725] et dans l'hypertension [415]. Dans un modèle de rat avec hypertension sensible au sel, l'augmentation de la production de peroxy-nitrite par la NADPH oxydase est liée à l'oxydation de BH₄ en radical BH₃[•] qui à son tour peut être converti en quinonoid 6,7-[8H]-H₂-bioptérin (BH₂) [820]. Dans ces conditions, l'administration orale de BH₄ permet le recouplage d'eNOS conduisant à une augmentation de la production vasculaire de NO, une diminution des niveaux de superoxyde et par conséquent à un abaissement de la pression sanguine [415]. La supplémentation en BH₄

restaure également la fonction endothéliale aussi bien dans des modèles animaux de maladies vasculaires que chez les patients atteints d'hypercholestérolémie [725], de diabète de type 2 [310] ou d'hypertension [318]. Il a aussi été montré qu'eNOS pouvait être régulée par H_2O_2 , qui active l'enzyme sur le long terme et augmente son expression. Par conséquent, une augmentation de l'expression d'eNOS en cas de stress oxydant peut conduire à une situation dans laquelle le découplage d'eNOS peut générer de plus fortes quantités d'anions superoxide. Un découplage peut également résulter de l'oxydation du centre Zn^{2+} -thiolate par les peroxy-nitrites [867]. Une augmentation des niveaux de diméthylarginine asymétrique pourrait aussi conduire à un découplage d'eNOS, participant alors à l'augmentation du stress oxydant [732].

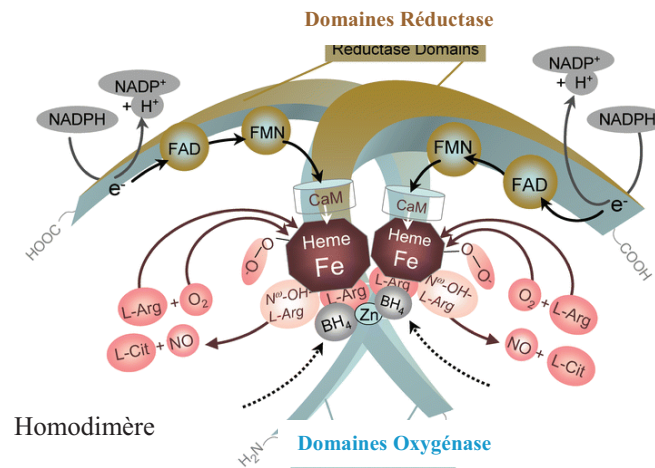


Figure 10 : Représentation schématique de la NOS endothéliale (eNOS), adaptée de [232].

Afin de contrôler de façon optimale les facteurs favorisant le stress oxydant, les organismes aérobies ont développé plusieurs mécanismes très complémentaires de défense.

I - B-2-9-6 Les antioxydants

Les cellules aérobies ont développé des systèmes enzymatiques complexes qui convertissent les oxydants en molécules non toxiques, assurant par conséquent une protection vis-à-vis des effets délétères du stress oxydant. Ils maintiennent un environnement réduit à l'intérieur de la cellule ainsi que les niveaux d'antioxydants extracellulaires [343]. Une partie de leur efficacité est associée à leur complémentarité dans leur localisation (intra- vs extracellulaire, compartiments), leur nature (ex : lipophile vs hydrophile) et leurs cibles. Il est important de considérer les sources d'oxydants dans un contexte de disponibilité des antioxydants car plusieurs substances peuvent prévenir ou retarder l'oxydation d'autres molécules. Un antioxydant se définit comme toute substance, présente en faible quantité par rapport à un substrat oxydable, capable de réduire ou de retarder de manière significative l'oxydation de celui-ci. Les antioxydants protègent donc aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cellule, contre les ERO/ERN et leurs effets secondaires [721].

I - B-2-9-6-1 Systèmes antioxydants enzymatiques

Les principales enzymes antioxydantes cellulaires sont représentées par la SOD, la CAT, les GPx et la glutathion réductase (GR). Leurs niveaux sont normalement régulés de manière à combattre une production excessive d'ERO/ERN cellulaire. Lorsque la production de ces derniers augmente, les cellules vont augmenter les activités et les niveaux d'expression des enzymes antioxydantes. De telles modifications métaboliques sont souvent attribuées au phénomène d'adaptation cellulaire face au stress oxydant [298].

I - B-2-9-6-1-a Les superoxydes dismutases

Les anions superoxide sont les principaux pro-oxydants de la cellule; les **SOD** représentent donc la première ligne de protection contre les espèces radicalaires de l'oxygène. Elles constituent un important système d'enzymes contenant des métaux dans leur centre catalytique afin de favoriser la dismutation d' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 et en O_2 (*réaction 12*). Il existe 3 formes de cette enzyme comportant des atomes de cuivre et de zinc ou de manganèse : des enzymes cytoplasmiques (**CuZn-SOD** ou SOD1), [164;504] ou extracellulaires (**EC-SOD** ou SOD3), [494]. La **Mn-SOD** (ou SOD2) est localisée dans les mitochondries [815]. Il faut aussi noter qu'une certaine activité **CuZn-SOD** est également trouvée au niveau des lysosomes, des peroxysomes, du noyau et de la membrane mitochondriale. C'est l'ion cuivre qui facilite la réaction de dismutation par sa capacité à alterner entre son état oxydé et réduit. La CuZn-SOD est plus abondante que la Mn-SOD mais n'est pas aussi inductible que cette dernière [389;691]. Elle n'est pas essentielle à la survie et au développement, au moins de la souris. En effet, des souris invalidées pour cette enzyme se développent normalement jusqu'au stade adulte, sans phénotype ou anomalie tissulaire apparents [323]. Leur durée de vie est par contre diminuée, principalement en raison du développement de carcinomes hépatocytaires [209]. La survie de ces souris n'est pas affectée en condition d'hyperoxie, ce qui suggère que la fonction de cette enzyme dans la défense pulmonaire contre les dommages causés par une augmentation d'anion superoxyde est très limitée. L'incorporation additionnelle de la CuZn-SOD humaine à une souris transgénique conduit à une augmentation de la résistance vis-à-vis de la toxicité de l'oxygène [590].



La **EC-SOD** représente la forme extracellulaire de l'enzyme contenant le zinc et le cuivre. Elle est liée aux protéoglycanes héparane sulfate dans diverses cellules, incluant les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Des évidences suggèrent que cette enzyme existe sous deux formes, chacune ayant une configuration en pont disulfure unique, avec une seule des formes étant active [592]. La principale fonction de cette SOD est de prévenir l'interaction de $O_2^{\bullet-}$ avec NO au niveau des cellules endothéliales [368;721]. Les souris invalidées pour la **EC-SOD** ne présentent pas de phénotype particulier mais sont plus sensibles à l'hyperoxie [124].

La **Mn-SOD** fonctionne en homotétramère et nécessite une fixation de manganèse au niveau de son site actif. Les souris invalidées pour cette protéine présentent un phénotype sévère, la mort survient entre le stade embryonnaire et 2-3 semaines après la naissance [439]. Cependant, l'administration systémique de la SOD pose problème. La principale raison est que la SOD n'est pas perméable aux membranes biologiques, donc n'est pas capable de réduire les anions superoxide produits intracellulairement. Par conséquent, un mimétique de la SOD a été développé, le 4-hydroxy-2, 2, 6, 6-tetraméthylpipéridine-N-oxyl or 4-hydroxy-tempo ou tempol pour scavenger les anions superoxyde. Il est perméable aux membranes, soluble dans l'eau et de petit poids moléculaire (172 kD) [246]. Il contient un groupement nitroxyde ($>N-O^{\bullet}$) conférant ainsi la propriété antioxydante à la molécule. À l'état réduit, il peut donner son électron aux superoxides et ainsi conduire à la formation du peroxyde d'hydrogène, mimant par conséquent les propriétés de la SOD. Également, il pourrait oxyder les ions ferreux en forme ferrique par conséquent prévenant les réactions du fer ferreux avec les peroxydes, inhiber la peroxydation des lipides ainsi que les modifications des protéines et de l'ADN (induites par les métaux de transitions). Dans des modèles expérimentaux, l'administration de tempol a été montrée comme pouvant diminuer

la pression sanguine chez le rat [564] et favoriser la vasodilatation endothélium dépendante chez le lapin [482].

I - B-2-9-6-1-b La catalase

La **catalase** est une enzyme tétramérique qui catalyse la réduction de H_2O_2 en O_2 et H_2O . Elle est ubiquitaire, présente en faible concentration dans de nombreux organes tels que le cerveau, cœur et muscle squelettique mais fortement concentrée dans le foie et les érythrocytes. Dans toutes les cellules de mammifères, à l'exception des érythrocytes, l'activité de la catalase est localisée presque exclusivement dans les peroxysomes (riches en oxydases) [128]. Les souris déficientes ou invalidées pour la catalase se développent normalement et ne présentent pas d'anomalies majeures [325]. Chez l'homme, des individus atteints d'acatalasémie, une affection bénigne héréditaire se caractérisant par une déficience en catalase, semblent être asymptomatiques [557]. Des études sur des modèles animaux ont montré que la catalase pouvait être induite par diverses cytokines en condition d'hyperoxie et par certains oxydants *in vitro* [691;764;821]. Mais des résultats contradictoires ont été rapportés [607]. De plus, il a été montré que la catalase pouvait prévenir les dommages à l'ADN produit par l'ozone [188]. Une surexpression de la catalase a montré des effets protecteurs dans le système cardiovasculaire en inhibant l'hypertrophie aortique induite par l'AngII [861] et en retardant le développement de l'athérosclérose [848].

I - B-2-9-6-1-c Les glutathions peroxydases

Les **GPx** également réduisent le peroxyde d'hydrogène en eau et les hydroperoxydes organiques en alcools en utilisant la capacité réductrice du couple glutathion réduit/oxydé (GSH/GSSG). Le GSH est régénéré par la glutathion réductase en présence de NADPH (*réaction 15*). Il existe 4 isoformes bien caractérisées de GPx (GPx1-4) communes à tous les mammifères. Elles possèdent une sélénocystéine, un acide aminé rare, au sein de leur site catalytique et sont extracellulaires ou plasmatiques, gastro-intestinales et cytosoliques. Une GPx5, qui n'est pas une séléno-protéine, a été identifiée chez les rongeurs et le singe et la GPx6 est retrouvée uniquement chez l'homme [100] (Tableau 5). Toutes les GPx catalysent le même type de réaction (la réduction du H_2O_2 avec le GSH pour cofacteur) mais elles diffèrent par leurs substrats, leur rôle et leur localisation.

Tableau 5 : Les isoformes de glutathion peroxydases chez les mammifères.

| GPx | Synonymes | Distribution | Structure | Substrats |
|------|---|--|----------------|--|
| GPx1 | Cytosolique (cGPx) | Cytosolique/foie, rein, érythrocytes, poumon | Homo tétramère | Hydroperoxydes solubles (H_2O_2), organiques (acides gras peroxydés) |
| GPx2 | Gastro-intestinale (GIGPx) | Cytosolique/Tractus gastro-intestinal, foie | Homo tétramère | Identiques à GPx1 |
| GPx3 | Plasma (pGPx) ou extracellulaire (eGPx) | Rein, Plasma | Homo tétramère | Identiques à GPx1 |
| GPx4 | Phospholipide hydroperoxyde (PHGPx) | Testicules | Monomère | Identiques à GPx1, phospholipides hydroperoxydés, esters de cholestérol |
| GPx5 | Rongeurs uniquement (sans Se-Cys) | Épididyme | - | - |
| GPx6 | Homme uniquement | Épithélium olfactif | - | - |

De façon générale, la **GPx1** métabolise H_2O_2 ainsi que les hydroperoxydes des acides gras en H_2O et en alcools lipidiques correspondants. Durant cette réaction dépendante du GSH, H_2O_2 est utilisé pour oxyder un autre substrat tandis que le GSH s'oxyde en GSSG (*réactions 13-14*) et qui est régénéré en GSH par la glutathion réductase (*réaction 15*). Les données obtenues sur des souris transgéniques suggèrent que seule celle-ci aurait un rôle antioxydant avéré [324] et les autres séléno-GPx ne peuvent pas compenser la fonction antioxydante de la GPx1 [145]. Chez des patients avec maladies coronariennes, l'activité de GPx-1 au niveau des globules rouges est inversement associée avec le risque d'événements cardiovasculaires [81]. De plus, les souris transgéniques déficientes en ApoE montrent

qu'une déficience en GPx-1 peut accélérer et modifier la progression de la lésion athérosclérotique [751].



L'isoforme plasmatique, **GPx-3**, réduit les hydroperoxydes dérivés des phospholipides dans l'environnement [846].

La **GPx4** est la seule GPx pouvant réduire les lipides complexes peroxydés au niveau des membranes [773;774]. Elle est localisée en partie dans le cytosol et en partie liée aux membranes des mitochondries et des noyaux [653;654]. Une forme cytosolique de GPx4, une mitochondriale et une nucléaire sont synthétisées à partir du même gène [598]. La GPx4 cytosolique semble essentielle dans l'embryogenèse puisque les souris invalidées pour cette enzyme meurent au stade embryonnaire [350]. La diminution des niveaux de lipides peroxydés, activateurs des lipoxigénases, par la GPx4 cytosolique montre que cette dernière participe à la régulation de la production des leukotriènes et des prostaglandines [661]. La GPx4 pourrait donc aussi jouer un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire. Par ailleurs, la GPx4 mitochondriale pourrait avoir une fonction antiapoptotique en empêchant la sortie de la mitochondrie du cytochrome C [549]. Enfin, les souris invalidées pour la forme nucléaire sont parfaitement viables [151]. Cette forme joue un rôle essentiel dans la spermatogenèse et un déficit en GPx4 au niveau des spermatozoïdes serait impliqué dans l'infertilité humaine [351]. Si la GPx4 exerce sa

fonction de peroxydase pour les lipides peroxydés dans le cytosol et dans les membranes mitochondriales et nucléaires, aucune étude n'a pu mettre en évidence un rôle au niveau des membranes plasmiques.

Le sélénium est un composé de GPx qui permet de maintenir son activité [652]. Par conséquent, une déficience en sélénium a clairement été montrée comme étant associée avec certaines formes de maladies cardiaques [238].

I - B-2-9-6-1-d Les thiorédoxines et glutarédoxines

Les **thiorédoxines** constituent un système antioxydant qui comprend deux protéines, une thiorédoxine (Trx), de faible poids moléculaire (10-12 kDa) et une thiorédoxine-réductase (Trx-R), une séléno-protéine NADPH dépendante. Les Trx sont des dithiol-disulfide oxydoréductases qui catalysent la réduction des disulfides en sulfhydriles correspondants. Deux isoformes de thiorédoxine existent chez les mammifères, la Trx1 cytosolique et nucléaire et la Trx2, mitochondriale [709]. Elles sont responsables du maintien des cystéines dans leur état réduit. En effet, certains résidus cystéine, en réponse aux changements de l'état redox cellulaire, sont la cible de modifications oxydatives capables de modifier l'activité de nombreuses protéines. Ces modifications telles que la formation de ponts disulfures, la glutathionylation, la nitrosylation et l'oxydation sont des réactions réversibles grâce à l'action des Trx et des glutarédoxines. La thiorédoxine est régénérée par les Trx-R; elle sert en qualité d'équivalent réducteur dans les processus cellulaires quand elle ne réduit pas directement les hydroperoxydes lipidiques [328] (Figure 11). Cette enzyme est aussi connue pour son rôle dans le maintien des niveaux cellulaires d'autres antioxydants comme la Mn-SOD [501;808]. Ce système a récemment été reconnu pour

limiter le stress oxydant en agissant indirectement via la régulation de signaux de transduction [847]. Au niveau vasculaire, la Trx est présente dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires.

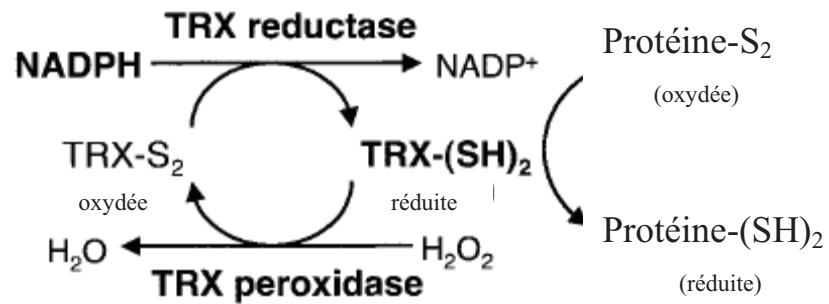


Figure 11 : Le système thiorédoxine (TRX), adaptée de [847].

Les **glutarédoxines** (Grx) sont aussi des dithiol-disulfide oxydoréductases (9 - 15 kDa) qui nécessitent le GSH pour leur activité catalytique. Le GSSG est régénéré par la GSH réductase et la NADPH [328;329]. Deux isoformes existent chez les mammifères, la Grx1 cytosolique [480] et la Grx2 mitochondriale [268;479], codées par deux gènes différents. La fonction principale de ces enzymes est de réduire les disulfides mixtes entre protéine et GSH, un mécanisme appelé dé-glutathionylation même si elles peuvent aussi réduire certains disulfides protéiques.

I - B-2-9-6-1-e Les hèmes oxygénases

Les **hèmes oxygénases** (HO) sont des protéines qui catalysent la dégradation des molécules d'hème en biliverdine et génèrent du monoxyde de carbone et du fer [746] (Figure 12). Le

mécanisme enzymatique des HO n'est pas encore complètement élucidé mais le fait que la biliverdine et le monoxyde de carbone soient des piègeurs d'espèces radicalaires [144;570] expliquerait en partie le rôle antioxydant de ces protéines, par conséquent leur capacité à réduire le stress oxydant.

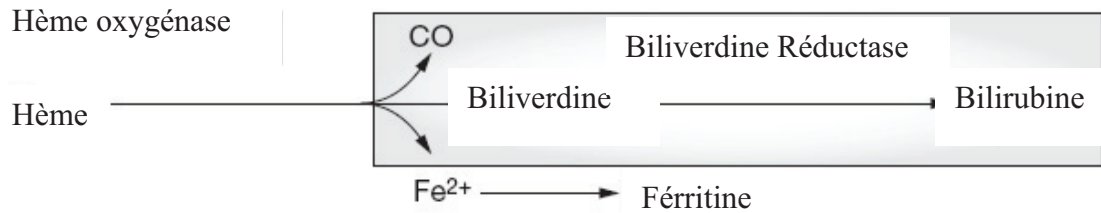


Figure 12 : Mécanisme enzymatique des hèmes oxygénases (HO), adaptée de [233].

Trois isoformes ont été caractérisées, HO1, HO2 et HO3 [571]. HO1 est inductible alors que HO2 et HO3 sont exprimées constitutivement [144;487]. L'expression de HO1 est induite par plusieurs stressseurs dont l'hyper- et l'hypoxie, la diminution de GSH, les cytokines, l'augmentation de la pression sanguine et le stress oxydant [118;125;227;353;430]. Des souris invalidées pour HO1 sont très sensibles au stress oxydant [616]. Il existerait différents mécanismes d'actions par lesquels l'induction de HO1 pourrait assurer une protection contre les maladies vasculaires athérosclérotiques [722]. Dans les cellules endothéliales, une augmentation de l'expression de HO1 conduit : (i) à une diminution des molécules d'adhésion (CAMs) qui elles-mêmes diminueraient le nombre de cellules inflammatoires dans le mur vasculaire; (ii) à une augmentation de la protection antioxydante; (iii) à favoriser la croissance cellulaire et la ré-endothélialisation, et (iv) à une augmentation de la production de NO, conduisant à une augmentation du nombre de cellules endothéliales. Au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires, une

augmentation de l'expression d'HO1 fournit une protection en augmentant la relaxation, la protection antioxydante, l'apoptose en diminuant la prolifération [722] (Figure 13).

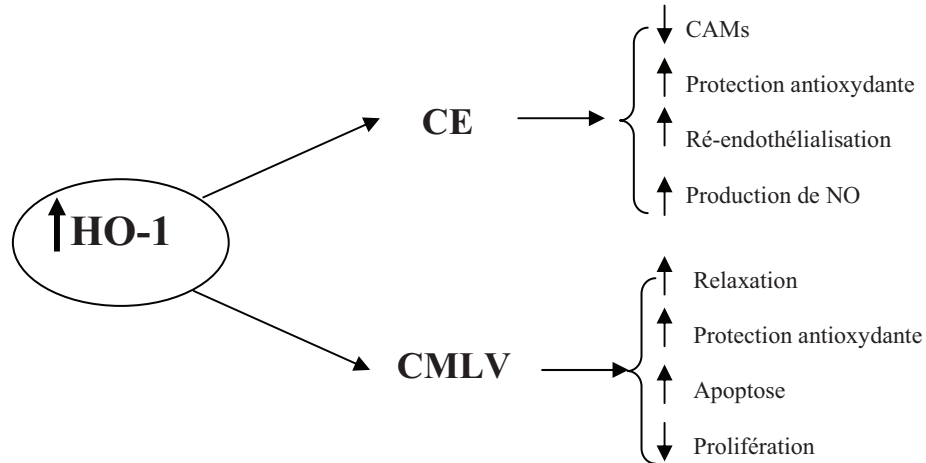


Figure 13 : Effets protecteurs de hème oxygénase de type-1 (HO-1), adaptée de [722].

CE : cellules endothéliales; CMLV : cellules musculaires lisses vasculaires; NO : oxide nitrique; CAMs : molécules d'adhésion

I - B-2-9-6-1-f Les paraoxonases

La famille des **paraoxonases** (PON) sont des enzymes qui semblent contribuer à la défense antioxydante vasculaire. Il existe trois isoformes de PON dont deux sériques, synthétisées dans le foie et circulant en association avec les HDL : la paraoxonase/arylesterase-1 ou PON1 et la paraoxonase/lactonase-3 ou PON3. La paraoxonase/arylesterase-2 ou PON2 est exprimée dans de nombreux types cellulaires. Les PON semblent participer à la protection vis-à-vis des maladies coronariennes avec des rôles dans la défense vasculaire antioxydante. En effet, les PON sériques, en particulier PON1, posséderaient une activité similaire à la peroxydase, assurant un effet protecteur des lipoprotéines vis-à-vis de

l'oxydation [38]. Par ailleurs, une déplétion en PON1 chez la souris augmenterait le stress oxydant dans les macrophages et les aortes, associée avec une diminution de la production d'anions superoxyde et une augmentation du contenu en GSH [655]. De plus, des souris déficientes en ApoE et surexprimant PON1 développent moins de lésions athérosclérotiques que les animaux ayant un niveau normal d'expression de PON1 [767]. L'isoforme PON2 pourrait réduire les niveaux d'ERO dans les cellules endothéliales humaines, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes [331]. Des souris déficientes en ApoE et PON2 développent plus de lésions athérosclérotiques, alors que celles qui surexpriment PON2 semblent être protégées [545].

I - B-2-9-6-2 Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Différentes molécules de faibles poids moléculaires, liposolubles ou hydrosolubles, possédant souvent un groupement thiol, contribuent à la complémentarité des défenses antioxydantes de l'organisme. Les composés hydrosolubles sont principalement représentés par le GSH, l'acide ascorbique (vitamine C), l'acide urique et la bilirubine tandis que les antioxydants liposolubles sont représentés principalement par la vitamine E et le coenzyme Q₁₀. L'albumine et les protéines liant les métaux peuvent également avoir des effets antioxydants consistants.

I - B-2-9-6-2-a Le glutathion

Le **glutathion** est un tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-L-glycine) impliqué dans divers rôles. Sous sa forme réduite, le GSH agit comme antioxydant : i) En tant que trappe

radicalaire, c'est un piègeur de radicaux hydroxyle et d'oxygène singulet; ii) En tant que cofacteur de plusieurs enzymes antioxydantes (GPx, GSH S-transférase); iii) En participant à la détoxification des lipides hydroperoxydés par l'action de la peroxyrédoxine 6 mais aussi des molécules électrophiles (tels que les aldéhydes et certains xénobiotiques, médicaments...) par une liaison directe/spontanée ou *via* l'action de la glutathion transférase. Cette réaction augmente les propriétés hydrophiles des xénobiotiques et favorise ainsi leur élimination dans la voie des mercapturates. Finalement, iv) En régénérant l' α -tocophérol et l'acide ascorbique sous leur forme active [497]. Le GSH est considéré comme la molécule intracellulaire non-protéique ayant un groupement thiol, la plus abondante, sa concentration peut atteindre 10 mM. Les organes exposés aux toxines (foie, poumons, reins et intestins) contiennent la grande majorité du GSH du fait de ses fonctions [256] et les fluides biologiques une quantité limitée (ex : concentration plasmatique : 3 μ M) [180]. Le GSSG issu de ces réactions est réduit par les GR dépendantes du NADPH, ou recyclé par les protéines disulfides isomérasés au niveau du réticulum endoplasmique. Une réduction des niveaux de GSH a été observée dans de nombreuses pathologies dont la détresse respiratoire chez l'adulte [577], chez les prématurés avec blessure pulmonaire [282] et les individus avec blessure myocardique [333].

Les mécanismes efficaces de recyclage font du GSH un tampon très efficace contre le stress oxydant. Le couple GSH et GSSG est un acteur important du statut redox cellulaire. En effet, 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 [672]. Le ratio GSH/GSSG est d'ailleurs considéré comme un bon marqueur d'évaluation du stress oxydant [365;366].

I - B-2-9-6-2-b L'acide ascorbique

L'**acide ascorbique** ou vitamine C, est l'antioxydant plasmatique hydrosoluble le plus efficace en plus d'être également reconnu pour son rôle de cofacteur dans les réactions enzymatiques d'hydroxylation. Il peut facilement céder un électron à quasiment tous les radicaux libres (anion superoxyde, hydroxyle, tocophéroxyle, peroxyde). De plus, l'ascorbate participe à la régénération de la vitamine E afin de prévenir l'oxydation des lipides présents dans les membranes biologiques [512]. Le piégeage des anions superoxide par la vitamine C conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène, favorisant l'oxydation des lipides et des protéines et sert de substrat pour les phénomènes de nitrosation et d'oxydation induits par les peroxydases. Le radical ascorbyle est peu réactif envers les constituants cellulaires, il réagit avec lui-même pour former les acides ascorbique et déhydroascorbique. Les capacités de régénération de l'acide ascorbique (NADPH avec ou sans Trx, GSH) lui permettent de participer à l'arrêt de la propagation des réactions radicalaires en chaîne. Mais le couple ascorbate/radical ascorbyle possède un faible potentiel redox.

Par ailleurs, il a été montré que la vitamine C pouvait augmenter la synthèse de NO via l'interaction avec BH_3 . Elle peut régénérer BH_4 à partir de BH_3 , prévenant ainsi le découplage d'eNOS [311;340].

Toutefois, la vitamine C en association avec les métaux de transition et particulièrement le Fe^{2+} , pourrait avoir un rôle pro-oxydant. En effet, il a été montré une augmentation de la peroxydation lipidique induite par l'hémoglobine et les ions ferreux dans le système nerveux central durant l'hémorragie [659] ainsi qu'une stimulation de la peroxydation des

lipides via la réduction du redox actif des ions cuprics et ferreux [108]. Cependant, la mise en évidence et l'importance de ce phénomène *in vivo*, reste encore matière à débat, l'ascorbate restant de façon générale, une protection des molécules biologiques de l'oxydation.

I - B-2-9-6-2-c L'acide urique

L'**acide urique** est le produit final du catabolisme des purines, il est issu de l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine, réaction catalysée par la xanthine oxydase et la déshydrogénase. L'acide urique est considéré comme un antioxydant car il piège l'oxygène singulet, les radicaux peroxy et hydroxyle ainsi que l'acide hypochloreux, même si son rôle comme tel n'est pas totalement clarifié [712]. La réaction de l'acide urique avec les oxydants entraîne la formation du radical urate, qui peut être alors réduit par l'ascorbate [721].

I - B-2-9-6-2-d La bilirubine, l'albumine et protéines liant les métaux

La **bilirubine** est un produit terminal de la dégradation de l'hémoglobine, un puissant agent réducteur et un potentiel antioxydant physiologique [721]. Dans les fluides extracellulaires, principalement liée à l'albumine elle est une molécule hydrosoluble hydrophobe. La molécule libre et tout comme celle liée à l'albumine peuvent réduire la vitamine E et inhiber la peroxydation lipidique dans le plasma et les lipoprotéines [544]. Peu d'études ont apporté des évidences directes sur la capacité antioxydante de la bilirubine *in vivo*, mais les récents travaux de Dennery *et coll.* montrent que des rats nouveau-nés avec une

hyperbilirubinémie présentent un dommage oxydant réduit en réponse à une hyperoxie [181]. L'**albumine**, protéine circulante la plus abondante, possède de nombreux groupements thiols qui lui permettent, tout comme le GSH, de jouer le rôle de trappe radicalaire; même si la vitesse des réactions dans lesquelles elle est impliquée est plus lente, elle constitue un important antioxydant plasmatique.

Cette fonction est complétée par les **protéines liant les métaux**, également considérées comme éléments du système antioxydant. En effet, les métaux de transition (fer, cuivre) impliqués dans de nombreuses réactions radicalaires produisent des espèces hautement réactives. Les formes de stockage et de transport de ces métaux (transferrine, ceruléoplasmine, lactoferrine) ont une fonction antioxydante *via* un effet chélateur, la formation de ces complexes protéines-métaux permet ainsi d'inhiber les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss, évitant la production du radical hydroxyle.

I - B-2-9-6-2-e Vitamine E

L'efficacité du système antioxydant repose en partie sur la complémentarité tant dans la nature que la localisation des éléments qui le composent. Tout comme les antioxydants hydrosolubles, les liposolubles jouent un rôle essentiel dans la prévention des dommages oxydants. La **vitamine E** est le principal antioxydant lipophile pouvant réduire les radicaux peroxyils et réagir avec l'O₂, l'HOCl et le ONOO⁻ [245]. Il se transforme en radical hydroxyle après l'échange d'un électron libre. Le radical tocophéroxyil est peu réactif de par sa structure cyclique et peut être régénéré par l'acide ascorbique. La vitamine E existe sous huit formes naturelles : quatre tocophérols (α , β , γ et δ) et quatre tocotriénols (α , β , γ et δ). Chez l'homme, les formes prédominantes sont l' α et le γ -tocophérol, l' α -tocophérol étant la

plus active. Du fait de sa nature lipophile, la vitamine E peut agir au site même de la peroxydation lipidique membranaire, elle est essentielle dans la prévention de l'oxydation des lipides et des lipoprotéines. De nombreuses études ont montré une association entre la consommation de vitamine E avec une diminution de l'oxydation des LDL, une réduction du risque d'athérosclérose et des maladies coronariennes [637;713]. Cependant à fortes doses, elle pourrait comme la vitamine C, avoir des effets pro-oxydants, responsable d'une peroxydation lipidique [833], pourrait diminuer l'activité de la SOD et de la CAT dans la muqueuse gastrique de patients atteints de gastrite [71].

Dans une étude chez le rat, il a été montré que le γ -tocophérol mais pas l'isomère- α , inhibe l'inflammation induite ainsi que l'augmentation des éicosanoïdes pro-inflammatoires associée à la peroxydation lipidique [362]. De plus, il serait plus efficace que l' α -tocophérol *in vitro*, dans la protection contre les dérivés réactifs de l'azote. L'évaluation de son potentiel de protection contre l'inflammation et les maladies cardiovasculaires *in vivo* est maintenant étudié [316].

I - B-2-9-6-2-f Le coenzyme Q10

La famille des ubiquinones, molécules liposolubles synthétisées par les animaux et l'homme, contient le **coenzyme Q₁₀**. Celui-ci constitue la forme prédominante d'ubiquinone et il est retrouvé virtuellement dans toutes les membranes cellulaires ainsi que dans les lipoprotéines. Sa capacité à donner et à recevoir des électrons est importante pour les fonctions physiologiques. Il joue aussi un rôle essentiel comme élément de transfert d'électrons et de protons dans la production mitochondriale d'ATP et le maintien d'un pH optimal dans les lysosomes [163]. La forme entièrement réduite du coenzyme Q₁₀,

l'ubiquinol, est un efficace antioxydant pouvant inhiber l'oxydation des lipides membranaires et des protéines [231]. Il participe à la ligne de défense antioxydante liposoluble primaire contre la peroxydation lipidique des LDL, même s'il est moins abondant que l' α -tocophérol. L'ubiquinol réduit l' α -tocophérol et cette propriété compte probablement fortement dans son contrôle de la peroxydation lipidique [721].

I - B-2-9-7 Balance oxydants-antioxydants

Il est maintenant bien établi que les espèces réactives ont un double rôle, à la fois bénéfique pour défendre l'organisme et délétère dans le cadre d'un stress oxydant intense et/ou prolongé. À de faibles concentrations, elles sont bénéfiques jouant un rôle dans la régulation redox de plusieurs fonctions physiologiques. Au contraire, une surproduction, résultant par exemple de l'activité mitochondriale de la chaîne de transport des électrons ou d'une stimulation excessive des NADPH oxydases, provoque un stress oxydant qui peut entraîner des dommages aux constituants cellulaires (lipides, protéines et ADN). La régulation redox et le stress oxydant sont déterminés par l'amplitude et la durée de l'augmentation des niveaux de ces molécules comme schématisé sur la Figure 14. Les faibles concentrations cellulaires (« I) baseline level ») de ces espèces réactives peuvent être augmentées de façon contrôlée, conduisant à un déséquilibre temporaire (« II) Regulatory imbalances »), nécessaire à l'activation de certaines fonctions cellulaires. La production soutenue et excessive va conduire à des modifications persistantes de voies de signalisation, d'expression génique ainsi qu'à des dommages oxydants (« III) Dysregulation by chronic oxidative stress »).

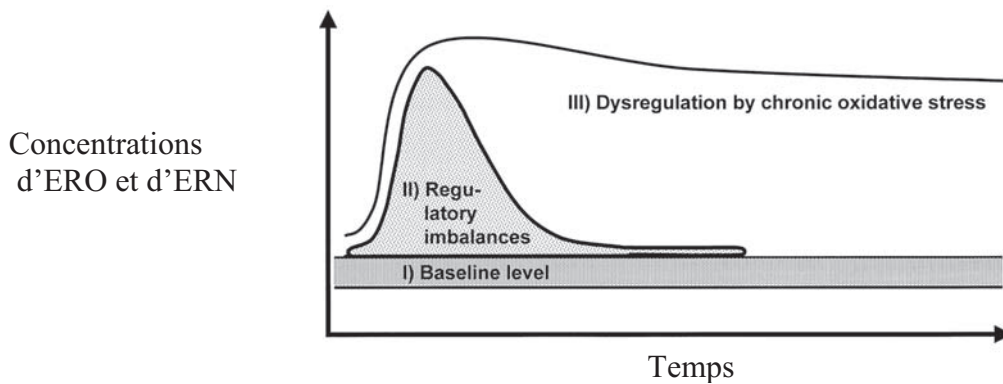


Figure 14 : Régulation redox et stress oxydant; adaptée de [197].

ERO : espèces réactives de l'oxygène; **ERN** : espèces réactives de l'azote

I - B-2-9-7-1 Le potentiel redox

Comme précédemment défini, une molécule est dite oxydante si elle a le pouvoir de gagner un électron; la molécule qui fournit cet électron passe de l'état réduit à l'état oxydé et inversement pour la molécule oxydante. Les états oxydés et réduits d'une même molécule forment un couple redox dont le potentiel redox (E) croît avec le pouvoir oxydant de l'espèce oxydée du couple. Le potentiel redox intracellulaire représente la résultante de l'ensemble des couples redox et il est évalué par le rapport des concentrations des formes oxydées et réduites d'un couple redox prépondérant. Le couple formé par le GSH et le GSSG est généralement utilisé pour mesurer le potentiel redox intracellulaire, il est important de ne pas le confondre avec le statut redox cellulaire qui règle l'homéostasie redox intracellulaire.

I - B-2-9-7-2 Le statut redox

Les niveaux extra- et intracellulaires des ERO/ERN sont contrôlés et ajustés de façon précise par les processus redox. Les couples redox constituent un réseau avec pour but l'échange des électrons pour garantir la fonctionnalité de certaines enzymes. Trois principaux couples redox déterminent le statut redox cellulaire : (NADPH/NADP⁺), (TRXred/TRXox) et (GSH/GSSG). Ils modulent l'état de plusieurs molécules (protéines, lipides et glucides) ayant des rôles clés dans la signalisation cellulaire. Des fluctuations dans le statut redox vont affecter le fonctionnement cellulaire et/ou son intégrité par l'activation de voies de signalisation sensibles à l'état redox (réponse immunitaire, apoptose) ou par la dégradation de constituants cellulaires (oxydation des lipides, protéines, glucides) [197;224].

I - B-2-9-7-3 Les réactions redox et la signalisation cellulaire

Physiologiquement, les espèces réactives produites agissent sur des cibles spécifiques pour moduler des voies de signalisation. Cette spécificité est importante puisqu'elle distingue la signalisation redox du stress oxydant. La signalisation redox implique que l'état redox cellulaire soit transitoirement perturbé par une augmentation de la production des espèces réactives ou par une diminution de l'activité des systèmes antioxydants. Dans ce contexte, les réactions redox impliquent l'oxydation réversible d'un acteur d'une voie de signalisation dont l'activité globale va être modulée. Le stress oxydant entraînera lui, une oxydation irréversible des acteurs de la cascade de signalisation pour engendrer les phénomènes tels que l'apoptose et les processus inflammatoires [721].

I - B-2-9-8 Stress oxydant et dommages aux biomolécules

Comme mentionné ci-dessus, les espèces réactives dites primaires ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , etc.) sont générées physiologiquement, elles participent à la régulation redox de l'expression de gènes pour moduler certaines fonctions cellulaires. Dans les conditions où le système est dépassé, du à une trop forte production d'espèces réactives et/ou une diminution des défenses antioxydantes, les constituants cellulaires sont susceptibles d'être oxydés, pouvant altérer leurs structures et fonctions. Ainsi les espèces primaires, de par leur action oxydante, convertissent les constituants cellulaires en produits secondaires capables à leur tour d'induire des dommages. Les espèces réactives secondaires comme les radicaux, alkyle (R^{\bullet}), alkoxy (RO^{\bullet}) et alkoperoxy (ROO^{\bullet}) sont générées à partir de chaînes d'acides gras polyinsaturés, des glucides et des acides aminés.

I - B-2-9-8-1 Lipides

La structure et l'abondance des lipides polyinsaturés tels que les phospholipides, le cholestérol, les esters de cholestérol, les glycolipides des membranes cellulaires et les lipoprotéines en font des cibles pour l'oxydation par les métaux et les radicaux libres oxygénés [298]. Cette oxydation déclenche une série de réactions en chaîne, la peroxydation lipidique, qui conduit à la formation de lipides hydroperoxydés (LOOH) ou d'aldéhydes. Les LOOH étant en effet instables en milieu aqueux, ils se décomposent facilement en produits secondaires, tels que les aldéhydes. La peroxydation lipidique se décompose en trois phases : l'initiation, la propagation et la terminaison (Figure 15). L'initiation est due à l'attaque d'une espèce radicalaire (R^{\bullet} , HO^{\bullet} , RO^{\bullet} , ROO^{\bullet} , $ONOO^{\bullet}$)

suffisamment réactive pour arracher un hydrogène situé en α d'une double liaison (H le plus labile) d'un acide gras polyinsaturé (LH) produisant un radical lipidique (L^\bullet). Un réarrangement intramoléculaire stabilise le radical avec la formation d'un diène conjugué capable de réagir facilement avec l' O_2 pour donner LOO^\bullet , la réaction en chaîne (propagation) se crée alors, ce dernier ayant la capacité d'arracher un hydrogène d'une molécule d'acide gras adjacente, ou d'évoluer en peroxyde cyclique qui, au contact d'un autre acide gras donne naissance à un nouveau radical diène. La combinaison de LOO^\bullet avec un atome d'hydrogène conduit à la formation d'un hydroperoxyde lipidique (LOOH) qui, sous l'action des métaux (Fe^{2+} ou Cu^+), formera LO^\bullet et HO^\bullet . La phase terminale de dégradation conduira le radical LOO^\bullet à subir une coupure non enzymatique pour donner naissance à divers produits, tels que des aldéhydes (α , β insaturés) plus ou moins toxiques comme le 4-hydroxynonéanal (HNE), le malondialdéhyde (MDA) et l'oxonéanal [19;768] ainsi que les isoprostanes [160].

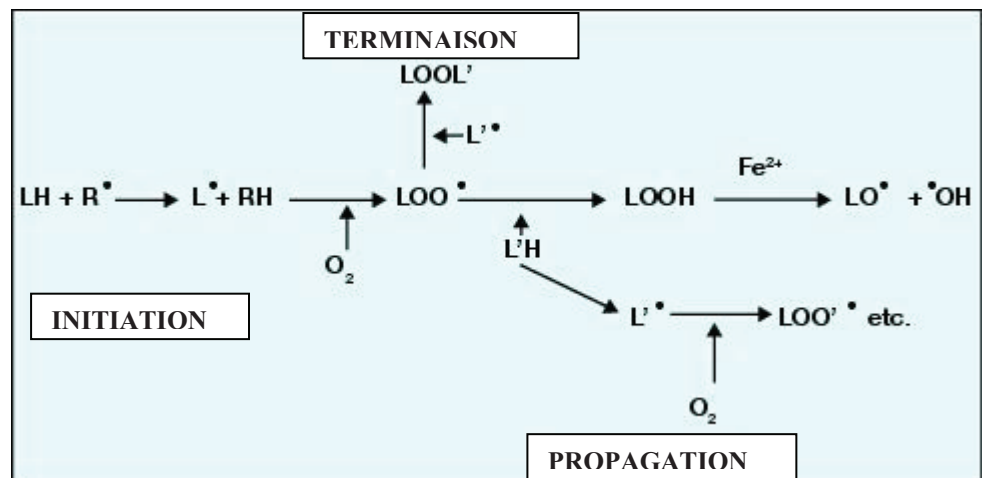


Figure 15 : La peroxydation lipidique; adaptée de [511].

La nature et la structure des acides gras touchés par la peroxydation déterminent l'intensité et la multiplicité des produits générés; ceux-ci n'étant pas directement proportionnel au nombre de carbones. L'oxydation des lipides, des lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires ont des conséquences différentes. La peroxydation lipidique peut créer des altérations de la membrane avec modifications de sa fluidité, de sa perméabilité et de sa structure, mais aussi inactiver des récepteurs ou des enzymes membranaires. L'oxydation des acides gras des lipoprotéines conduit à leur captation par les macrophages, à l'origine de la formation de dépôts lipidiques retrouvés au niveau de la plaque d'athérome impliqués dans les maladies cardiovasculaires [123]. L'évaluation de l'intensité de la peroxydation se fait par la quantification de produits plus ou moins finaux et instables. Au laboratoire, nous avons dosé certains aldéhydes et isoprostanes.

- Les aldéhydes

Plus stables que les radicaux libres très réactifs, les aldéhydes possèdent une durée de vie plus longue leur permettant de diffuser à partir de leur lieu de formation pour atteindre et attaquer des cibles intra- et extracellulaires distantes de l'évènement radicalaire d'origine. Les aldéhydes présentent une grande réactivité envers les macromolécules (protéines, lipides et ADN) formant ainsi des adduits covalents. Les trois principaux groupes d'aldéhydes sont les 2-alcenals (ex : hexenal), les 4-hydroxy-2-alcenals (ex : HNE) et les cetoaldéhydes (ex : MDA).

HNE : Depuis sa première caractérisation en 1991 [215], ce composé a fait l'objet d'une recherche importante pour une meilleure compréhension de sa formation et de son rôle dans le développement des maladies inflammatoires chroniques [768]. Cet aldéhyde est formé à partir des hydroperoxydes émanant de l'oxydation de l'acides linoléique et arachidonique

[254]. Sa concentration cellulaire varie entre 0,1-3 μM dans les conditions physiologiques [768] à 5-10 μM dans les conditions pathologiques [614]. Le HNE agit comme un second messenger toxique, capable d'altérer des activités biologiques cellulaires allant de l'inhibition de la synthèse et de la fonction des peptides (GSH), jusqu'à l'inactivation des enzymes (enzymes contenant des fonctions -SH) en passant par la stimulation de processus inflammatoires (induction de la cyclo-oxygénase 2) et l'inhibition des gènes de la réponse antioxydante (Nrf2) [585]. La formation d'adduits covalents avec les protéines (HNE-protéines) représente également un événement toxique à travers lequel les molécules perdent leur activité biologique [408].

Au cours de ce travail de thèse, le MDA a été considéré.

MDA : Ce β -dialdéhyde tricarboné le plus simple et le plus connu, est produit lors de la coupure des acides gras polyinsaturés (n-6 et peu de n-3) possédant au moins deux doubles liaisons [215]. Cependant la formation de ce composé manque de spécificité en termes de biomarqueur de la lipoperoxydation. En effet, d'autres composés non lipidiques tels que le désoxyribose ou le saccharose mais aussi la biosynthèse des éicosanoïdes sont capables de générer du MDA [308;777]. Tout comme le HNE et même s'il est beaucoup moins réactif, il est capable de réagir avec des groupements ϵ -aminés de lysine au sein des protéines, pour former des adduits MDA-protéines.

- Les F_2 -isoprostanes

Cette famille de substances semblables aux prostaglandines $\text{PGF}_{2\alpha}$ est produite *in vivo* par une attaque radicalaire des espèces réactives sur l'acide arachidonique [525]. Les F_2 -isoprostanes sont tout d'abord estérifiés sur les phospholipides puis détachés sous forme libre dans la circulation sanguine par des phospholipases [526] avant leur excrétion dans les

urines. Ils sont relativement stables, présents en quantité dosable en conditions physiologiques et les concentrations urinaires et plasmatiques sont modulées par un stress oxydant *in vivo* tout comme leur formation est modulée par certains antioxydants [199;638]. Parmi les 64 isomères des F₂-isoprostanes, la classe des 8-iso-Prostaglandines F_{2α} (iPF_{2α}-III ou 15-F_{2t}-IsoP) est celle que l'on retrouve au niveau plasmatique et urinaire chez l'homme. Sa quantification est d'ailleurs la référence actuelle pour l'évaluation du stress oxydant *in vivo* et comme biomarqueur de la peroxydation lipidique dans le cadre de nombreuses pathologies inflammatoires et chroniques [162;300]. De plus, les isoprostanes iPF_{2α}-III ont été associés à la vasoconstriction [199] dans le lit vasculaire rénal et pulmonaire [525].

I - B-2-9-8-2 Protéines

Les protéines peuvent être des cibles des ERO et des ERN. Les chaînes latérales de certains acides aminés sont très sensibles à l'oxydation. Les protéines comportant un groupement sulfhydrile (-SH) sont les plus affectées. La présence de ce groupement dans les enzymes et les protéines de transport est généralement impliquée dans la structure tridimensionnelle et le fonctionnement du site catalytique et par conséquent dans la fonctionnalité. L'oxydation de ces protéines entraîne donc généralement une perte des propriétés biologiques et les rend plus sensibles à l'action des protéases. Les protéines oxydées deviennent hydrophobes, par suppression des groupements amines ionisables ou par extériorisation des zones hydrophobes et constituent des amas qui, une fois associés aux lipides forment des dépôts de lipofuschines [453]. La carbonylation est formée par l'oxydation de la lysine, de l'arginine et de la proline. La fragmentation oxydative [711] génère aussi des dérivés

carbonylés. La formation de dérivés carbonyles étant plus importante que les autres types de modifications oxydatives [176], le contenu en protéines carbonylées est souvent utilisé comme marqueur de stress oxydant. Au pH physiologique, la majorité des résidus cystéine des protéines sont protonés (Cystéine-SH), d'autres sont sous forme d'anion thiolate (Cystéine-S⁻) [228]. Il semblerait que ces Cystéine-S⁻ servent de « switch » sensible à l'état redox et régulent la fonction de ces protéines [153]. L'oxydation des groupements sulfhydriles des cystéines peut conduire à la formation de ponts intra et inter-disulfures, de protéines glutathionylées (protéine-SSG), nitrosylées (protéine-SNO) et sulfonylées (protéine-SOH). Ces modifications oxydatives, en changeant l'état thiol/disulfide, sont souvent impliquées dans la signalisation cellulaire et dans les conditions physiologiques, elles sont réversibles par l'action des thiorédoxines et des glutarédoxines. Toutefois un stress oxydant sévère peut conduire à la formation d'acide sulfinique (Cystéine-SO₂H) et sulfonique (Cystéine-SO₃H), formes dites hyperoxydées. Ces oxydations successives sont généralement irréversibles. La méthionine, autre acide aminé soufré, est aussi très sensible à l'oxydation, certaines formes sont réversibles. Les agents oxydants touchent aussi de façon irréversible les acides aminés aromatiques, tyrosine, phénylalanine, tryptophane et thréonine formant pas exemple l'acide hypochloreux (3-chlorotyrosine), l'acide peroxy-nitreux (3-nitrotyrosine).

De plus, comme mentionné précédemment, certains aldéhydes peuvent réagir avec les groupements nucléophiles des protéines, générant des adduits de Michael ou des bases de Schiff qui peuvent à leur tour être modifiés par des réactions de tautomérisation, d'oxydation, de déshydratation ou par condensation d'un second aldéhyde pour produire des produits finaux de la lipoxydation avancée stables [671]. Toutes ces modifications

touchent aussi bien les protéines de structure, les enzymes que les facteurs de transcription, conduisant alors à des conséquences biologiques multiples.

I - B-2-9-8-3 Acides nucléiques

Les acides nucléiques et particulièrement la guanine, sont très sensibles aux radicaux libres. L'oxydation des bases par attaques radicalaires engendre la formation de diverses molécules modifiées : le radical hydroxyle peut s'ajouter sur les doubles liaisons des purines et des pyrimidines et former le 8-hydroxy-désoxyguanosine (8-OHdG) [299], qu'il est possible de doser à partir d'extraits cellulaires. Le peroxy-nitrite peut quant à lui causer des fragmentations au sein de la molécule d'ADN. La mesure de 8-OHdG sert généralement d'indicateur fiable de dommage oxydatif à l'ADN [149;300]. Une altération de l'ADN a été suggérée pour être en partie impliquée dans le diabète de type 2 [170] et les maladies inflammatoires [27]. L'altération de l'ADN peut être réparée par l'ADN glycosylase [146] mais si le degré d'oxydation est trop important, la réparation est court-circuitée pour conduire à une mutagenèse ou une carcinogénèse. De plus, il est important de souligner qu'une augmentation des niveaux de 8-OHdG peut aussi provenir de la dégradation du dGTP oxydé dans le pool précurseur d'ADN de manière totalement différente du processus de réparation qui élimine les résidus oxydés de guanine. Les aldéhydes comme le MDA et le 4-HNE sont également capables de réagir avec l'ADN et de former des adduits. Ces dommages oxydatifs permanents du matériel génétique vont causer des mutations ponctuelles qui peuvent avoir des conséquences graves sur la synthèse des protéines.

I - B-2-9-9 Effets du stress oxydant sur les fonctions vasculaires

Le stress oxydant module les voies de transduction du signal vasoconstricteur mais aussi vasodilatateur résultant en un changement du tonus vasculaire et en un remodelage vasculaire associés avec l'augmentation de la résistance périphérique et l'hypertension [115].

Au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), les ERO exercent leurs effets directs notamment sur les protéines tyrosine phosphatase [757]. L'inhibition des tyrosines phosphatases par les ERO résulte en une augmentation de la phosphorylation des tyrosines, modulant non seulement les récepteurs aux protéines tyrosine kinase tels que epidermal growth factor receptor (EGFR), insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) et platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), mais également les non-récepteurs tyrosine kinase tels que Src, FAK, PI3K et JAK2 [757;759]. Src peut aussi être directement activé par H₂O₂ dans les fibroblastes [8] et les cellules CMLV stimulées par l'AngII [776;802]. La production d'anions superoxide via la NADPH oxydase est importante pour l'activation de JAK2 via l'AngII [673].

Nuclear factor-*kappa* B (NFκB) et la protéine 1 activatrice (AP-1) modulent l'expression des gènes inflammatoires tels que monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), des molécules d'adhésion telles que vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) et intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) et les interleukines [101]: toutes sont impliquées dans les réponses vasculaires et le remodelage dans l'hypertension et l'athérosclérose. NFκB est le premier facteur de transcription activé en réponse directe à un stress oxydant [677]. AP-1 est activé dans des conditions pro-oxydantes générées par des agents tels que les anions

superoxyde et l' H_2O_2 . Dans les CMLV, les LDL oxydés [30], HNE [657] augmentent l'expression d'AP-1.

Les ERO activent aussi d'autres voies de signalisation incluant mitogen-activated protein kinases (MAPK) incluant ERK1/2, p38 MAPK, JNK, ERK5 qui sont impliquées dans la croissance cellulaire, l'inflammation, l'apoptose et la différenciation cellulaire [762]. En effet, il a été montré qu' H_2O_2 activait p38 [344] et l'utilisation d'antioxydants a prévenu l'activation d'ERK suite aux forces de cisaillement « shear stress » [852]. Cela démontre l'implication des ERO dans l'activation des MAPK.

Le stress oxydant conduit à un excès de prolifération cellulaire, d'hypertrophie, de remodelage et de lésions vasculaires [280;416]. Les ERO induisent l'apoptose et la différenciation dépendamment de la forme générée, et de la concentration d'ERO. En effet, H_2O_2 à de fortes concentrations (500 μM to 1 mM) induit l'apoptose, tandis qu'à concentration plus modérée (100 μM) il provoque l'arrêt du cycle cellulaire en G1 [459]. Les peroxy-nitrites quant à eux stimulent le détachement et (shedding) la perte cellulaire (ces deux actions sont regroupées sous le terme anoikis) [184]. Les ERO modulent la structure vasculaire dans l'hypertension via l'augmentation du dépôt de matrice extracellulaire. En effet, les ERO en influençant l'activité des métalloprotéinases-2 et -9 (MMP-2 et -9), favorisent la dégradation de la matrice extracellulaire [621].

L'effet vasorelaxant de l'endothélium est principalement induit par la production de NO qui conduit à une vasodilatation au travers de la formation de cyclic guanosine monophosphate (cGMP) dans les CMLV. La présence de peroxy-nitrite peut antagoniser les effets vasodilatateurs du NO. Cela diminue la biodisponibilité du NO dans les vaisseaux, réduit la vasodilatation, et à moyen terme stimule la croissance des CMLV, le remodelage vasculaire, favorise l'inflammation vasculaire et l'agrégation plaquettaire [115]. Les anions

superoxide peuvent activer la vasoconstriction, De Champlain *et coll.* ont démontré que les anions superoxide peuvent stimuler d'une manière dose-dépendante la production d'inositol triphosphate (IP3) au travers la stimulation spécifique de récepteurs tyrosine kinase couplés à la phospholipase C gamma (PLC γ) [840], et l'augmentation des concentrations de calcium intracellulaire. H₂O₂ peut aussi augmenter les concentrations de calcium dans les CMLV et les cellules endothéliales [476].

Également, les anions superoxide diminuent la formation de GMPc et exercent aussi un feedback négatif sur l'activité de la PLC γ , par conséquent potentialisent la formation d'IP3 [841]. Tous ces mécanismes ont été retrouvés dans les CMLV de rats SHR, traduisant par conséquent que ces cellules peuvent être hyperactivées par le stress oxydant [840].

I - B-2-9-10 Stress oxydant et hypertension

I - B-2-9-10-1 Hypertension expérimentale

Une augmentation des indices de stress oxydant vasculaire à été démontrée chez le modèle expérimental d'hypertension artérielle le plus étudié soit le rat SHR et le rat SHR susceptible aux ACV. Chez ces animaux, qui développent spontanément une hypertension, la production d'anions superoxide induite par la NADPH oxydase est augmentée au niveau des vaisseaux mésentérique et aortique [582], associée avec une surexpression de sous-unités de la NADPH oxydase [581] et plusieurs polymorphismes dans la région promotrice du gène de *p22phox* ont été identifiés chez le rat SHR [858]. Une augmentation de l'expression de *p47phox* a aussi été rapportée dans la vasculature rénale, la macula densa et le néphron distal de jeunes SHR, suggérant par conséquent qu'une augmentation de la

NADPH oxydase rénale précède le développement de l'hypertension [248]. Chez le rat SHR et le rat SHR susceptible aux ACV, l'augmentation de la production vasculaire d'anions superoxide est associée à une diminution de la biodisponibilité en NO et une diminution de la thiorédoxine [739;753]. Le traitement avec des vitamines antioxydantes, des inhibiteurs de la NADPH oxydase, des mimétiques de la SOD, le BH4 ou bien avec des bloqueurs d'AT1R diminue la production d'anions superoxide et atténue le développement de l'hypertension [582].

Le stress oxydant vasculaire a aussi été démontré dans des modèles d'hypertension induite expérimentalement, tels que l'hypertension induite par l'AngII [794], l'hypertension sensible au sel [763], l'hypertension rénovasculaire [452], l'hypertension associée à l'obésité [192] et l'hypertension provoquée par les minéralocorticoïdes notamment par l'aldostérone [548]. Une activation vasculaire de la NADPH oxydase, et d'eNOS non couplée ont été associées à une augmentation des niveaux d'anions superoxide dans ces modèles expérimentaux d'hypertension [415;428].

Dans un autre modèle d'hypertension associée à une résistance à l'insuline (animaux à qui on a donné une solution de glucose 10 % à boire pendant 3 à 4 semaines), l'augmentation de la pression sanguine était fortement liée au développement de la résistance à l'insuline et à une augmentation de la formation d'anions superoxide au niveau aortique [206]. Dans ce modèle la production d'anions superoxide ne semblait pas être due à une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase, mais plus par une augmentation de l'activité mitochondriale [207].

Dans les modèles de programmation de l'hypertension, notre équipe et d'autres ont démontré dans l'aorte de rats adultes -exposés in utero à une diète faible en protéines ou

avec RCIU à la suite d'une ligature d'artère utérine- une production d'anion superoxide augmentée induite par la NADPH oxydase [20;239;750;855].

I - B-2-9-10-2 Hypertension humaine

Des études cliniques démontrent une augmentation dans la production d'ERO chez les patients avec une hypertension essentielle, une hypertension rénovasculaire, une hypertension maligne et une prééclampsie [319;440;468]. Des patients hypertendus présentent au niveau sanguin et au niveau de cellules mononucléaires périphériques non seulement une déficience en antioxydants (SOD, CAT, GPx) mais aussi des quantités importantes de sous produits de la peroxydation des lipides (MDA) et de l'oxydation de l'ADN génomique et mitochondriale (8-OHdG) [630]. Par conséquent, ces altérations pourraient affecter la fonction des cellules endothéliales et ainsi contribuer au développement et maintien des complications cardiovasculaires durant l'hypertension.

Également, il a été montré que les leucocytes polymorphonucléaires et les plaquettes qui sont deux sources d'anions superoxide pouvaient participer au stress oxydant vasculaire et à l'inflammation chez des patients hypertendus [514;851].

L'activation du SRA a aussi été proposée comme un médiateur potentiel de l'activation de la NADPH oxydase et dans la production d'ERO [758]. Le blocage du récepteur AT1 de l'AngII, l'utilisation d'ACEi ont contribué à diminuer la production d'ERO [853]. Également, des polymorphismes touchant certaines sous-unités de la NADPH oxydase pourraient jouer un rôle dans l'hypertension. Le polymorphisme, -930 (A/G), dans le promoteur du gène *p22phox*, pourrait être un important marqueur génétique associé avec l'hypertension [522].

I - B-2-9-10-3 Stress oxydant : primaire ou secondaire à l'hypertension

De nombreuses études basées sur des données indirectes ont conclu que le stress oxydant était augmenté dans l'hypertension, mais que ce phénomène était sûrement secondaire à la survenue de cette maladie. En effet, dans l'hypertension légère à modérée non traitée, la peroxydation des lipides (8-iso-PGF 2α) n'est pas augmentée, suggérant que le stress oxydant ne serait pas impliqué dans la pathogenèse de l'hypertension essentielle chez l'homme du moins dans les premiers stades de développement [161].

Par ailleurs, des évaluations directes de la formation d'anions superoxide et de l'activité de la NADPH oxydase ont suggéré que le stress oxydant pourrait être plus une cause du développement de l'hypertension plutôt qu'une manifestation secondaire. Il a été montré aussi dans des modèles d'hypertension chez le rat sensible au sel, et SHR, qu'il y avait au niveau aortique et dans les CMLV en culture une augmentation progressive dans la production d'anions superoxide et de l'activité de la NADPH oxydase [842]. Il est possible que cela se développe en parallèle avec l'élévation de la pression sanguine chez le rat SHR entre la 6^{ème} et 12^{ème} semaine de vie. Une augmentation de la production d'anions superoxide dans des CMLV en culture de rat SHR a été montrée en absence de stimulus de pression, traduisant par conséquent que l'augmentation de la production d'anions superoxide au niveau aortique ne semble pas être secondaire à l'élévation de la pression sanguine [842].

I - B-2-9-11 Raccourcissement télomérique

Le diabète de type 2 se caractérise par une augmentation du stress oxydant associée avec une augmentation des dommages oxydatifs à l'ADN. Il existe des régions plus sensibles aux dommages induits par les ERO, dont les télomères font partie. Un raccourcissement des télomères a été rapporté chez des patients avec une intolérance au glucose [10] et avec un diabète de type 2 [9].

Les télomères sont des séquences répétées d'ADN à l'extrémité des chromosomes permettant d'assurer la réplication de l'ADN et de garantir l'intégrité chromosomique. Il a été proposé qu'une augmentation des dommages oxydatifs peut accélérer le raccourcissement télomérique [665], conduire par conséquent à un vieillissement précoce [797].

Le risque de développer un diabète de type 2 et de survenue de maladies cardiovasculaires augmente avec l'avancée en âge, par conséquent la biologie des télomères pourrait être un lien important entre l'augmentation du stress oxydant et le développement de ces pathologies [43;335]. Une altération du milieu intra-utérin conduit à une augmentation du stress oxydant foeto-placentaire et pourrait engendrer des dommages oxydatifs à l'ADN foeto-placentaire. En effet, il a été récemment démontré qu'une restriction de protéines administrée chez le rat durant la gestation peut avoir un impact sur la biologie des télomères et conduire au développement du syndrome métabolique [743]. Un impact de conditions périnatales délétères sur la longueur des télomères associée à des manifestations cardiovasculaires n'a pas été démontré à notre connaissance.

I - B-2-9-12 Stress oxydant et diabète de type 2

De façon globale, l'implication du stress oxydant dans le diabète (type 1 et 2) a été mise en évidence par l'augmentation dans les niveaux de marqueurs du stress oxydant [443;447;629] mais également par des diminutions dans les capacités de défenses antioxydantes (voir partie I - B-2-9-6) [472]. Il pourrait être un élément reliant un RCIU ou une naissance prématurée avec la survenue ultérieure de désordres métaboliques dont la résistance à l'insuline, conduisant plus tard au diabète de type 2 [374]. L'importance majeure de la glucotoxicité est maintenant bien établi comme une condition favorisant la production des ERO et ERN avec une diminution de la capacité antioxydante cellulaire [105;382].

I - B-2-9-12-1 Stress oxydant et glucotoxicité

Dans le modèle de RCIU par ligature des artères utérines chez le rat, les perturbations du milieu métabolique intra-utérin conséquentes sont associées avec une dysfonction mitochondriale et une augmentation du stress oxydant au niveau du pancréas, du muscle et du foie, conséquence de modifications dans l'expression de gènes et dans les fonctions cellulaires de ces organes [593;698]. Des rats ayant subi un RCIU présentent, entre l'âge de 3 et 6 mois, des changements dans le métabolisme du glucose : altération de la phosphorylation oxydative, de la néoglucogenèse [593], de l'activité de la pyruvate déshydrogénase directement liée à une élévation de l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase-4, conduisant ensemble à des niveaux basaux de glucose hépatique plus élevés [796]. De plus, une surexpression hépatique de la PEPCK pourrait à elle seule conduire à une augmentation de la production de glucose [730;778] et des niveaux élevés

d'ARNm ont été observés chez des rats nouveau-nés ayant subi un RCIU. Cette surexpression pourrait être une conséquence du stress oxydant [387]. Par ailleurs, un déficit dans le métabolisme énergétique pourrait être associé à un dysfonctionnement du transporteur de glucose (ATP-dépendant) à la surface cellulaire, et par conséquent limiter la capture et l'utilisation du glucose par les tissus périphériques, phénomène contribuant au développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 [680]. Dans ce dernier, une production de glucose hépatique élevée associée avec une résistance périphérique à l'insuline sont les principaux contributeurs de l'hyperglycémie observée tant à jeun qu'en période postprandiale [120;152]. L'implication d'une hyperglycémie postprandiale dans les complications du diabète de type 2 sera mentionnée dans la section I - B-2-9-12-4-a.

I - B-2-9-12-2 Mécanismes d'action du stress oxydant dans le diabète

De nombreuses études ont été réalisées pour identifier les mécanismes par lesquels le stress oxydant induit le développement du diabète. Nous nous limiterons ici aux effets sur le pancréas avec les impacts sur la synthèse et la sécrétion d'insuline.

I - B-2-9-12-2-a Stress oxydant et cellule β de Langerhans

Le pancréas est un organe particulièrement sensible au stress oxydant, les cellules β étant particulièrement vulnérables du fait de leur faible niveau d'expression des SOD, Cu/Zn et Mn-SOD (respectivement 38 et 30 % des expressions hépatiques), de la CAT (non détectable au niveau des îlots pancréatiques) et de la GPx (15 % de l'expression observée dans le foie) [276;448]. Chez la souris, cela conduit par conséquent à la destruction des cellules β après l'administration d'alloxane et de streptozotocine (agents diabétogènes)

[489;555]. À l'inverse, une surexpression de Cu/Zn SOD [407], de la Trx [334] et de la CAT [843] protège la cellule β du stress oxydant à la suite de cette administration. Par ailleurs, une diminution de la production endogène d'insuline par les cellules β de souris diabétiques *ob/ob* a été rapportée après l'activation de la voie de signalisation impliquant JNK en présence d'espèces pro-oxydantes (H_2O_2 , HO^\bullet et ONOO^-) [376]. Cette voie de signalisation est associée à la détérioration de la fonction pancréatique durant le diabète [640] et elle implique la synthèse et la maturation de l'insuline. Un traitement avec des antioxydants, vitamine E et N-acétyl-cystéine, protège la fonction pancréatique β , restaure le contenu en insuline et l'expression de son gène [375].

I - B-2-9-12-2-b Stress oxydant et sécrétion d'insuline

La sécrétion d'insuline par les cellules β est régulée par une série d'événements électrogéniques conduisant à l'exocytose de granules contenant l'hormone. Elle est déclenchée par le glucose selon une séquence complexe (Figure 16) : l'entrée du glucose dans la cellule et sa métabolisation par la voie de la glycolyse conduisent à une augmentation du ratio ATP/ADP cytosolique. S'en suit une fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}), une ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et l'exocytose des granules d'insuline [486]. Il a été montré qu'en condition de stress oxydant induite par des espèces réactives telles que l' H_2O_2 et l' HO^\bullet , l'exocytose était inhibée *via* des effets sur la glycolyse et la production d'ATP [404;477;486]. L'hyperpolarisation membranaire produite par ces espèces réactives, active directement les canaux K_{ATP} et maintient la fermeture de ces canaux calciques voltage-dépendants en altérant la sécrétion d'insuline [265;538].

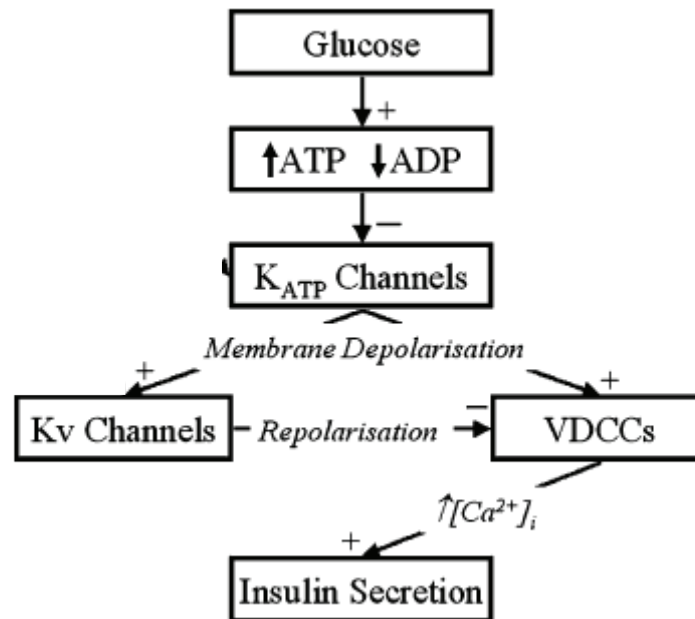


Figure 16 : Mécanismes électrogéniques conduisant à la sécrétion d'insuline, adaptée de [481].

I - B-2-9-12-2-c Stress oxydant et sensibilité à l'insuline

Le stress oxydant et ses effets dans le contexte de la résistance à l'insuline ont été particulièrement étudiés avec H_2O_2 et HO^\bullet et leurs conséquences sur le récepteur à l'insuline (IR) et ses substrats (IRS-1 et 2) et la complexe voie de la signalisation de l'insuline [216;217]. Très brièvement, en conditions normales, la phosphorylation de la sous-unité α du récepteur induite par la liaison avec l'hormone [217] conduit à l'activation des molécules de IRS-1 et de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) [546]. Cette dernière est nécessaire et suffisante pour induire la phosphorylation et l'activation de PKB (aussi appelé Akt). Il a été montré dans la lignée cellulaire 3T3-L1 (cellules adipocytaires de rat), qu'une surexpression de PKB conduit à une augmentation du transport de glucose et à la

translocation de GLUT-4 [150]. Une inhibition par H_2O_2 de la transduction du signal de l'insuline passant par un blocage de l'activation de IR, IRS et PI 3-K a été particulièrement montrée dans des études animales [217]. Une augmentation de la phosphorylation des molécules de IRS sur certains résidus, réduisant leur association à IR et inhibant la voie dépendante de la PI 3-K ont été particulièrement montrés en présence de H_2O_2 et $O_2^{\bullet-}$ [39]. Par conséquent l'activité de PKB est inhibée, ainsi que la translocation de GLUT-4 [150]. Cela peut conduire à une intolérance au glucose et un diabète de type 2 [75]. De plus, il a été montré qu'une inactivation prolongée de la protéine tyrosine phosphatase (PTP) par H_2O_2 et les métaux de transition (zinc et cuivre) pouvait favoriser la résistance à l'insuline dans le diabète de type 2 [92;293;488]. En dehors de l'action directe d'espèces réactives, les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, $TNF\alpha$) ont aussi été impliquées dans le développement du diabète de type 2 sans que l'ensemble des mécanismes soit encore clairement établi [15;729]. Comme précédemment, ceci passerait par des processus de phosphorylation de certains résidus de IRS-1 et par l'activation de NF- κ B [729].

I - B-2-9-12-3 Études humaines

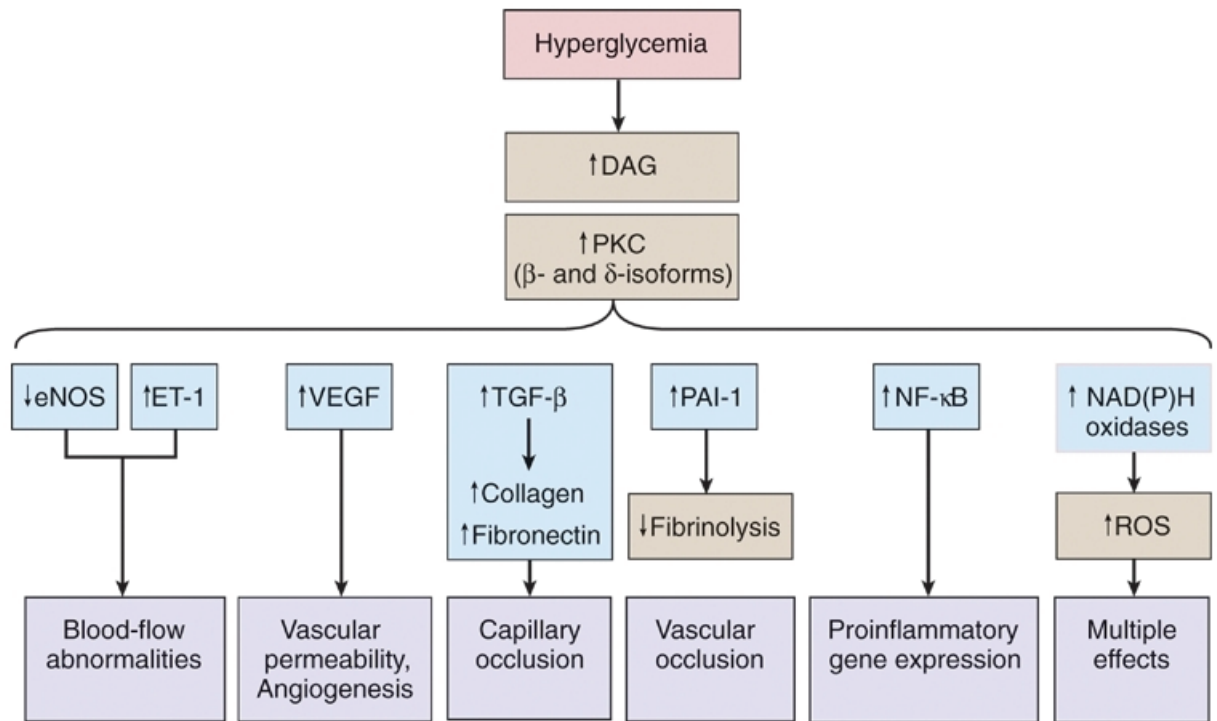
Encore peu d'études chez l'homme ont clairement mis en évidence l'implication du stress oxydant dans la programmation développementale du diabète de type 2. L'association entre un RCIU et une augmentation du stress oxydant est cependant assez bien documentée chez l'homme [94;377] avec une diminution des activités de la SOD, de la CAT et des niveaux sanguins de GSH. De plus, des niveaux plus bas de vitamines C et E ont été retrouvés chez des enfants prématurés (29-36 semaines d'aménorrhée) en comparaison à des enfants nés à terme [63]. Une association a été aussi trouvée entre les concentrations plasmatiques

maternelles et dans le sang de cordon de GSH et de MDA, traduisant que les niveaux de stress oxydant maternel peuvent être transférés au fœtus [31]. Des concentrations plus élevées de MDA ont également été retrouvées dans le sang de cordon de nouveau-nés petits pour l'âge gestationnel en comparaison à celles observées chez des nouveau-nés adaptés pour l'âge gestationnel [289]. Enfin, un rapide gain de poids durant l'enfance chez des enfants nés avec un faible poids de naissance ou prématurément a été associé avec le développement d'un diabète de type 2 plus tard dans la vie [52;213;229;469] et à l'obésité [563].

I - B-2-9-12-4 Complications macro et microvasculaires du diabète

I - B-2-9-12-4-a Complications microvasculaires

Une hyperglycémie postprandiale conduit à des effets délétères au niveau des tissus périphériques qui se traduisent par une augmentation du flux sanguin rétinien, de la filtration glomérulaire et du flux plasmatique rénal, ainsi que d'une diminution de la conduction nerveuse sensitive et motrice [132], provoquant des pathologies telles que la rétinopathie [36;286;396], la néphropathie [632;703;766] et la neuropathie [132;441;864] (Figure 17). Ces dommages tissulaires ne se produisent que dans des types bien particuliers de cellules : rétiniennes, mésangiales du glomérule rénal et au niveau des neurones et cellules de Schwann du nerf périphérique. Cela s'explique par le fait que ces cellules sont incapables de réduire le transport du glucose lorsqu'elles sont exposées à l'hyperglycémie conduisant par conséquent à une quantité importante de glucose à l'intérieure des cellules [309;371].



(Adapted from Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 414:815, 2001. Copyright © 2001 Nature, www.nature.com.)

Copyright 2006 by Elsevier, Inc.

Figure 17 : Hyperglycémie et complications microvasculaires du diabète.

DAG : diacylglycérol; **PKC** : protéine kinase C; **eNOS** : NOS endothéliale; **ET-1** : endothéline-1; **ROS** : espèces réactives de l'oxygène

La formation de peroxy-nitrites va provoquer la cassure double brin de l'ADN, qui peut être détectée par la présence de 8-hydroxyguanine et 8-hydroxydéoxyguanosine [583]. Cette cassure double brin va conduire à l'activation de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP), une enzyme de réparation de l'ADN et à une inhibition de l'activité de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) [198]. Cela va avoir pour conséquence une augmentation des intermédiaires glycolytiques en amont de la GAPDH. Plusieurs voies métaboliques vont être ainsi modulées (Figure 18) : 1) la formation des produits terminaux

de glycation ou *advanced glycation end products* (AGEs), 2) l'activation de la protéine kinase C (PKC), et 3) l'activation de la voie des polyols [639] [645].

AGEs : L'hyperglycémie peut entraîner la formation de résidus glycosylés ou produits d'Amidori, issus de réactions non enzymatiques entre le glucose et les amines primaires des protéines; ils subiront une série de modifications et seront convertis en adduits covalents stables ou AGEs [105]. Leur formation peut également provenir d'une part, de l'auto-oxydation intracellulaire du glucose en glyoxal [640] et d'autre part, de la fragmentation de certains composés de la glycolyse (ex : glycéraldéhyde-3-phosphate, dihydroxyacétone phosphate) en méthylglyoxal [639]. Leur liaison avec leurs récepteurs spécifiques cellulaires induit une production massive d'espèces réactives [737] à travers l'activation de la NOX [290]. Le rôle des AGEs dans la production d'ERO a été clairement démontré dans la survenue des complications vasculaires du diabète [737].

L'interaction entre les AGEs et leurs récepteurs durant une hyperglycémie activerait la **PKC**, dont la régulation dépend du statut redox, par les ERO/ERN [273]. Celle-ci à son tour, activera NOX en augmentant encore la production d'espèces réactives [352].

Les **polyols** sont formés via l'action de l'aldose réductase qui convertit les aldéhydes en alcools [278]. En condition physiologique, cette enzyme a une faible affinité pour le glucose mais lors d'une hyperglycémie, une partie de l'excès est converti en sorbitol [105]. L'aldose réductase étant NADPH-dépendante, une hyperglycémie prolongée va rendre la cellule vulnérable à l'action des ERO en diminuant les niveaux de NADPH avec de potentiels effets sur le GSH [105]. De plus, l'oxydation du sorbitol en fructose par cette voie va augmenter le ratio NADH/NAD^+ , induire une accumulation des trioses phosphates qui à leur tour, vont induire la formation des AGEs [639].

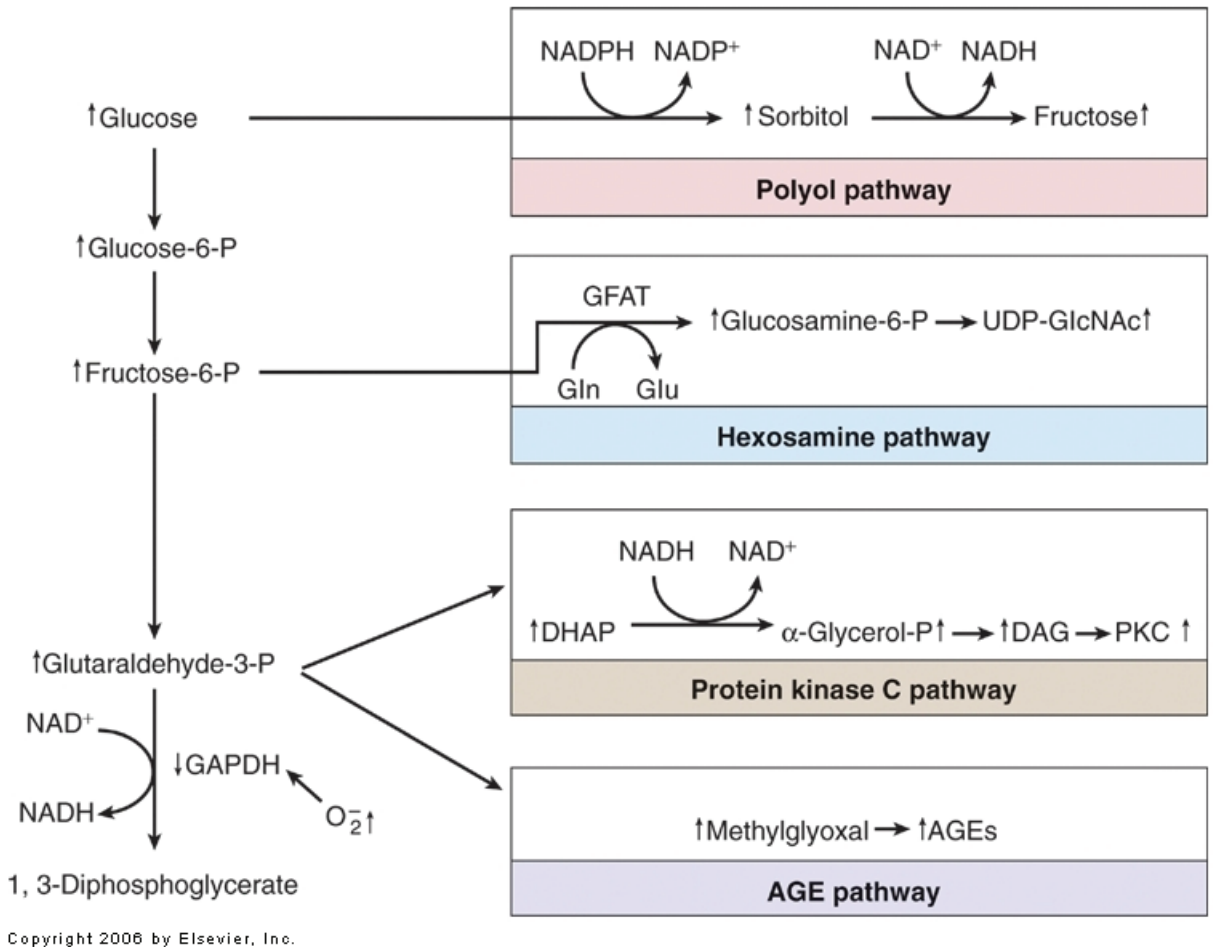


Figure 18 : Voies impliquées dans les complications microvasculaires du diabète.

AGEs : produits terminaux de glycation; **DAG** : diacylglycérol; **PKC** : protéine kinase C

I - B-2-9-12-4-b Complications macrovasculaires

Les patients diabétiques ont une prévalence accrue de survenue de maladies cardiovasculaires [405]. L'athérosclérose coronarienne est plus fréquente chez les patients diabétiques comparés aux non-diabétiques [195]. Le risque d'accidents cérébrovasculaires est également important chez les individus diabétiques et représente une cause importante de morbidité et mortalité [442]. En contraste avec les complications microvasculaires, des

données provenant du UKPDS (U.K.Prospective Diabetes Study) [1] ont montré que l'hyperglycémie n'est pas le principal déterminant pour les complications macrovasculaires du diabète. Par l'utilisation de modèles cellulaires et animaux, il a été montré que l'augmentation dans le flux d'acides gras libres (AGL), à partir des adipocytes, pénétrant à l'intérieur des cellules endothéliales artérielles conduit à une augmentation de l'oxydation de ces AGL par la mitochondrie. Cela conduit à une surproduction d'ERO de la même manière que celle décrite pour l'hyperglycémie avec une activation des mêmes voies : AGE, PKC, GlcNac (hexasamine) et NFκB. Nous pouvons noter que l'inhibition de la relâche des AGL à partir des adipocytes ou de leur oxydation prévient la survenue de ces phénomènes [106].

I - C MODÈLES UTILISÉS

I - C-1 DIÈTES FAIBLES EN PROTÉINES DURANT LA GESTATION

I - C-1-1 Différentes diètes

Plusieurs études ont bien documenté chez le rat qu'une restriction de protéines durant toute la gestation de la rate est associée à un RCIU et au développement d'une hypertension plus tard dans la vie.

La majorité des études a étudié les effets de l'administration pour une durée variable (allant de 14 jours avant l'accouplement à une partie ou toute la gestation) d'une diète contenant 6, 9, 12 ou 18 % de protéines [419]. La diète 9 % a conduit à une élévation de la pression sanguine, peu de différences ont été observées entre les diètes 12 et 18 %. Certes, l'administration d'une diète 6 % conduit à l'augmentation plus importante de la pression

sanguine dans la descendance mais une plus grande mortalité dans les premières semaines de vie a été observée et cette diète a été peu utilisée dans les études.

Il existe une période optimale pour l'administration d'une diète restreinte en protéines et l'observation d'une élévation de la pression sanguine dans la descendance. Un effet maximum sur la pression sanguine a été observée si la restriction protéique incluait la dernière semaine de gestation [426;491;786;838].

I - C-1-2 Choix de la diète utilisée

Plusieurs équipes de recherche, dont la nôtre ont administré une diète contenant 9 % de protéines (LP) durant toute la gestation de la rate. La diète LP est réduite de 50 % en protéines (en comparaison à la diète contrôle (CTRL), 18 %) mais fournit 75 % des besoins en protéines d'une rate gestante [148]. La source de protéines est la caséine, protéine du lait. Ces diètes contiennent 5 g/kg de méthionine et sont isocaloriques avec une supplémentation en sucrose et amidon.

À la naissance, la plupart des études (mais pas toutes [855]) rapportent que les petits de mère LP ont un poids plus faible que les contrôles [420;421;686]. Dès 7 semaines de vie, la pression artérielle des LP est significativement plus élevée que celle des CTRL. La différence s'accroît jusqu'à la 14^{ème} semaine et est toujours présente à la 20^{ème} semaine [419]. Tant les mâles que les femelles ont une pression artérielle augmentée qui a été constatée lors de mesures de la pression sanguine faites à la queue [426] et *in vivo* chez l'animal vigile, non restreint, et chroniquement cathétérisé [117;424;610].

I - C-1-2-1 Implication du SRA

Le SRA joue un rôle clé dans l'initiation et le maintien de l'élévation de la pression sanguine associée avec une altération du milieu intra-utérin. Dans une série d'études précédant mon doctorat, nous avons tout d'abord étudié si les baroréflexes artériels et la pression sanguine étaient altérés dans notre modèle et si le SRA jouait un rôle dans ces altérations. Chez les descendants LP (comparé aux descendants CTRL, 18 %) nous avons observé que la pression sanguine moyenne était augmentée et que la variabilité de la pression sanguine était plus importante. À la suite de l'infusion de phényléphrine et de losartan, les baroréflexes ont été décalés vers les plus hautes pressions. Pour investiguer l'implication éventuelle du SRA périphérique, nous avons administré un iECA, l'énalapril, et avons observé un décalage des baroréflexes vers des pressions sanguines plus basses. Pour investiguer l'implication potentielle du SRA central, nous avons administré intracérebroventriculairement le losartan (bloqueur du récepteur AT1 de l'AngII) et avons constaté une réduction de la pression sanguine moyenne, une augmentation de l'expression du récepteur AT1.

Ces données ont démontré un rôle du SRA central et périphérique dans l'hypertension induite après une privation en protéines en période fœtale [610].

I - C-1-2-2 Altération de la vasoréactivité à l'Angiotensine II et de la production d'anions superoxide

Par la suite, nous avons observé *ex-vivo*, sur les artères carotidiennes, une élévation de la vasocontraction à l'AngII. Parmi les mécanismes que nous avons investigués, la co-incubation avec le tempol, analogue de la superoxide dismutase, normalise cette

augmentation de réponse à l'AngII uniquement dans le groupe LP, traduisant la présence d'une production accrue d'anions superoxide dans ce groupe. Cette production accrue à pu être détectée au niveau aortique par deux techniques de chemiluminescence, la lucigénine (méthode quantitative) et la dihydroéthidine (méthode plus qualitative) qui ont confirmé une production vasculaire accrue d'anions superoxide dans le groupe LP. La co-incubation notamment avec l'apocynine, inhibiteur réversible de la NADPH oxydase, normalise cette production d'anions superoxide, traduisant une implication de la NADPH oxydase dans ce processus. Nous avons aussi observé une augmentation de l'expression du récepteur AT1 (principal récepteur par lequel les effets vasoconstricteur s'exercent) de l'AngII [855].

Nous avons par la suite regardé si l'élévation de la pression sanguine observée à la suite de l'administration d'une diète LP à une rate durant toute sa gestation s'accompagnait d'altérations de la structure vasculaire. En effet, aussi bien dans les cas d'hypertension à la fois expérimentale et clinique, une augmentation de la résistance vasculaire périphérique résulte en une dysfonction vasculaire associée ou non à des changements structuraux [226;402]. Le remodelage artériel, et la diminution dans la densité des capillaires et artérioles, appelée raréfaction microvasculaire, [90] font partie des changements de la structure vasculaire pouvant être observés.

Nous n'avons pas observé de remodelage artériel dans notre groupe LP. Cependant, la densité artériolaire et capillaire mesurée au niveau du muscle *tibialis anterior* est significativement diminuée chez l'adulte, et aussi plus tôt au cours de la vie (présent dès le 7^{ème} et aussi au 28^{ème} jour de vie), mais pas au dernier jour de gestation. Ces observations suggèrent l'implication d'un élément déclenchant postnatal associée à une exposition à la diète LP en anténatal. De plus cette raréfaction microvasculaire semble primaire au développement de l'hypertension.

I - C-1-2-3 Implication d'un stress oxydant périnatal

Un élément environnemental majeur modifié à la naissance est la pression partielle en oxygène (PaO_2) sanguine de part l'exposition à l'air ambiant contenant 21 % d' O_2 . Nous avons émis l'hypothèse qu'une déplétion en nutriments durant la période fœtale pourrait diminuer les capacités antioxydantes du nouveau-né, le rendant par conséquent plus susceptible aux dommages oxydatifs à la naissance. Nous avons donc envisagé qu'un stress oxydant périnatal pourrait jouer un rôle dans la programmation développementale de l'hypertension, la dysfonction vasculaire et la raréfaction microvasculaire associée avec une déplétion en protéines durant la gestation. Pour tester cela, nous avons supplémenté la diète LP durant toute la gestation, avec un antioxydant, le lazaroïde, un inhibiteur de la peroxydation des lipides. Le lazaroïde a permis de prévenir dans la descendance LP à l'âge adulte: i) l'élévation de la pression sanguine, ii) l'exagération de la réponse à l'AngII, iii) le défaut de relaxation endothélium indépendant en réponse au nitroprussiate de sodium, iv) la raréfaction microvasculaire, v) la diminution des niveaux de glutathion total au niveau hépatique chez le fœtus, vi) l'augmentation des niveaux rénaux du 8-iso-PGF 2α [117].

Par conséquent, cette série d'études suggère que la présence d'un stress oxydant périnatal peut conduire à des altérations permanentes dans le développement du système cardiovasculaire.

Nous avons par conséquent voulu vérifier qu'un stress oxydant en période néonatale pouvait induire une altération de la structure et de la fonction du système cardiométabolique. Ces études seront la trame de mes études doctorales. Pour le nouveau-né, l'augmentation dramatique de la PaO_2 à la naissance représente la source potentielle la

plus importante d'ERO et donc de stress oxydant, particulièrement si son organisme n'est pas prêt à y faire face, comme c'est le cas pour les nouveau-nés prématurés ou avec un RCIU (cf. ci-dessous). Pour ces études, nous avons donc utilisé un modèle animal dans lequel nous avons exposé des rats âgés de 3 jours de vie avec leur mère à une concentration élevée en oxygène (80 %) pendant une semaine.

I - C-2 EXPOSITION A UNE HYPEROXIE EN PÉRIODE NÉONATALE

L'oxygène est la thérapie la plus fréquemment utilisée chez les nouveau-nés, notamment chez les enfants prématurés. La supplémentation en oxygène permet de maintenir une PaO_2 adéquate, qui est évaluée cliniquement en mesurant la saturation en oxygène (SaO_2). Cependant, si la PaO_2 normale d'un nouveau-né de quelques heures de vie est d'environ 90 mm Hg, elle est de 30 mm Hg chez le fœtus. Cette augmentation rapide de PaO_2 peut générer une quantité importante de radicaux libres de l'oxygène. Il est clairement admis maintenant que la toxicité cellulaire induite par l'oxygène est le résultat de la formation de radicaux libres hautement réactifs. Parmi eux, l'anion superoxide, espèce très réactive, semble être le principal agent responsable de la toxicité cellulaire induite par l'oxygène [218;664]. Parmi les complications liées à la prématurité, la dysplasie bronchopulmonaire (DBP) et la rétinopathie du prématuré (ROP) sont les principales pathologies dont l'exposition à l'oxygène est un facteur étiologique déterminant. Ces deux pathologies sont caractérisées par un développement vasculaire anormal résultant en une paucité alvéolaire au niveau pulmonaire et, au niveau de l'œil en une ischémie rétinienne. Cette ischémie mène secondairement à une production accrue de molécules proangiogéniques et une prolifération vasculaire exagérée et non organisée, qui dans les cas les plus sévères peut conduire à une cécité de l'enfant [137]. Cependant, les conséquences vasculaires

systémiques (à court et à plus long terme) d'une exposition néonatale à l'hyperoxie n'étaient que peu ou pas étudiées lorsque ces études de doctorat furent entreprises.

I - C-2-1 Environnement hyperoxique : une définition

Une exposition à un environnement hyperoxique conduit à des effets toxiques dont la sévérité va dépendre du degré d'hyperoxie et de la durée d'exposition. Un environnement hyperoxique se définit comme un environnement dans lequel la pression partielle en oxygène est au dessus de la normalité observée dans les organes ou organelles physiologique pour l'organisme étudié, et ceci dépendra aussi de son stade de développement.

Ainsi la condition dite « hyperoxique » va dépendre du type cellulaire, des conditions *in vivo* et *in vitro*. Par exemple si des suspensions cellulaires issues de tissus de mammifères sont exposées à 20 % d'oxygène, leur environnement est hyperoxique en comparaison à leur environnement physiologique. Alors que le tissu pulmonaire dans lequel les cellules sont normalement exposées possède une tension en oxygène supérieur à 100 torrs. En comparaison, la PaO₂ cérébrale est environ 30 torrs à l'air ambiant pour les rats [314]. Par conséquent, il ne peut exister de définition unique ou « universelle » d'un environnement hyperoxique.

I - C-2-2 Sensibilité du nouveau-né à l'oxygène

À l'âge adulte, les animaux et humains sont plus sensibles à une exposition à 85-100 % d'oxygène. La majorité des animaux adultes meurt dans les 72 h de l'exposition [242], probablement secondairement à des dommages pulmonaires inflammatoires caractérisés par la formation d'œdème, d'atélectasies, de dépôt de fibrine, de congestion, d'épaississement

artériolaire et d'hyalinisation, d'hypertrophie et d'hyperplasie des cellules alvéolaires [64]. Des études expérimentales ont montré que les nouveau-nés étaient très résistants à une hyperoxie en terme de survie à tout le moins. En effet, Bonikos *et coll.* [86] montrèrent que 75 % des souriceaux nouveau-nés (à terme) pouvaient survivre dans 100 % d'oxygène pendant une semaine. Alors que des souris adultes meurent entre le 3^{ème} et 7^{ème} jour d'exposition. Certaines espèces de nouveau-nés telles que le cochon d'Inde et le hamster ont une sensibilité vis-à-vis de l'oxygène identique à celle des adultes [242]. Cependant, l'exposition à des concentrations élevées d'oxygène chez le nouveau-né aura un impact sur le développement des organes et de leur fonctionnement.

I - C-2-3 Modulation de la tolérance à l'oxygène

I - C-2-3-1 Les défenses antioxydantes

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'oxygène, il a été suggéré une incapacité à augmenter l'activité des défenses antioxydantes pulmonaires en réponse à cette exposition. Cela a été observé chez le lapin préterme (29^{ème} /32^{ème} jours de gestation) qui n'augmentait pas l'activité de ces défenses antioxydantes (CAT, SOD, GPx) le rendant par conséquent plus sujet à développer des lésions pulmonaires [244]. Les rats nouveau-nés sont moins sensibles vis-à-vis de l'oxygène que les adultes, et il a été montré que cette résistance vis-à-vis de l'exposition à l'oxygène 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 (SOD (valeur du pic: 144 % des animaux non exposés), GPx (126 %), niveaux de GSH (176 %)),

phénomène qui ne se produit pas chez des animaux adultes [845]. La SOD semble être le principal mécanisme de défense vis-à-vis de l'oxygène puisque, dès 24 h d'exposition l'activité de la SOD au niveau pulmonaire est maximale dans le poumon de rats nouveau-nés.

Il est envisagé que certains facteurs peuvent améliorer la tolérance vis-à-vis de l'oxygène.

I - C-2-3-2 Exposition préalable à l'oxygène

La tolérance vis-à-vis de l'oxygène peut cependant être induite chez les rongeurs adultes. Il a en effet été montré que l'exposition de rats à 100 % d'oxygène pour 48 h, puis leur retour à l'air ambiant pendant 24 h avant une seconde exposition à 100 % d'oxygène permet d'assurer une survie de 7 jours dans ces conditions [243].

Le facteur-1 induit par l'hypoxie et les protéines de choc thermique peuvent induire une protection contre l'hyperoxie [332].

I - C-2-3-3 Effet nutritionnel

L'état nutritionnel du nouveau-né semble pouvoir aussi moduler la sensibilité à l'oxygène [706]. Un RCIU due à une privation nutritionnelle augmente la sensibilité à l'oxygène [86;244].

I - C-2-3-4 Exposition aux glucocorticoïdes

Une exposition néonatale aux corticoïdes peut conduire à une meilleure tolérance (résistance) vis-à-vis de l'oxygène. En effet, chez le fœtus mouton, l'administration de corticoïdes anténataux a augmenté l'activité des enzymes antioxydantes en parallèle avec le

surfactant, améliorant ainsi la tolérance vis-à-vis de l'oxygène [801]. Cela a été confirmé chez des enfants prématures qui exposés à des corticoïdes anténataux présentent à la naissance et à un jour de vie une activité des enzymes antioxydantes plus élevée ((à un jour de vie: SOD: 2,5 IU/gHgb vs. 1,0) et CAT (200 IU/gHgb vs. 150 IU/gHgb)), ainsi qu'une diminution des indicateurs de stress oxydant (diminution du rapport GSH/GSSG (2800 vs. 2000) et de l'oxydation des protéines (élimination plus importante à un jour de vie du rapport ortho-tyrosine/phénylalanine 9000 vs. 14000 [787] en comparaison aux enfants non-exposés.

I - C-2-3-5 Exposition à l'endotoxine

Le traitement à l'endotoxine peut aussi favoriser la survie des individus exposés à l'oxygène. Des rats nouveau-nés traités avec l'endotoxine survivent aussi bien que les rats CTRL à 14 jours d'exposition à 95 % d'oxygène, mais supportent beaucoup mieux le retour à l'air ambiant. Leurs poumons présentent moins de simplification alvéolaire et une microvasculature pulmonaire plus normale [241].

I - C-2-4 Modèle animal utilisé pour les études de doctorat

À la vue de tous ces facteurs, nous avons utilisé des ratons SD que nous avons placé avec leur mère à 80 % d'oxygène pendant 7 jours entre le 3^{ème} et le 10^{ème} jour de vie. Les mères et leur portée arrivent à l'animalerie du centre de recherche du CHU Sainte Justine au 1^{er} jour de vie. Pour éviter la mortalité maternelle, nous avons interchangé la mère dont les ratons sont maintenus à 80 % d'oxygène avec une autre mère dont les ratons sont à l'air ambiant.

II - BUT ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

Le but général de mon projet de doctorat a été d'étudier et de mettre en évidence certains mécanismes pouvant relier les dommages de la prématurité induits par l'oxygène et le risque à long terme de développer des maladies cardiovasculaires et métaboliques dans le concept global d'une programmation développementale de l'hypertension.

La mortalité par maladies cardiovasculaires est en forte augmentation au niveau mondial. Au début du 20^{ième} siècle, ces pathologies représentaient 10 % de la mortalité globale, au début du 21^{ième} siècle 50 % des décès dans les pays développés et 25 % dans les pays en voies de développement sont attribuables aux maladies cardiovasculaires [5;534]. Concernant plus particulièrement l'hypertension, sa prévalence est en forte augmentation : en 1998, on estimait que 50 millions d'Américains souffraient d'hypertension, soit 24 % de la population adulte [223]. Les données issues de l'étude "U.S.National Health and Nutrition Examination survey (NHANES)" réalisée entre 1999 et 2002, ont indiqué que cette prévalence était supérieure à 28 %, touchant ainsi un adulte âgé de plus de 20 ans sur 4 [269]. En plus des facteurs de risque tels que l'hérédité et le mode de vie, il est maintenant bien établi que des événements s'étant déroulés précocement dans la vie peuvent avoir un retentissement sur l'incidence de maladies cardiovasculaires et de ses complications [52;55;436;451]. Des évidences indirectes supportent également le rôle d'un stress oxydant périnatal dans le développement de l'hypertension [117;619].

De nombreuses études indiquent que la prématurité, qui concerne 6 % des naissances en France et jusqu'à 11 % des accouchements aux États-Unis, est associée à des indices précoces de dysfonction vasculaire, d'élévation de la pression sanguine et de survenue de diabète de type 2. Les enfants nés prématurément sont plus sujets aux blessures oxydatives

de par l'immaturation de leurs défenses antioxydantes et de leur exposition à des situations pro-oxydantes (exposition à l'air ambiant ou à un supplément d'oxygène, ou à une exposition aux infections).

Dans ce contexte, l'hypothèse testée au cours de ce projet a été qu'une exposition à un stress hyperoxique en période néonatale induit des changements de structure et de fonction vasculaires et métaboliques persistant à l'âge adulte.

Dans un premier temps, nous avons évalué les effets d'une exposition à l'oxygène de rats nouveau-nés sur la pression sanguine et le statut vasculaire à l'âge adulte. Dans un modèle établi et validé pour reproduire un stress hyperoxique chez le rat [194;411], différentes approches (*in vivo*, *ex vivo*, immunohistologie...) ont été utilisées pour étudier la fonction vasculaire et la présence d'un stress oxydant au cours de la croissance et à l'âge adulte, entre 17 et 30 semaines d'âge.

Les pressions sanguines systolique et diastolique ont été mesurées de l'âge de 4 à 15 semaines de vie. La fonction vasculaire a été étudiée *ex vivo*, en chambre d'organes, à l'âge de 4 semaines (aorte) et à l'âge adulte (carotides); des courbes doses réponses ont été générées avec :

- des vasoconstricteurs : l'AngII en présence ou non de tempol, un analogue de la superoxyde dismutase et la phényléphrine, un analogue du thromboxane A2 (U46619).
- des vasodilatateurs : le carbachol, un vasodilatateur endothélium-dépendant et analogue de l'acétylcholine en présence ou non de tempol et le nitroprussiate de sodium (SNP), un vasodilatateur endothélium-indépendant.

L'expression d'eNOS a été analysée par immunohistochimie et western blot. La production d'oxyde nitrique a été mesurée par l'utilisation d'une sonde fluorescente (DAF-2) [493] en condition basale et après co-incubation avec la L-arginine et la L-sépiaptérine.

Par ailleurs, le stress oxydant vasculaire a été évalué à 4 semaines et à l'âge adulte avec les niveaux d'anions superoxide dans l'aorte, déterminés par chemiluminescence [76;855], les niveaux de malondialdéhyde plasmatique mesurés par HPLC [456] et les concentrations erythrocytaires de glutathion oxydé et réduit [433] déterminées par électrophorèse capillaire. La présence d'eNOS découplée, responsable d'une augmentation de la production d'anions superoxide [726] a été évaluée par chemiluminescence en présence ou non de L-NAME (inhibiteur d'eNOS).

Des mesures morphologiques de la densité capillaire ont été réalisées sur le muscle *tibialis anterior* à l'âge de 4 semaines et adulte [611], en complément de l'évaluation quantitative du contenu en élastine et collagène des segments aortiques à l'âge de 4 semaines. Grâce à une collaboration avec l'Université d'Alberta, l'expression et l'activité des MMPs et des inhibiteurs tissulaires des MMPs, éléments régulateurs de la matrice extracellulaire, ont été étudiées respectivement par western blott et par zymographie.

Enfin, la VOP, un bon indicateur de la rigidité artérielle, a été mesurée par ultrasons à l'âge adulte.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué les conséquences métaboliques toujours chez le rat de l'exposition néonatale à l'oxygène.

Dans cette partie de notre projet de recherche, nous avons regardé si l'élévation de la pression sanguine associée à des dysfonctions vasculaires peut s'accompagner de modifications dans certains paramètres métaboliques pouvant potentiellement conduire au

développement de diabète de type 2. En effet, l'hypertension et le diabète de type 2 sont deux éléments retrouvés directement associés au syndrome métabolique, lui aussi lié à une augmentation du stress oxydant pouvant contribuer à son développement [133].

L'évolution pondérale des rats au cours de la croissance, entre la 7^{ème} et 25^{ème} semaine de vie a été suivie; la composition corporelle des animaux adultes ayant été mesurée par un densitomètre. De plus, la tolérance au glucose et la résistance à l'insuline ont été mesurées grâce à un test de tolérance au glucose et l'index HOMA. Les niveaux plasmatiques de cholestérol, des triglycérides et des acides gras plasmatiques non estérifiés sont souvent associés à la résistance à l'insuline [719]. Ils ont donc été mesurés. Enfin, afin de mieux comprendre les conséquences métaboliques observées, nous avons investigué dans le muscle et le foie, les changements d'Akt et du récepteur au glucose GLUT-4, impliqués dans les voies de signalisation de l'insuline.

L'ensemble des données présentées dans ce travail de doctorat a été obtenu grâce à l'utilisation d'un modèle animal avec un design expérimental particulier schématisé dans la Figure 19.

- Des rats SD nouveau-nés sont placés avec leur mère dans un environnement enrichi en oxygène (80 %) pendant 7 jours, entre le 3^{ème} et le 10^{ème} jour de vie (oxycycler A820CV, Biosherix). Ces animaux constituent le groupe **exposé à l'oxygène (H)**.

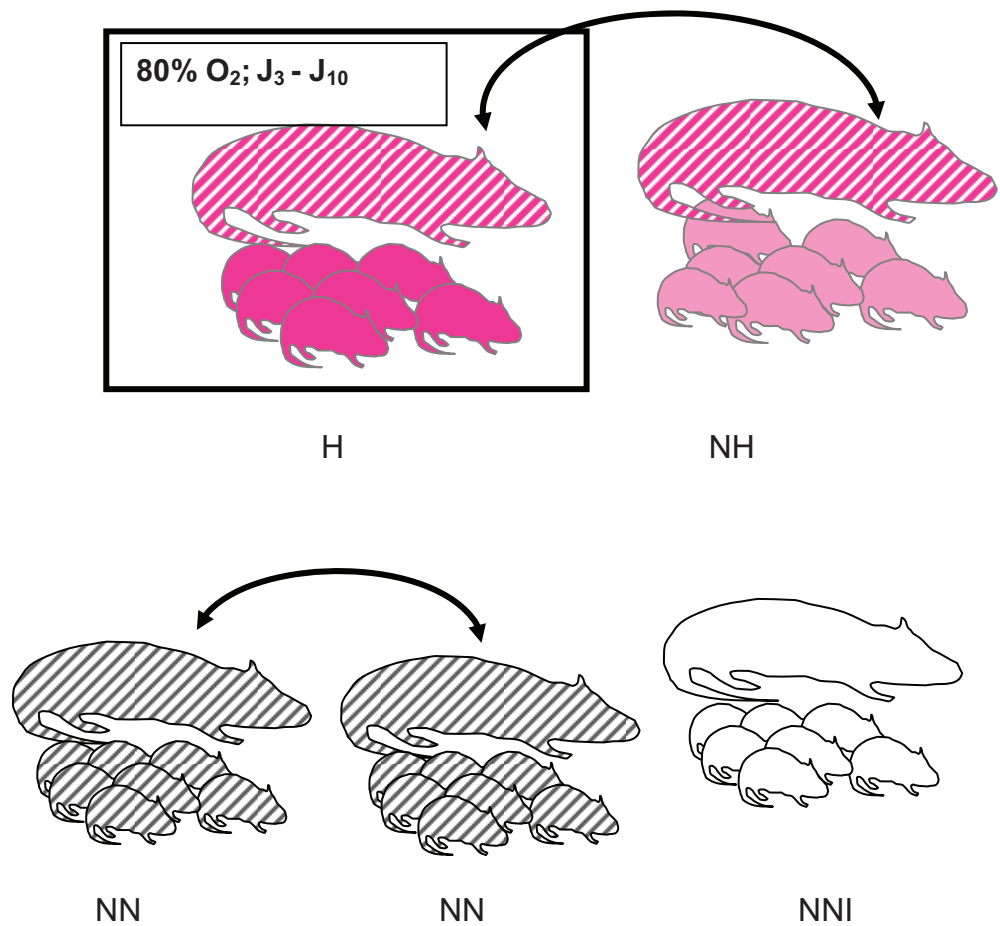


Figure 19 : nos groupes expérimentaux.

H : groupe hyperoxie; **NH** : groupe normoxie-hyperoxie; **NN** : groupe normoxie-normoxie; **NNI** : groupe normoxie non interchangeé

Trois groupes additionnels ont été constitués :

- Pour éviter une mortalité de la mère dont la portée est exposée à l'oxygène, cette rate a été interchangeée toutes les 12 h avec une autre mère dont la portée est gardée à l'air ambiant. Ces petits ont, par conséquent, été nourris 12 h/jour par une mère ayant été exposée à l'oxygène, d'où le nom du groupe "**normoxie-hyperoxie (NH)**".
- Afin de vérifier que les résultats obtenus sont la conséquence de l'exposition directe à l'oxygène et non du changement de mère et pour s'affranchir des effets d'une

éventuelle modification du lait de la mère après l'exposition à l'oxygène, nous avons constitué un groupe d'animaux dans lequel deux mères ont été interchangeées toutes les 12 h. Les portées tout comme les mères sont restées à l'air ambiant, elles constituent le groupe "**normoxie normoxie (NN)**".

- Finalement, pour s'affranchir des effets d'un potentiel stress induit par le changement de mère, nous avons étudié un quatrième groupe, des portées restées à l'air ambiant sans changement de mère. Ce groupe contrôle est identifié "**normoxie non interchangeé (NNI)**".

Le modèle animal que nous avons choisi d'utiliser est bien connu pour l'étude à court terme des complications de la prématurité à la suite d'une exposition à l'oxygène, dont la rétinopathie du prématuré et la dysplasie bronchopulmonaire. Cependant, 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, son âge gestationnel, son sexe, le stress oxydant prénatal associé, par exemple l'exposition aux toxines maternelles (tabac, alcool, drogues), à la prééclampsie, et le type de complications néonatales (infections, problèmes respiratoires).

L'utilisation de l'approche phénotypique extrême choisie nous a permis de mieux comprendre les conséquences à long terme d'un stress oxydant néonatal. Nos résultats vont élargir le champ d'études de la programmation développementale des dysfonctions vasculaires et métaboliques.

III - RÉSULTATS

III - A PREMIER ARTICLE: NEONATAL OXYGEN EXPOSURE IN RATS LEADS TO CARDIOVASCULAR AND RENAL ALTERATIONS IN ADULTHOOD

Publié dans Hypertension. 2008;52:889-895.

Contexte de l'étude

Les conséquences vasculaires et rénales d'un stress hyperoxique néonatal ne sont pas clairement définies.

Objectifs

Nous avons voulu regarder si une exposition à un stress oxydant majeur (80 % d'oxygène) en période néonatale (du 3^{ème} au 10^{ème} jour de vie) pouvait conduire à une élévation de la pression sanguine associée à une altération de la fonction et de la structure vasculaire et une altération de la structure rénale, élément important dans la régulation de la pression sanguine.

Résultats

Les deux sexes ont été étudiés. Les animaux ayant été exposés à l'oxygène en période néonatale présentent une élévation de la pression sanguine systolique et diastolique dès 7 semaines de vie. Les études *ex vivo* ont montré une augmentation de la vasocontraction maximale à l'AngII et, uniquement chez les mâles, une augmentation de la sensibilité à l'AngII. Pas de différence dans les réponses vasocontractiles à la phényléphrine ni au U46619, analogue du thromboxane A2. Nous avons aussi observé un défaut de relaxation endothélium-dépendant en réponse au carbachol, analogue de l'acétylcholine, mais pas en réponse au nitroprussiate de sodium (SNP), vasodilatateur endothélium-indépendant.

La co-incubation avec le tempol, analogue de la SOD a normalisé les dysfonctions observées en réponse à l'AngII et au carbachol.

La production vasculaire (aorte) d'anions superoxyde est significativement augmentée après la stimulation par l'AngII, et l'apocynine, inhibiteur de la NADPH oxydase, a normalisé les niveaux d'anions superoxyde. D'un point de vue structurel, nous avons observé une raréfaction microvasculaire (diminution significative de la densité des capillaires de l'ordre de 30 %) et une réduction significative du nombre de néphrons de l'ordre de 25 %.

Conclusion

Nous avons montré dans cette étude, qu'une hyperoxie néonatale conduit à l'âge adulte à une élévation de la pression sanguine, une dysfonction vasculaire associée à une production accrue d'anions superoxyde induite par la NADHP oxydase, une raréfaction microvasculaire et une réduction du capital néphronique. Par conséquent, ces données suggèrent l'implication potentielle d'un stress oxydant dans la survenue de pathologies vasculaires et rénales à l'âge adulte.

Hypertension

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



*Learn and Live*SM

Neonatal Oxygen Exposure in Rats Leads to Cardiovascular and Renal Alterations in Adulthood

Catherine Yzidorczyk, Blandine Comte, Gilles Cambonie, Jean-Claude Lavoie, Nathalie Germain, Yue Ting Shun, Julie Wolff, Christian Deschepper, Rhian M. Touyz, Martine Lelièvre-Pegorier and Anne Monique Nuyt

Hypertension 2008;52;889-895; originally published online Oct 13, 2008;

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.116251

Hypertension is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2008 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0194-911X. Online ISSN: 1524-4563

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://hyper.ahajournals.org/cgi/content/full/52/5/889>

Data Supplement (unedited) at:

<http://hyper.ahajournals.org/cgi/content/full/HYPERTENSIONAHA.108.116251/DC1>

Subscriptions: Information about subscribing to Hypertension is online at
<http://hyper.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:

[adresse(s) courriel retirée(s)]

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

Neonatal Oxygen Exposure in Rats Leads to Cardiovascular and Renal Alterations in Adulthood

Catherine Zyzdorczyk, Blandine Comte, Gilles Cambonie, Jean-Claude Lavoie, Nathalie Germain, Yue Ting Shun, Julie Wolff, Christian Deschepper, Rhian M. Touyz, Martine Lelièvre-Pegorier, Anne Monique Nuyt

Abstract—Long-term vascular and renal consequences of neonatal oxidative injury are unknown. Using a rat model, we sought to investigate whether vascular function and blood pressure are altered in adult rats exposed to hyperoxic conditions as neonates. We also questioned whether neonatal O₂ injury causes long-term renal damage, important in the pathogenesis of hypertension. Sprague-Dawley pups were kept with their mother in 80% O₂ or room air from days 3 to 10 postnatal, and blood pressure was measured (tail cuff) from weeks 7 to 15. Rats were euthanized, and vascular reactivity (ex vivo carotid rings), oxidative stress (lucigenin chemiluminescence and dihydroethidium fluorescence), microvascular density (tibialis anterior muscle), and nephron count were studied. In male and female rats exposed to O₂ as newborns, systolic and diastolic blood pressures were increased (by an average of 15 mm Hg); ex vivo, maximal vasoconstriction (both genders) and sensitivity (males only) specific to angiotensin II were increased; endothelium-dependant vasodilatation to carbachol but not to NO-donor sodium nitroprussiate was impaired; superoxide dismutase analogue prevented vascular dysfunction to angiotensin II and carbachol; vascular superoxide production was higher; and capillary density (by 30%) and number of nephrons per kidney (by 25%) were decreased. These data suggest that neonatal hyperoxia leads in the adult rat to increased blood pressure, vascular dysfunction, microvascular rarefaction, and reduced nephron number in both genders. Our findings support the hypothesis of developmental programming of adult cardiovascular and renal diseases and provide new insights into the potential role of oxidative stress in this process. (*Hypertension*. 2008;52:889-895.)

Key Words: hypertension ■ vascular dysfunction ■ developmental origin of adult onset disease ■ oxygen ■ angiotensin ■ microvascular rarefaction ■ nephron number

Premature babies, representing ≈8% of all births, have decreased antioxidant defenses and are exposed on birth to high oxygen (O₂) concentration relative to the intrauterine milieu.^{1,2} This results in high O₂-derived free radicals. Evidence in humans and animal studies indicate that premature newborns are more susceptible to oxidative tissue damage, leading to pathologies such as retinopathy of prematurity and bronchopulmonary dysplasia.^{3,4} However, the long-term vascular and blood pressure consequences of neonatal hyperoxic injury are unknown.

It is becoming increasingly evident that conditions early in life can influence adult diseases; however, the mechanisms are incompletely understood.^{5,6} Recent data suggest that perinatal oxidative stress may be the initiating trigger in long-term programming of cardiovascular function. In a previous study, we found that cellular antioxidant glutathione

is decreased in the fetus of dams fed a low-protein (LP) diet during gestation. In that model, administration of the peroxidation inhibitor lazaroid to the pregnant dam prevented elevated blood pressure, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction of the adult offspring.⁷ In spontaneously hypertensive rats, although considered a model of genetic hypertension, supplementation with antioxidants during gestation and early postnatal weeks resulted in persistent reduction of adult blood pressure.⁸

The current studies were undertaken to test the hypothesis that neonatal O₂ injury causes long-term vascular damage and hypertension. Moreover, considering that the kidney plays a role in the development of hypertension and that altered renal development (resulting in lower nephron count) can be triggered by perinatal events, which contribute to adult blood pressure elevation, we also hypothesized that neonatal O₂

Received May 15, 2008; first decision June 4, 2008; revision accepted September 15, 2008.

From the Research Center (C.Y., B.C., G.C., J-C.L., N.G., Y.T.S., J.W., A.M.N.), CHU Sainte-Justine, Departments of Pediatrics and Nutrition, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; Institut de Recherche Clinique de Montréal (C.D.), Montreal, Quebec, Canada; Kidney Research Center (R.M.T.), Ottawa, Ontario, Canada; and and INSERM (M.L.-P.), U872, Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, Université Paris Descartes, Paris, France. Current addresses: Service de Réanimation Pédiatrique et Néonatale (G.C.), Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France; and INRA (B.C.), Centre Clermont-Ferrand – Theix, UMR1019, Unité Nutrition Humaine, St Genès Champanelle, France.

Correspondence to Anne Monique Nuyt, Research Center, CHU Sainte-Justine, Department of Pediatrics, Université de Montréal, 3175 Côte Sainte-Catherine, Montreal, Quebec, Canada H3T 1C5. E-mail [adresse(s) courriel retirée(s)]

© 2008 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://hyper.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.116251

injury causes long-term renal damage. Supporting these postulates, recent studies demonstrate higher blood pressure and smaller kidneys in former premature infants.^{9,10}

Materials and Methods

Animals

Animals were used according to a protocol of the animal care committee of the Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine in accordance with the principles of the Canadian Council on Animal Care Guide for the Care and Use of Experimental Animals.

Sprague-Dawley rat pups (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) were maintained in 80% O₂ (mixture of medical-grade 100% O₂ and room air with an oxy-cycler A82OCV, Biosherix) from days 3 to 10 of life (O₂-exposed group [H]; n=12 litters). To avoid maternal mortality associated with high O₂ exposure, the dam was alternated every 12 hours with a surrogate mother of a litter maintained in room air (control group NH: pups in normoxia/mother partly in hyperoxia; n=12 litters). To control for the fact that an NH litter is fed by a dam subjected 12 hours per day to hyperoxia, additional litters were maintained in room air, and dams were interchanged every 12 hours (control group NN: pups in normoxia/mother in normoxia; n=12 litters). To control for the stress of interchanging the dams, a fourth series of litters was kept in room air (control group NNI: normoxia not interchanged; n=10 litters). Pups were weaned at 4 weeks of age to regular chow. Both male and female offspring were studied. No more than 2 animals per litter were used for each series of studies.

Experimental Procedures

Please see Figure S1 (available online at <http://hyper.ahajournals.org>) for the time line.

After habituation for 1 week, systolic and diastolic blood pressures and heart rate (HR) of the offspring were determined at 4 weeks and from 7 to 14 weeks (females) and to 15 weeks (males) of age by the tail-cuff method (50-001 Rat Tail Blood Pressure System, Harvard Apparatus). Rats were then euthanized for ex vivo vascular reactivity studies, and the aorta was also sampled in a subgroup of animals for evaluation of superoxide anion production (see below). Freshly excised carotid arteries rings from 16 to 20 weeks (males) and 20 to 24 weeks (females) of age were studied as described (using DasyLab 5.6 software, Data Acquisition System Laboratory).¹¹ Four to 8 rings from 1 rat were used for 1 experiment. Cumulative concentration-response curves were generated with angiotensin II (Ang II; 1 pM to 1 μ mol/L) with and without Tempol (1 mmol/L, superoxide dismutase analogue; 30-minute preincubation in the organ chamber), with the thromboxane A₂ mimetic U46619 and phenylephrine (both 1 pM to 1 μ mol/L). Vasorelaxation to carbachol (100 nmol/L to 100 μ mol/L; with and without Tempol) and sodium nitroprussiate (1 pM to 1 μ mol/L) was measured after precontraction of the rings with U46619 (0.3 μ mol/L; 15-minute preincubation). To verify whether neonatal oxygen exposure was associated with changes in tensional force capacity, we also studied vasoconstriction to KCl (80 mmol/L) under different tension applied to the carotid artery rings,¹² which was not different between the H and NH groups (n=4 in each group; please see data for males in Figure S2).

Microvascular Density

Morphological measurements of microvascular density were performed on tibialis anterior muscle sections from 4-week-old H, NH, and NNI male rats, as described previously.¹³ These studies were designed to evaluate whether capillary rarefaction is present very early or before the blood pressure elevation process, as reported in another model of developmental programming of hypertension.^{7,13}

Evaluation of Vascular Production of Superoxide Anion by Chemiluminescence

Aortic vascular superoxide production in H and NH male and female adults was measured using lucigenin-enhanced chemilumines-

cence,¹¹ after 30-minute preincubation with Krebs solution, Krebs+Ang II (1 μ mol/L), or Krebs+Ang II+apocynin (1 mmol/L; inhibitor of the assembly of the NADPH oxidase complex).

Evaluation of Vascular Production of Superoxide Anion by Hydroethidine

Aortic superoxide levels were evaluated in H and NH male adults by the oxidative fluorescent dye hydroethidine, as described.¹¹

Nephron Count in the Kidney

At 25 to 35 weeks of age, a group of rats was anesthetized with pentobarbital. The left kidney was isolated and weighed to determine the number of nephrons per kidney, as described previously.¹⁴ Briefly, whole kidneys were incubated in 50% hydrochloric acid for 45 minutes at 37°C. Kidneys were rinsed with tap water and stored overnight at 4°C in a gauged flask. After mechanical dissociation, tubules and glomeruli were suspended in water. Three 0.5-mL aliquots were taken and placed in a hemocytometer-like chamber, and the glomeruli were counted microscopically by 3 investigators who were unaware of the specimen origin. The 3 results were averaged, and then this value was used to determine the total number of glomeruli in the sample and, therefore, in the kidney.

Chemicals

The following agents were purchased: Ang II, sodium nitroprussiate, carbachol, phenylephrine hydrochloride, U46619, and apocynin (Sigma Chemical), as well as Tempol (Fluka Chemika).

Statistical Analysis

Values are expressed as means \pm SEMs. Ex vivo concentration-response curves to Ang II, phenylephrine, and U46619 were analyzed by a computer fitting to a 4-parameter sigmoid curve using the Prism 3 program (GraphPad) to evaluate the EC₅₀ and Emax, the maximum asymptote of the curve. Analysis of differences within and between groups was performed using 2-way repeated-measure ANOVA followed by post-ANOVA comparison among means using the Bonferroni test, as well as by Student *t* test for paired or unpaired observations. Statistical significance was set at *P*<0.05.

Results

The average number of pups per litter was 14.4 \pm 0.4. No significant difference in weight gain during O₂ exposure was observed between groups (expressed in grams per rat per 7 days of exposure): H, 12.8 \pm 0.7; NH, 13.0 \pm 0.8; NN, 12.8 \pm 0.6; and NNI, 13.0 \pm 1.0. Thereafter, weight of H females was slightly but significantly decreased compared with NH, NN, and NNI (at 14 weeks, in grams: H, 300 \pm 10; NH, 318 \pm 6; NN, 316 \pm 11; and NNI, 319 \pm 9). No difference in weight between male groups was observed (at 15 weeks, in grams: H, 553 \pm 21; NH, 543 \pm 20; NN, 537 \pm 10; and NNI, 562 \pm 9). On average, 1 pup per litter was found dead from days 3 to 10 for all of the study groups. Survival was unchanged between groups throughout the entire study period.

Blood Pressure and HR

For both genders, blood pressures and HRs were similar between groups at 4 weeks. In males, systolic blood pressure was also similar at 7 weeks but was significantly higher by 9 weeks and persistently elevated throughout the remainder of the study period in the H compared with the NH, NN, and NNI groups; for diastolic blood pressure, values were significantly increased by 7 weeks of age in the H group versus NH, NN and NNI and remained elevated for the remainder of the study period (Figure 1A). In H females, systolic and

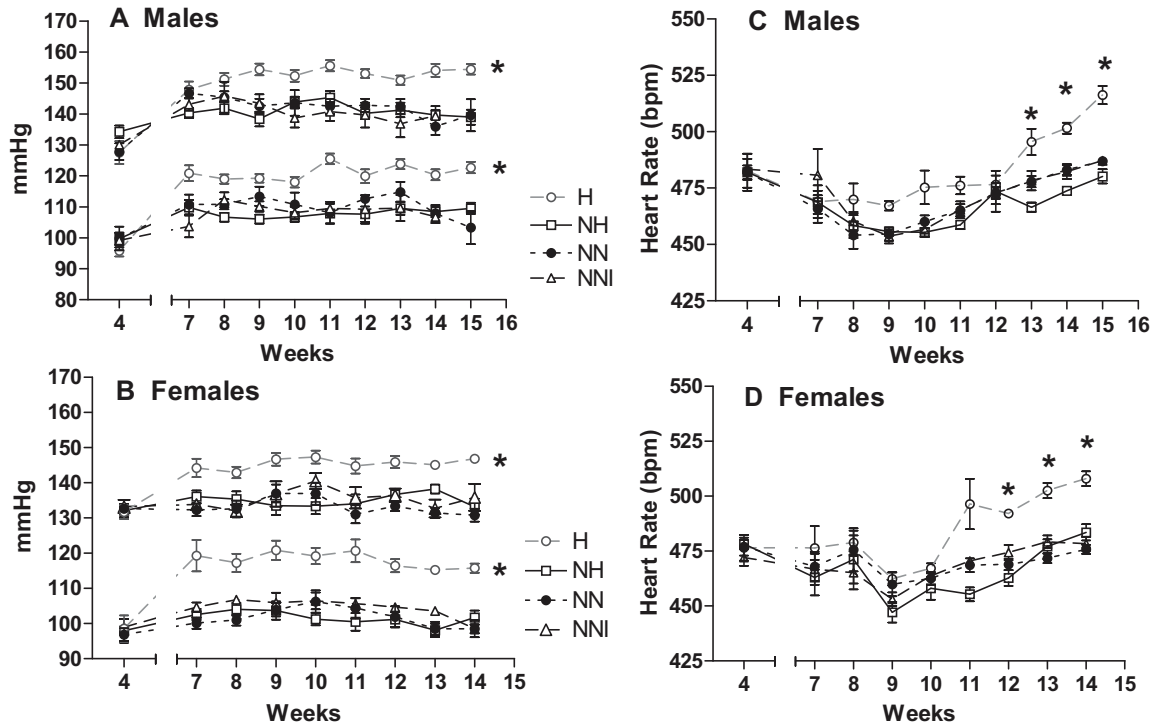


Figure 1. Systolic and diastolic blood pressures and HR of H, NH, NN, and NNI (see Methods section for the different experimental groups) male (A and C) and female (B and D) rats measured (tail cuff) from weeks 4 to 15 of life. Data are means±SEMs. **P*<0.05 vs NH, NN, and NNI control groups.

diastolic blood pressures were significantly increased by 7 weeks compared with all of the control groups and for the remainder of the study period (Figure 1B). Blood pressures did not differ among the control groups within each gender. Overall systolic and diastolic blood pressures were higher (*P*<0.01) in males compared with females within each study groups.

HR did not significantly differ between groups up to 12 weeks in males and 11 weeks in females. HR then gradually increased and was significantly higher in H rats versus NH, NN, and NNI for the remainder of the study period (Figure 1C and 1D).

Ex Vivo Vasomotor Function in Adults

For males and females, the maximal constriction of carotid rings generated by Ang II (Emax) was significantly increased in H rats compared with all of the control groups (Figure 2A and 2B). NH and NN dose-response curves were similar, whereas sensitivity of the vasoconstriction to Ang II was slightly but significantly decreased in NNI males only (logEC₅₀±SEM: H, -7.90±0.12; NH, -7.76±0.11; NN, -8.01±0.13; NNI, -7.12±0.10; *P*<0.05 NNI versus all of the other groups). Cumulative dose-response curves to thromboxane A₂ analogue U46619 and to phenylephrine were similar for all of the groups in males and for H, NH, and NN in females (NNI females not tested; please see Figure S3). For males and females, superoxide dismutase analogue Tempol abrogated the increased vasoconstriction to Ang II in H animals to values not different from control groups (Figure 2A and 2B). Tempol also reduced the sensitivity of Ang II dose-response curve of H males to value similar to NNI

males. Tempol had no effect in the NN and NH groups (data not shown; NNI Ang II+Tempol not tested).

For both genders, vasodilatation generated by the acetylcholine analogue carbachol was significantly impaired in H animals, and this was totally prevented by Tempol (Figure 2C and 2D); Tempol had no effect in NH and NN animals (data not shown; NNI carbachol+Tempol not tested). Responses to cumulative concentrations of sodium nitroprussiate, an NO donor, were similar for all of the groups for males, as well as for H, NH, and NN for females (NNI females not tested; please see Figure S4).

Effect of Neonatal Oxygen Exposure on Vascular Production of Reactive Oxygen Species in Adults

For both genders, a nonsignificant trend of higher baseline levels of superoxide measured using lucigenin-enhanced chemiluminescence was noted in H compared with NH animals (please see Figure S5A and S5B). Ang II increased superoxide generation to significantly higher levels in the H versus NH animals; coinubation of the aortic segments with apocynin prevented the increase in superoxide generation observed in the presence of Ang II. In the NH group, levels of superoxide production did not significantly differ between the different experimental conditions. Superoxide production evaluated by the oxidative fluorescent dye hydroethidine was markedly increased for both genders in aorta from H versus NH and NN groups (NNI not tested) and localized mainly in vascular smooth muscle cells (please see Figure S5C and S5D); no difference was observed between the NH and NN groups.

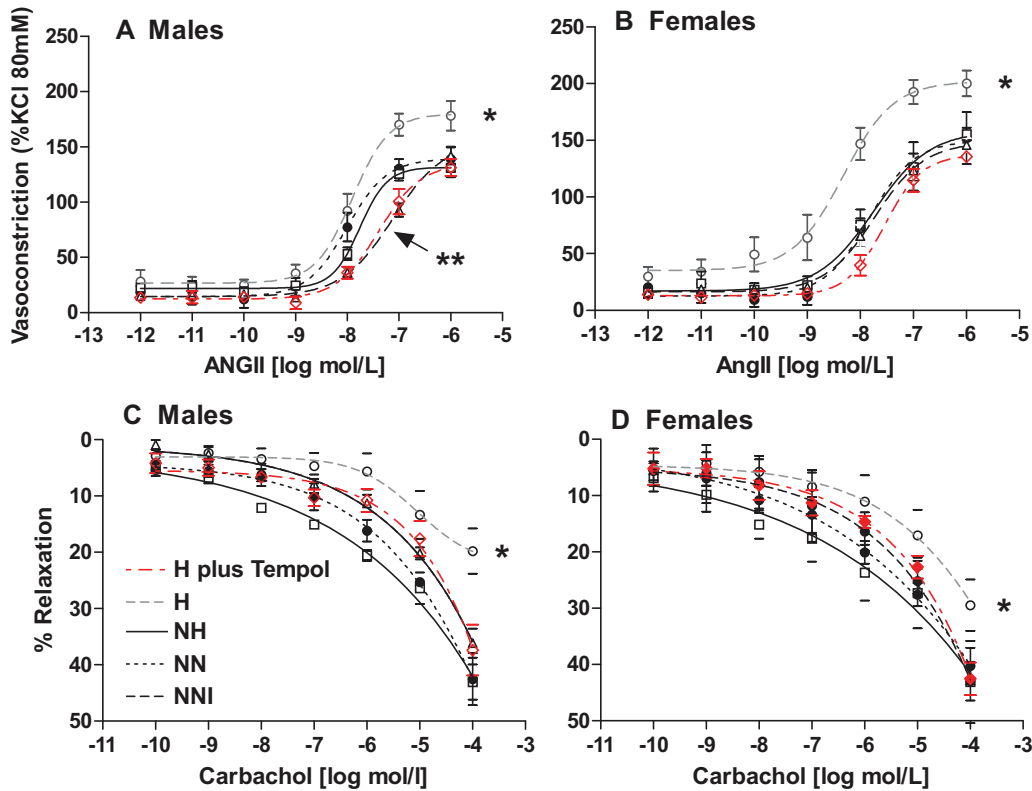


Figure 2. Vasomotor response of carotid artery rings to Ang II (A and B) and to carbachol (C and D) from H, H in the presence of superoxide dismutase mimetic Tempol (1 mmol/L; red lines), NH, NN, and NNI 16- to 20- (male) and 20- to 24- (female) week-old rats. Constriction is expressed relative (percentage) to the response elicited by KCl (80 mmol/L). Vasodilatation is expressed as percent reversal of U46619 (0.3 μ mol/L)-induced vasoconstriction. Data are means \pm SEMs of n=5 to 6 rats per group. * P <0.05 maximum response of H (without Tempol) vs all other groups. ** P <0.05 EC_{50} of NNI vs H (without Tempol), NH, and NN groups.

Effects of Neonatal Oxygen Exposure on Microvascular Density

Capillary density was significantly reduced in the tibialis anterior muscle from 4-week-old H (963 ± 46 g/mm²) versus NH (1405 ± 93 g/mm²) and NNI rats (1386 ± 110 g/mm²; n=5 per group; P <0.05 H versus NH and NNI; males only studied; NN not tested; Figure 3).

Effects of Neonatal Oxygen Exposure on the Final Nephron Number

Kidney (and total body) weight were significantly lower in females (versus males), but the ratio kidney/total body weight

did not differ between gender and between experimental groups (Figure 4). For male and female H animals, the number of nephrons per kidney was significantly decreased compared with all of the control groups (by 25% versus NN and NNI). Nephron number was also significantly reduced but to a lesser extent (10% to 12%) in NH compared with NN and NNI animals.

Discussion

Findings from our study demonstrate that hyperoxic exposure of newborns has long-term vascular and renal consequences

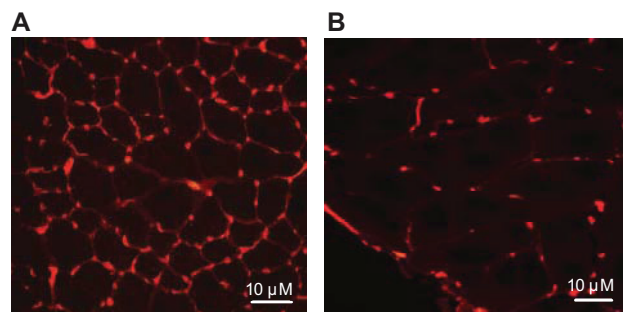


Figure 3. Representative illustration of the capillary supply in the tibialis anterior muscle of 4-week-old NH (A) and H (B) male rats. Capillary endothelial cells were stained with fluorescent tetramethylrhodamine B isothiocyanate-labeled lectin (see Methods section). Bar scale=100 μ m.

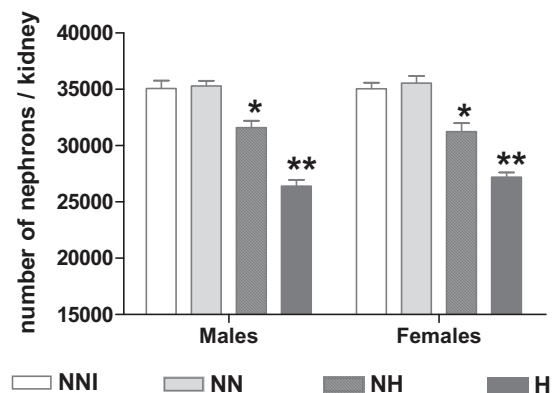


Figure 4. Compiled nephron number per kidney of 25- to 35-week-old H, NH, NN, and NNI male and female rats. ** P <0.05 vs all control groups; * P <0.05 vs NN and NNI animals.

leading in adulthood to elevated blood pressure, vascular dysfunction associated with enhanced vascular production of reactive oxygen species, decreased microvascular density, and decreased nephron number. In addition, our data reveal a significant reduction in nephron number in adults that had remained in room air during the neonatal period but were fed by a dam exposed to high O₂.

In humans, fetal/neonatal programming of cardiovascular dysfunction is described mainly in low birth weight individuals and has been attributed primarily to intrauterine growth restriction but also to prematurity.^{9,15} Antioxidant defenses of premature and intrauterine growth restriction infants are deficient and less inducible, rendering them particularly vulnerable to oxidative damage.^{1,2} Reactive oxygen and nitrogen species are considered to be central factors in major complications of prematurity, including bronchopulmonary dysplasia, periventricular leukomalacia, and retinopathy of prematurity.¹⁶ More recent studies indicate that former prematurely born individuals also display cardiovascular dysfunction (elevated blood pressure and abnormal retinal vasculature) as adults.^{9,17} Mechanisms linking prematurity and adult cardiovascular disorders are not known but together with our data here support a putative role for neonatal oxidative stress. Although the pups exposed to O₂ are born at term, they present many developmental features that are immature when compared with newborn infants, which allows the study of vascular hyperoxic stress-related injuries typical of preterm infants. Furthermore, in humans, nephrogenesis is completed relatively late but still during gestation by 32 to 36 weeks,¹⁸ whereas in rats it proceeds until 5 to 8 days postnatal.¹⁹ Considering the epidemiological evidence suggesting increased blood pressure, vascular dysfunction, and impaired renal function in former preterm children, this model is particularly relevant to examine long-term vascular consequences of neonatal oxidative injury of immature subjects.

One could hypothesize that H animals are more susceptible to stress-induced (by the tail-cuff method) elevation of blood pressure; however, odds that this accounts for all of the differences observed are small, because the difference was not present initially, and the same person took all of the measures, 2 to 3 times per week for each animal, and no "habituation" decrease in blood pressure was observed in either group.

The HR increased significantly in H animals of both genders compared with all of the control groups after the rise in blood pressure, which could suggest that increased HR is secondary to hypertension associated with afferent baroreceptor desensitization. Alternatively, HR can increase secondary to central activation of the efferent sympathetic nervous system input to the heart, mediated by blunted central regulation of the arterial baroreflex or primary increased activity. Both mechanisms can be mediated by Ang II and are plausible in the current experiments.^{20,21} In humans, Phillips and Barker²² also reported increased resting HR in adults with low birth weight.

Elevated blood pressure may result from vascular dysfunction, vascular structural changes, or perturbation in regulating systems, such as the kidneys and the brain. Carotid arteries, as studied in the current experiments, are not resistance vessels

and cannot be assumed to participate in resulting blood pressure. Nevertheless, one can postulate that the vascular dysfunction observed in carotids of H adult rats is also present in resistance vessels. The enhanced maximal vasoconstriction, as well as sensitivity (for males), to Ang II in H animals seems mediated by exaggerated production of superoxide because, in the presence of Tempol, the vasomotor response to Ang II was nearly identical to that of the NNI group. Whether enhanced superoxide production by NN and NH vessels also prevails and mediates their increased sensitivity to Ang II compared with NNI is plausible but could not be evidenced by the current experiments.

Increased vasomotor response specifically to Ang II and enhanced NADPH oxidase-mediated superoxide production is present in other models of developmental programming of hypertension, such as in offspring of dams fed an LP diet or food restricted during gestation.^{11,13,23,24} The pattern distribution of ethidium fluorescence was principally located in the media of the aorta, as reported by others²⁵ and previous studies by us.¹¹ Whether vascular expression of Ang II type 1 receptors is increased in H adults, as in the LP model,¹¹ and whether this could explain the enhanced vasoconstriction specifically to Ang II is unclear. Also, whether NADPH oxidase expression or activity is increased or whether superoxide anion scavenging systems are decreased is to be determined.

We did not examine arterial remodeling of the carotid arteries, but the similar response to KCl under different tension between groups indicates that tensional force capacity is unaltered by the current experimental procedure and, therefore, that arterial remodeling, if present, does not play a role in the observed vascular dysfunction. Furthermore, the enhanced vasoconstriction observed specifically to Ang II and not to Phe and U46619 also supports this.

Impaired endothelium-mediated vasodilatation in H animals seems mediated by impaired NO synthesis or NO scavenging by superoxide (supported by attenuation of the impaired vasodilatation to carbachol of H animals in the presence of Tempol), because responses to NO-donor sodium nitroprussiate were similar to controls. Alternatively, we cannot exclude a role for other endothelium-mediated vasodilators, such as prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarizing factor, in modulating the impaired vasodilatation.^{26,27} Whether elevated blood pressure could precede and be a causal element of the vascular dysfunction and superoxide production remains to be determined.

Vascular dysfunction was present in both male and female H rats; however, enhanced sensitivity to Ang II in H, NH, and NN versus NNI animals was observed only in males. Overall, blood pressures were also higher in males than females for all of the study groups. The mechanistic pathways underlying these gender differences are unknown. Similar differing patterns in blood pressures are reported in aging humans and animals, as well as in animal models of hypertension, and are attributed to sex steroids, their differing effect on vascular superoxide production, and expression of the renin-angiotensin-aldosterone system components.²⁸ Interestingly, gender differences prevail in the antioxidant capacity of low birth weight babies²⁹ and could contribute to the differential

incidence of morbidities in newborns and adults, as well as the differing mechanisms of hypertension programming between genders.³⁰

The vascular impact of early hyperoxic exposure has been studied in the small lung arteries of 2-week-old pups exposed to O₂ since birth, where it leads to enhanced vasoconstrictile properties and decreased NO release and NO-mediated vasodilatation.³¹ However, whether these changes prevail in the systemic vasculature and persist into adulthood was so far unknown.

Microvascular rarefaction is a vascular structural anomaly reported in association with hypertension.³² We found a very similar degree of capillary rarefaction in 7- and 28-day-old, but not in fetal, LP rats,¹³ which was prevented by coadministration of the lipid peroxidation inhibitor lazaroid to the LP-fed dams,⁷ suggesting early postnatal disruption in normal microvessel development. These, along with current data, also suggest that microvascular rarefaction can be a primary event in the development of hypertension associated with neonatal oxidative stress. In humans, microvessel rarefaction can be present at very early stages in (and even before) the development of hypertension in high-risk individuals.^{33,34} In individuals who suffered adverse conditions in perinatal life, reduced retinal vascularization and lower peripheral skin blood flow have been reported in young adults born at term but intrauterine growth restricted³⁵ or born preterm (these individuals had not been diagnosed with formal retinopathy of prematurity during their neonatal period).^{17,36}

Intrauterine growth-restricted infants, as well as rats exposed to an LP diet during gestation or to partial uterine artery ligation, have fewer nephrons.^{37,38} Nephron number is decreased in adult patients with primary hypertension.³⁹ These observations led to the suggestion that impairment of renal growth with resulting fewer nephron counts could play a role in the development (programming) of hypertension.⁴⁰ In the current studies, the kidneys used for nephron count were from older animals than those studied for blood pressure and vascular reactivity. However, considering that nephrogenesis is completed by 5 to 8 days after birth in rats and that nephron count is not modified afterward, we do not believe that the older age of the animals studied has impacted on the results.¹⁹ Lower glomerular number in the H group suggests disruption of nephron formation by the hyperoxic insult. LP offspring exhibit increase in kidney nitrotyrosine staining early in life; treatment of the young rats with Tempol for 3 weeks prevents the increased renal nitrotyrosine staining and the elevated blood pressure.⁴¹ Oxygen tension can have a regulatory role in nephrogenesis through hypoxia-inducible factor,⁴² which regulates expression of genes involved in angiogenesis. In rat metanephric organ culture, DNA content, vasculogenesis, and tubulogenesis are enhanced when tissues are kept under low (1% to 3%) rather than standard (20%) oxygen concentration.⁴³ Furthermore, reduced NO bioavailability interferes with hypoxic signaling and hypoxia-inducible factor expression.⁴⁴

In addition to the above-discussed findings, the current experimental design allowed other important observations. The significant reduction in nephron number of the NH group suggests that O₂ breathing by the lactating mother can impact organ development in the pups through mechanisms that

remain to be determined. We also observed that, among the 3 control groups, there were no differences in blood pressures; however, Ang II sensitivity of the NN and NH male groups was significantly enhanced compared with the NNI group. This suggests that perturbation of the care-providing mother in the neonatal period can impact on long-term vascular function of the male pups; whether this is mediated by neonatal and/or maternal stress and how is currently not known.

Perspectives

These experiments show that neonatal hyperoxic exposure results in decreased vascular tree development and nephron numbers that could participate in the observed hypertension in adults. Whether vascular dysfunction and renal changes are primary or secondary events to elevated blood pressure remains to be determined. Other elements could contribute to elevated blood pressure in this model: enhanced activity of brain renin-angiotensin system and efferent sympathetic activity, resistance arteries remodeling, and the role of other vasoactive systems, such as endothelin and endothelium-dependent hyperpolarizing factor. The results of the current study support the hypothesis of developmental programming of adult vascular and renal diseases by neonatal/perinatal oxidative stress and are of importance for the growing population of former prematurely born individuals.

Acknowledgment

We thank Dr Michèle Brochu for helpful suggestions.

Sources of 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. A.M.N. was supported by a fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. We acknowledge the help of Quebec's Cardiovascular Health Network.

Disclosures

None.

References

1. Thibeault DW. The precarious antioxidant defenses of the preterm infant. *Am J Perinatol*. 2000;17:167–181.
2. Saugstad OD. Oxidative stress in the newborn—a 30-year perspective. *Biol Neonate*. 2005;88:228–236.
3. Thebaud B, Ladha F, Michelakis ED, Sawicka M, Thurston G, Eaton F, Hashimoto K, Harry G, Haromy A, Korbutt G, 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*. 2005;112:2477–2486.
4. Hardy P, Dumont I, Bhattacharya M, Hou X, Lachapelle P, Varma DR, Chemtob S. Oxidants, nitric oxide and prostanooids in the developing ocular vasculature: a basis for ischemic retinopathy. *Cardiovasc Res*. 2000;47:489–509.
5. McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev*. 2005;85:571–633.
6. Nuyt AM. Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction: evidence from human studies and experimental animal models. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114:1–17.
7. Cambonie G, Comte B, Zydorezyk C, Ntmbane T, Germain N, Le NL, Plady P, Gauthier C, Lahaie I, Abran D, Lavoie JC, Nuyt AM. Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and micro-

- vascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;292:R1236–R1245.
8. Racasan S, Braam B, Koomans HA, Joles JA. Programming blood pressure in adult SHR by shifting perinatal balance of NO and reactive oxygen species toward NO: the inverted Barker phenomenon. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288:F626–F636.
 9. Siewert-Delle A, Ljungman S. 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.* 1998;11:946–953.
 10. Keijzer-Veen MG, Schrevel M, Finken MJ, Dekker FW, Nauta J, Hille ET, Frolich M, van der Heijden BJ. Microalbuminuria and lower glomerular filtration rate at young adult age in subjects born very premature and after intrauterine growth retardation. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:2762–2768.
 11. Yzydorczyk C, Gobeil F, Cambonie G, Lahaie I, Le NL, Samarani S, Lavoie JC, Oligny L, Pladys P, Hardy P, Nuyt AM. Exaggerated vasomotor response to angiotensin 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.* 2006;291:R1060–R1068.
 12. Wyse DG. On the “normalization” of active developed force of isolated helical strips of muscular and elastic arteries for variation in wall thickness. *J Pharmacol Methods.* 1980;4:313–326.
 13. 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, 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 Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289:R1580–R1588.
 14. Amri K, Freund N, Vilar J, Merlet-Benichou C, Lelievre-Pegorier M. Adverse effects of hyperglycemia on kidney development in rats: in vivo and in vitro studies. *Diabetes.* 1999;48:2240–2245.
 15. Leon DA, Koupilova I, Lithell HO, Berglund L, Mohsen R, Vagero D, Lithell UB, McKeigue PM. Failure to realise growth potential in utero and adult obesity in relation to blood pressure in 50 year old Swedish men. *BMJ.* 1996;312:401–406.
 16. O'Donovan DJ, Fernandes CJ. Free radicals and diseases in premature infants. *Antioxid Redox Signal.* 2004;6:169–176.
 17. Kistner A, Jacobson L, Jacobson SH, Svensson E, Hellstrom A. Low gestational age associated with abnormal retinal vascularization and increased blood pressure in adult women. *Pediatr Res.* 2002;51:675–680.
 18. Mackenzie HS, Brenner BM. Fewer nephrons at birth: a missing link in the etiology of essential hypertension? *Am J Kidney Dis.* 1995;26:91–98.
 19. Nigam SK, Aperia AC, Brenner BM. Development and maturation of the kidney. In: Brenner BM, ed. *Brenner and Rector's the Kidney*. V ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 1996:72–98.
 20. Pladys P, Lahaie I, Cambonie G, Thibault G, Le NL, Abran D, Nuyt AM. Role of brain and peripheral angiotensin II in hypertension and altered arterial baroreflex programmed during fetal life in rat. *Pediatr Res.* 2004;55:1042–1049.
 21. Alexander BT, Hendon AE, Ferril G, Dwyer TM. Renal denervation abolishes hypertension in low-birth-weight offspring from pregnant rats with reduced uterine perfusion. *Hypertension.* 2005;45:754–758.
 22. Phillips DI, Barker DJ. Association between low birthweight and high resting pulse in adult life: is the sympathetic nervous system involved in programming the insulin resistance syndrome? *Diabet Med.* 1997;14:673–677.
 23. Brawley L, Poston L, Hanson MA. Mechanisms underlying the programming of small artery dysfunction: review of the model using low protein diet in pregnancy in the rat. *Arch Physiol Biochem.* 2003;111:23–35.
 24. Franco MC, Akamine EH, Aparecida dO, Fortes ZB, Tostes RC, Carvalho MH, Nigro D. Vitamins C and E improve endothelial dysfunction in intrauterine-undernourished rats by decreasing vascular superoxide anion concentration. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;42:211–217.
 25. Brandes RP, Miller FJ, Beer S, Haendeler J, Hoffmann J, Ha T, Holland SM, Gorchach A, Busse R. The vascular NADPH oxidase subunit p47phox is involved in redox-mediated gene expression. *Free Radic Biol Med.* 2002;32:1116–1122.
 26. Loyaga-Rendon RY, Sakamoto S, Aso T, Iwasaki-Kurashige K, Takahashi R, Azuma H. Mediators involved in decreasing peripheral vascular resistance with carbachol in the rat hind limb perfusion model. *J Pharmacol Sci.* 2005;98:263–274.
 27. Mori Y, Ohyanagi M, Koida S, Ueda A, Ishiko K, Iwasaki T. Effects of endothelium-derived hyperpolarizing factor and nitric oxide on endothelial function in femoral resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2006;29:187–195.
 28. Miller AA, De Silva TM, Jackman KA, Sobey CG. Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34:1037–1043.
 29. Lavoie JC, Rouleau T, Truttmann AC, Chessex P. Postnatal gender-dependent maturation of cellular cysteine uptake. *Free Radic Res.* 2002;36:811–817.
 30. McMullen S, Langley-Evans SC. Maternal low-protein diet in rat pregnancy programs blood pressure through sex-specific mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288:R85–R90.
 31. Belik J, Pan J, Jankov RP, Tanswell AK. A bronchial epithelium-derived factor reduces pulmonary vascular tone in the newborn rat. *J Appl Physiol.* 2004;96:1399–1405.
 32. Boudier HA. Arteriolar and capillary remodelling in hypertension. *Drugs.* 1999;58 Spec No 1:37–40.
 33. Struijker Boudier HA, le Noble JL, Messing MW, Huijberts MS, le Noble FA, van Esden H. The microcirculation and hypertension. *J Hypertens.* 1992;10(suppl):S147–S156.
 34. Noon JP, Walker BR, Webb DJ, Shore AC, Holton DW, Edwards HV, Watt GC. Impaired microvascular dilatation and capillary rarefaction in young adults with a predisposition to high blood pressure. *J Clin Invest.* 1997;99:1873–1879.
 35. Hellstrom A, Dahlgren J, Marsal K, Ley D. Abnormal retinal vascular morphology in young adults following intrauterine growth restriction. *Pediatrics.* 2004;113:e77–e80.
 36. Bonamy AK, Bendito A, Martin H, Andolf E, Sedin G, Norman M. Preterm birth contributes to increased vascular resistance and higher blood pressure in adolescent girls. *Pediatr Res.* 2005;58:845–849.
 37. Langley-Evans SC, Welham SJ, Jackson AA. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci.* 1999;64:965–974.
 38. Lelievre-Pegorier M, Merlet-Benichou C. The number of nephrons in the mammalian kidney: environmental influences play a determining role. *Exp Nephrol.* 2000;8:63–65.
 39. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med.* 2003;348:101–108.
 40. Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension.* 2006;47:502–508.
 41. Stewart T, Jung FF, Manning J, Vehaskari VM. Kidney immune cell infiltration and oxidative stress contribute to prenatally programmed hypertension. *Kidney Int.* 2005;68:2180–2188.
 42. Bernhardt WM, Schmitt R, Rosenberger C, Munchenhagen PM, Grone HJ, Frei U, Warnecke C, Bachmann S, Wiesener MS, Willam C, Eckardt KU. Expression of hypoxia-inducible transcription factors in developing human and rat kidneys. *Kidney Int.* 2006;69:114–122.
 43. Tufro-McReddie A, Norwood VF, Aylor KW, Botkin SJ, Carey RM, Gomez RA. Oxygen regulates vascular endothelial growth factor-mediated vasculogenesis and tubulogenesis. *Dev Biol.* 1997;183:139–149.
 44. Brune B, Zhou J. Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling. *Cardiovasc Res.* 2007;75:275–282.

ONLINE SUPPLEMENT: FIGURES

NEONATAL OXYGEN EXPOSURE IN RATS LEADS TO CARDIOVASCULAR AND RENAL ALTERATIONS IN ADULTHOOD

Catherine Yzydorczyk, Blandine Comte, Gilles Cambonie, Jean-Claude Lavoie, Nathalie Germain,
Yue Ting Shun, Julie Wolff, Christian Deschepper¹, Rhian M Touyz², Martine Lelièvre-Pegorier³ and

Anne Monique Nuyt

Research Center, CHU Sainte-Justine, Departments of Pediatrics and Nutrition, Université de
Montréal, Montreal, Canada; ¹Institut de recherche clinique de Montréal, Canada; ²Kidney Research
Center, Ottawa, Canada and ³INSERM, U872, Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et
Marie Curie – Paris 6, Université Paris Descartes, UMR S 872, Paris, F-75006 France. Current address

G.C.: Service de réanimation pédiatrique et néonatale, Hôpital Arnaud de Villeneuve, 34295
Montpellier, France. B.C.: INRA, Centre Clermont-Ferrand - Theix, UMR1019, Unité Nutrition
Humaine, St Genès Champanelle, F-63122 France.

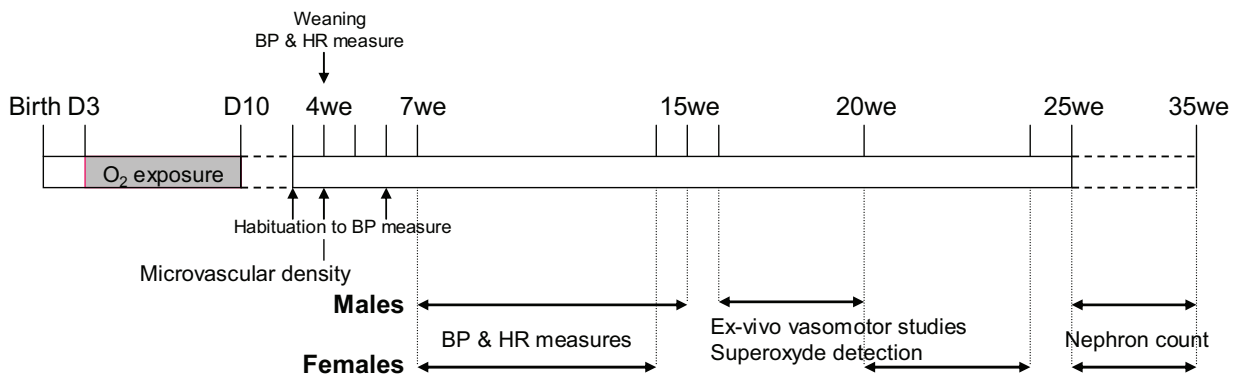


Figure S1: Schematic time line of the presented studies.

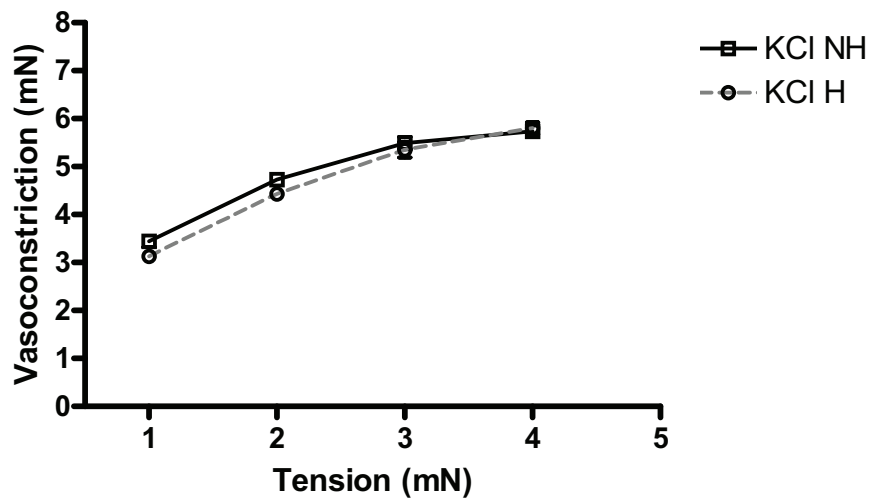


Figure S2: Vasoconstrictor response of carotid artery rings from H and NH 16-20 week old male rats (n = 4 each group) to KCl (80 mM) under increasing tension. Data are mean \pm SEM.

Figure S3

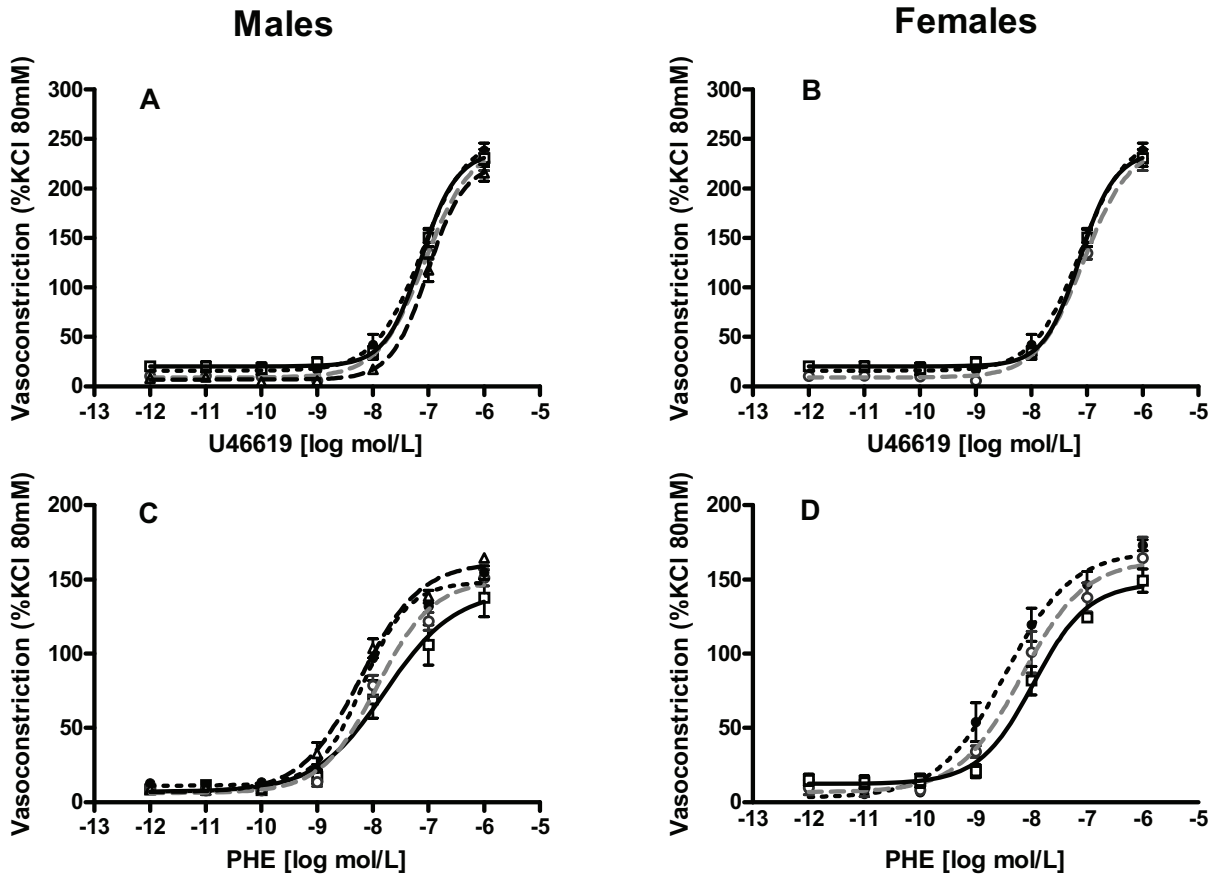


Figure S3: Vasoconstrictor response to thromboxane A₂ analogue U46619 (A and B) and to phenylephrine (PHE) (C and D) of carotid artery rings from H, NH, NN and NNI 16-20 (male) and 20-24 (female) week old rats. Symbols legend as in Figure 1. Constriction is expressed relative (percent) to the response elicited by KCl (80 mM). Data are mean \pm SEM of n = 5-6 rats per group.

Figure S4

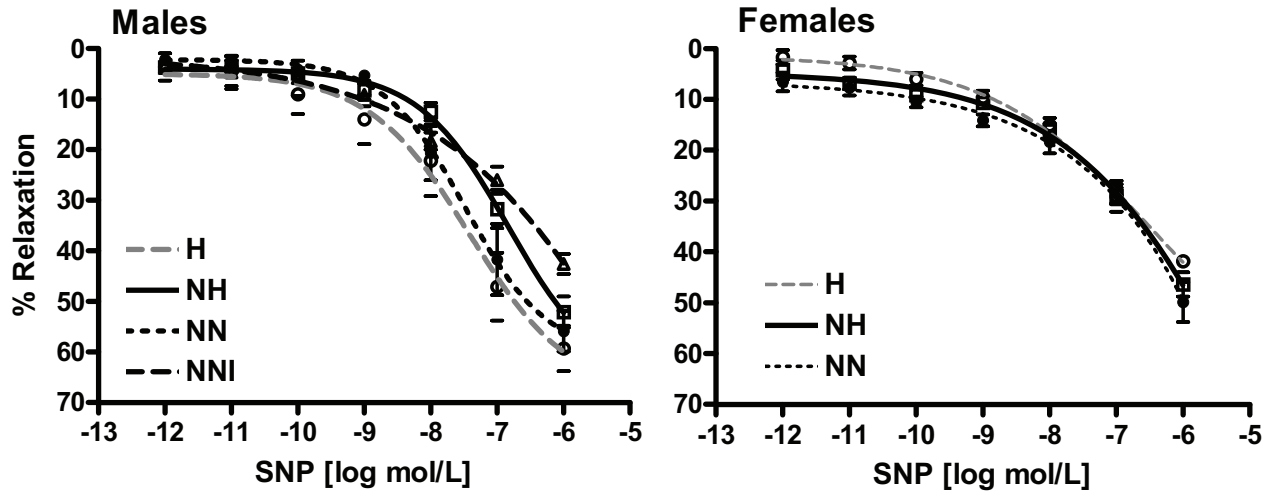


Figure S4: Vasodilatation response to SNP of carotid artery rings from 16-20 week old H, NH, NN and NNI male (left) rats, and 20-24 week old H, NH and NN female (right) rats. Vasodilatation is expressed as percent reversal of U46619 (0.3 μ M)-induced vasoconstriction. Data are mean \pm SEM of n = 5 rats per group.

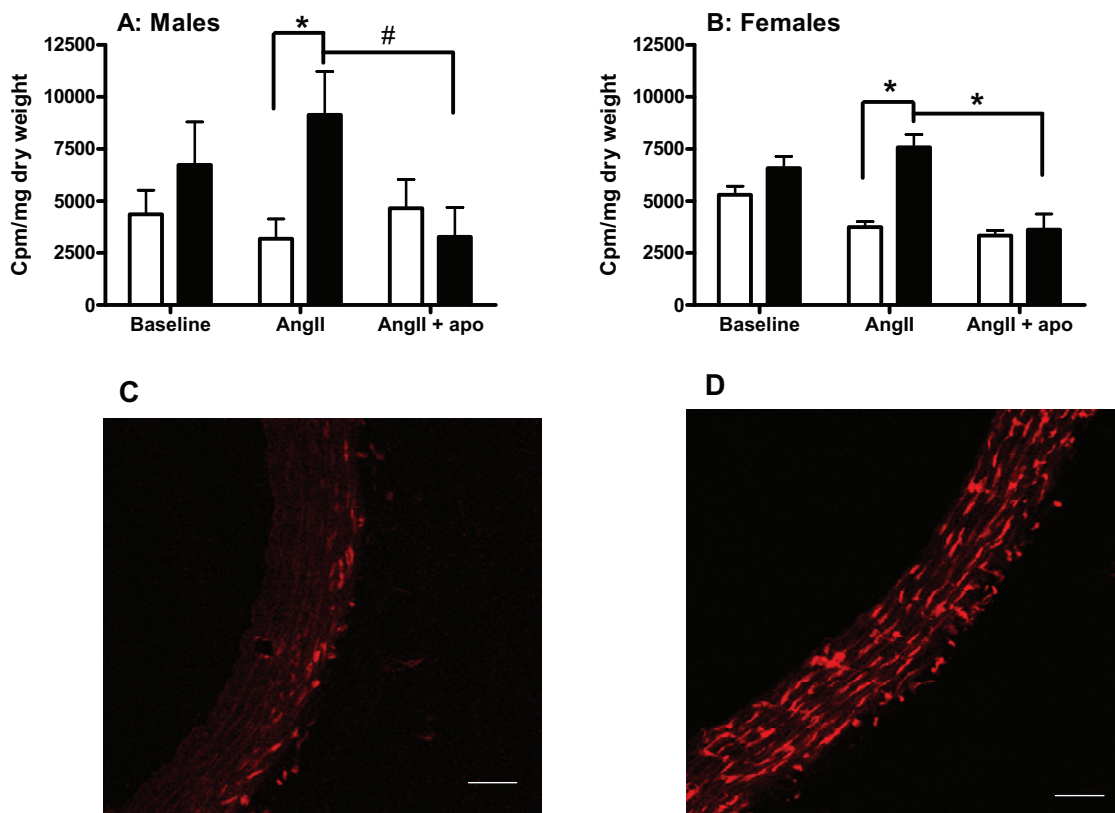


Figure S5: Superoxide levels measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence in aortas from 16-20 (male; A) and 20-24 (female; B) week old H (■) vs. NH (□) rats in baseline conditions, after 5 minutes preincubation with angiotensin II (AngII, 1 μM) or with AngII plus apocynin (1 mM). RLU: relative light units. Data are mean ± SEM of n = 6 male and 5 female rats per group. * p < 0.05 compared with NH in same conditions; # p = 0.07 compared to H AngII plus apocynin. C and D: Representative sections of aorta from male NH (C) and H (D) rats, after treatment with hydroethidine (2 μM) (see Methods). Images were obtained with a laser scanning confocal microscope (LSM 510 laser scanning microscope, Zeiss) equipped with an argon laser. Fluorescence was detected with a 514-nm long-pass filter. Bar scale = 10 μm.

III - B DEUXIÈME ARTICLE: eNOS UNCOUPLING IN PROGRAMMED ADULT ENDOTHELIAL DYSFUNCTION ASSOCIATED WITH NEONATAL OXYGEN EXPOSURE

Contexte de l'étude

Nous avons observé à l'âge adulte une dysfonction endothéliale en réponse au carbachol et une augmentation de la production vasculaire d'anion superoxide chez les animaux ayant été exposés à une hyperoxie néonatale (groupe H).

Objectifs

Nous avons voulu étudier si cette dysfonction endothéliale pouvait résulter d'un défaut de production du NO associé avec un découplage d'eNOS qui pourrait participer à l'augmentation de la production vasculaire d'anions superoxide observée.

Résultats

Les animaux ayant été exposés à une hyperoxie néonatale présentent à l'âge adulte : un défaut de production aortique (*ex vivo*, coupes) de NO tant au niveau basal qu'après stimulation par le carbachol; la pré-incubation avec la L-sépiaptérine et L-arginine restaurent la production de NO; la pré-incubation avec le L-NAME normalise la production vasculaire d'anions superoxide; une diminution de l'expression d'eNOS est observée lorsqu'évaluée par immunohistochimie, alors qu'elle est augmentée par western blotting, ceci est associé avec une augmentation du rapport dimère/monomère d'eNOS et une augmentation de la forme dimérique totale. Aucune différence dans l'expression d'iNOS et d'nNOS n'a été observée.

Conclusion

Les données suggèrent qu'un stress hyperoxique néonatal conduit à l'âge adulte au niveau aortique à un découplage d'eNOS associé à un déficit en L-arginine et L-sépiaptérine. Nous observons que ce découplage participe à l'augmentation de la production d'anions superoxyde et, par conséquent, postulons un rôle important du découplage d'eNOS dans la dysfonction vasculaire endothélium-dépendant observée chez l'animal adulte associée avec une augmentation de la pression sanguine.

**eNOS UNCOUPLING IN ADULT RATS ASSOCIATED WITH NEONATAL
OXYGEN EXPOSURE**

Catherine Yzydorczyk^{a,b*}, Blandine Comte^{b*}, Fanny Huyard^a, Anik Cloutier^a, Nathalie Germain^a, Mariane Bertagnolli^a, Anne Monique Nuyt^a.

^aResearch Centre, CHU Sainte-Justine, Department of Pediatrics, Université de Montréal, 3175 chemin de la Côte Sainte-Catherine, H3T 1C5 Montréal (Québec), Canada; ^bClermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

*Catherine Yzydorczyk and Blandine Comte are co-first authors.

Corresponding author:

Anne Monique Nuyt, MD
Division of Neonatology, Department of Pediatrics
Centre de recherche, CHU Sainte-Justine
Université de Montréal
3175 chemin de la Côte Sainte-Catherine
Montréal (Québec) H3T 1C5
Canada
Tel : 1-514-345-4931, ext 3971 or 2691
Email : [adresse(s) courriel retirée(s)]

ABSTRACT:

We have shown that neonatal hyperoxic stress leads in adulthood to high blood pressure, impaired endothelium-mediated vasodilatation and increased vascular production of superoxide anion by NAD(P)H oxidase. However, it is unknown whether changes in nitric oxide (NO) production and/or bio-inactivation prevail, and whether NO synthase (NOS) is also a source of superoxide. The purpose of this study is to evaluate whether adult animals exposed to transient hyperoxic stress as newborns have impaired vascular NO production associated with NOS uncoupling participating to vascular superoxide production.

In adult male rats exposed to 80 % oxygen from day 3 to 10 of life (H, n=6) vs. room air controls (CTRL, n=6), vascular (aorta) NO production is decreased at baseline (CTRL: 21±1 vs. H: 16±2 DAF-2 fluorescence intensity arbitrary units; p < 0.05) and after carbachol stimulation (CTRL: 26±2 vs. H: 18±2; p < 0.05). Pre-treatment with L-arginine (CTRL: 32±4 vs. H: 31±5) and L-sepiapterine (analogue of NOS cofactor tetrahydrobiopterin) (CTRL: 30±3 vs. H: 29±3) normalizes NO production after carbachol. Vascular eNOS immunostaining is reduced whereas total eNOS protein expression and dimer/monomer ratio are increased in H vs. CTRL. The significantly higher superoxide generation (CTRL: 20±2 vs. H: 28±3 hydroethidine fluorescence intensity arbitrary units; p < 0.05) is prevented by pre-treatment with eNOS inhibitor L-NAME (CTRL: 21±4 vs. H: 22±4).

Taken together, the current data indicate a role for eNOS uncoupling in enhanced vascular superoxide- and decreased NO production in adult animals with programmed elevated blood pressure after a brief neonatal oxygen exposure.

eNOS uncoupling after neonatal O₂ exposure

Key Words: Developmental programming, vascular dysfunction, newborn high oxygen, reactive oxygen species, endothelial nitric oxide synthase, superoxide

INTRODUCTION

It is now recognized that conditions during early life can significantly impact adult health and disease, particularly the cardiovascular system[1]; this concept is often termed “developmental programming”. Experimental and clinical studies have shown that endothelial-mediated vasodilatation can be impaired and that flow-mediated dilation is decreased in low birth weight and prematurely born children and young adults [2-4].

Among the many factors implicated in adverse perinatal conditions and developmental programming of hypertension, oxidative stress seems an important common denominator [5-7]. We have recently shown that neonatal exposure to a hyperoxic stress is associated in adulthood with increased blood pressure and vascular dysfunction, characterized by impaired vasodilatation to acetylcholine analogue carbachol –but not to NO donor sodium nitroprussiate- and exaggerated vasoconstriction to angiotensin II. This vascular dysfunction is normalized by superoxide dismutase analogue Tempol, suggesting that a decreased bioavailability of NO by superoxide scavenging could prevail [8]. Indeed, vascular production of superoxide is increased in response to angiotensin II, and prevented by apocynin (suggesting a role for NAD(P)H oxidase). However, it remains undetermined whether this is associated with modifications in NO production, NOS expression and/or bioinactivation of NO, and whether NOS could be a source of superoxide anion.

Endogenous nitric oxide (NO) is synthesized in vascular endothelial cells from conversion of L-arginine into L-citrulline via the enzymatic activation of constitutive homodimeric endothelial NO synthase (eNOS) with cofactors such as tetrahydro-L-biopterin (BH₄). “Uncoupled” NOS may contribute to superoxide generation in conditions where L-arginine or BH₄ are deficient [9]. The purpose of this study was therefore to evaluate whether adult animals exposed to oxygen as newborn have impaired vascular NO production associated with eNOS uncoupling which could lead to enhanced vascular superoxide production.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Animals were used according to a protocol of the Animal Care Committee of the CHU Sainte-Justine-University of Montreal in accordance with the principles of 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) as previously reported [8]. Briefly, Sprague-Dawley rat pups (Charles River, St-Constant, QC, Canada) were maintained either in a hyperoxic environment (80 % O₂ by a mixture of medical grade 100 % O₂ and room air, oxycycler ProOx model 110, Biosherix, Lacona, NY 13083) from day 3 to 10 of life (H group), or in room air (control (CTRL) group). Pups were weaned at 4 weeks of age. Survival of the pups, their growth and food intake were similar between groups. Adult male rats were studied between 29 to 32 weeks of age.

Detection of vascular NO production

The measure of NO production was realized in aortas using NO-specific fluorescent dye 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2) [10] according to a method adapted from Franco *et al.* [11]. This molecule is taken up by the cells where the ester bonds are hydrolyzed by intracellular esterase in DAF-2, and the reaction with NO leads to triazolofluorescein (DAF-2T) generating green fluorescence. Briefly, 8 µm sections of unfixed frozen aorta were loaded with DAF-2 (10 µM) and incubated in a light-protected humidified chamber at 37°C for 1 hr. Sections were then incubated 30 min at 37°C in HEPES buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4) alone, with carbachol (100 µM), with carbachol in the presence of L-arginine (100 µM, 1 hr pre-incubation), or with L-sepiapterin (100 µM, overnight at 4°C). Digital images were collected. Fluorescence was evaluated with the Image software (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) from at least four aortic sections per animal.

eNOS expression

eNOS protein expression was evaluated with immunohistochemistry and western blotting on H and CTRL aortas.

Immunohistochemistry

A primary antibody for eNOS (mouse IgG; diluted 1:50) was applied on fixed (ethanol/acetone) cryosections (8 µm) overnight at 4°C. The sections were then washed with PBS and incubated 1h with Alexa Fluor-488 (goat anti-mouse IgG; dilution 1:300). After rinsing in PBS, sections were coverslipped. Digital images were collected and fluorescence evaluated as above on at least four aortic sections per animal.

Immunoblotting

Frozen aorta were disrupted with homogenizer and proteins extracted with RIPA (10 % Na-deoxycholate, 100 mM EDTA, 10 % SDS, 1M Tris, 10 % Igepal, 150 mM NaCl) supplemented with 0.05 X solution of cocktail protease inhibitors and 100 mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF). Samples were centrifuged (10,000 x g, 10 min,

4°C) and the supernatant recovered for determination of protein content by Bradford assay using BSA as a standard.

Denatured proteins (50 µg) were separated (SDS-polyacrylamide gel) and transferred overnight to polyvinylidene fluoride membranes. Membranes were blocked for 1 hr at room temperature with BSA 10 % in TBS-tween 0.5 % for eNOS; with milk 5 % in TBS-tween 0.5 % for iNOS and with StartingBlock (TBS) blocking buffer for β-actin. Membranes were then incubated with primary monoclonal antibodies: rabbit anti-eNOS (1/1000 in BSA 5 %/TBS-tween 0.5 %) overnight at 4°C; mouse anti-iNOS (1/500 in milk 5 %/TBS-tween 0.5 %), anti-nNOS (1/2500 in BSA 5 %/TBS-Tween 0.5 %) overnight at 4°C; mouse anti-β-actin (1/25 000 in TBS-Tween 0.1 %), 1 hr at room temperature. Incubation with secondary antibodies was as follow: anti-rabbit eNOS (1/5000 in BSA 5 %/TBS-Tween 0.5 %), 2 hrs at room temperature; anti mouse iNOS (1/2500 in TBS-Tween 0.5 %) and anti mouse nNOS (1/10 000 in TBS-Tween 0.5 %), 1 hr at room temperature; anti mouse β-actin (1/25 000 in TBS-Tween 0.1 %), 1 hr at room temperature.

Low-temperature SDS-PAGE (LT-PAGE) was performed for detection of eNOS dimers using reported procedures [12]. Briefly, total proteins were incubated in 1 X non denaturing buffer (Tris-HCl 4 X, pH 6.8, Glycérol 20 % and 0.02 % bromophenol blue) without heating. The samples were then loaded onto a gradient gel (NuPAGE Novex, Invitrogen). Gels and buffers were equilibrated at 4°C before electrophoresis and the buffer tank placed in an ice bath during electrophoresis to maintain the temperature of the gel at < 15°C. Subsequent to LT-PAGE, the gels were transferred overnight on nitrocellulose, the blots were then blocked and incubated with the antibodies as above.

The antibodies were visualized using an enhanced chemiluminescence method ECL plus (Perkin Elmer, MA, USA). Films (Bioflex Econo from InterSciences, Markham, ON, Canada) were scanned using a flatbed scanner and images analyzed with Gel Pro analyser 3.1 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA); results were normalized to β-actin for loading variations.

Evaluation of vascular production of superoxide anion

Aortic superoxide production was evaluated in samples of H and CTRL groups using the oxidative fluorescent dye hydroethidine (2 µM) as described [13], in the presence or not of NOS blocker L-NAME (100 µM; 30 min pre-incubation at 37°C).

Chemicals and reagents

Carbachol, dihydroethidium, L-arginine, sodium deoxycholate; ethylenediamine tetracetic acid (EDTA), sodium dodecyl sulfate (SDS), phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), igepal, *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and standard chemicals were purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA); Ketamine from Ayerst (Montreal, QC, Canada); Rompun (Xylazine) from Bayer HealthCare (Toronto, ON, Canada); 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA) from Calbiochem EMD Biosciences Inc (San Diego, CA, USA.); L-sepiapterin from Schircks Laboratories, (Jona, Switzerland). Antibodies: eNOS detection by immunohistochemistry: BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, USA); eNOS detection by western blotting: Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); secondary antibody Alexa Fluor-488 and gradient gel NuPAGE Novex were from Invitrogen (Burlington, ON, Canada);

eNOS uncoupling after neonatal O₂ exposure

iNOS and nNOS: BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, USA). BSA, Tris and milk were obtained from BioShop (Burlington, ON, Canada) and StartingBlock blocking buffer from Thermo Scientific (Rockford, IL, USA). Complete Mini, a cocktail of protease inhibitors, was obtained from Roche Applied Sciences (Laval, Quebec, Canada). Bradford reagent, polyvinylidene fluoride (PVDF) and nitrocellulose membranes were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada).

Statistical analyses

Values are expressed as means \pm SEM. Analyses of differences between groups were performed using Student's *t* test for unpaired observations. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

L-Arginine and L-sepiapterin restore vascular production of NO

To evaluate vascular NO production and possible NOS dysfunction in adults exposed to high oxygen as newborns, aortic sections from H and CTRL rats were studied with fluorescent DAF-2DA. Compared to CTRL, NO production was significantly decreased in H group in basal conditions (CTRL: 21 ± 1 vs. H: 16 ± 2 DAF-2 fluorescence intensity arbitrary units; $p < 0.05$) (Fig 1A) as well as after stimulation by carbachol (CTRL: 26 ± 2 vs. H: 18 ± 2 ; $p < 0.05$) (Fig 1B). However, pre-incubation with L-arginine (CTRL: 32 ± 4 vs. H: 31 ± 5) (Fig 1C) or with L-sepiapterin (CTRL: 30 ± 3 vs. H: 29 ± 3) (Fig 1D) restored NO production of H in response to carbachol to values similar to CTRL.

Effect of neonatal oxygen exposure on adult vascular NOS expression

We then questioned whether neonatal oxygen exposure is associated with changes in eNOS expression, vascular NO production and NOS function. eNOS immunostaining (Fig 2) is localized in the aorta endothelium and is significantly decreased in H vs. CTRL (CTRL: 16 ± 1 vs. H: 12 ± 1 fluorescence intensity arbitrary units; $p < 0.05$). However when evaluated by Western blots, total eNOS protein expression is significantly increased in H vs. CTRL (Fig 3A). Using the LT-PAGE method, the eNOS dimers are found increased whereas monomers expression is unchanged resulting in a significantly increased dimer:monomer ratio in H vs. CTRL (Fig 3B). We observed no significant difference between groups for iNOS and nNOS expression (data not shown).

Effect of NOS blockade on vascular production of superoxide anion

To evaluate whether eNOS could participate in the enhanced vascular reactive oxygen species production we previously reported in adult H rats [8], we measured the aortic production of superoxide anion using the oxidative fluorescent dye hydroethidine in the presence or not of eNOS blocker L-NAME (Fig 4). Pre-treatment of the aortic sections with L-NAME significantly reduced the enhanced superoxide generation in H aortic sections to values similar to CTRL and was without effect in CTRL (without L-NAME: CTRL: 20 ± 2 vs. H: 28 ± 3 fluorescence intensity arbitrary units; $p < 0.05$, Fig 4A; with L-NAME: CTRL: 21 ± 4 vs. H: 22 ± 4 , Fig 4B).

DISCUSSION

The current study shows that rats exposed to high oxygen during a brief period in neonatal life present as adults impaired vascular production of NO at baseline as well as in response to acetylcholine analogue carbachol. In these adults, L-arginine and L-sepiapterine (which is intracellularly converted to tetrahydrobiopterin (BH₄)) improve vascular NO production, suggesting impaired eNOS function. Compared to CTRL, H adult rats showed a decreased expression of vascular eNOS evaluated by immunohistostaining, whereas when evaluated by Western blots eNOS total protein expression and dimer:monomer ratio are increased. Our data also show that eNOS blocker L-NAME inhibits exaggerated vascular superoxide production of adult H rats. Taken together, these results suggest a role for eNOS uncoupling in increased vascular superoxide anion production in adult rats subjected to a neonatal hyperoxic stress.

In hypertension associated endothelial dysfunction, vascular NO bioavailability is affected by the expression of functional NOS, the rate of NO synthesis (influenced by substrate/cofactor availability), and NO bioinactivation by superoxide anion.

Several direct and indirect approaches have been used to measure NO levels. Kojima *et al* have developed membrane-permeable 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA) as a reagent for detection NO by fluorescence, and applied the technique to cultured smooth muscle cells [10]. Our results show that vascular (aortic) NO production is decreased in H in basal conditions as well as after carbachol, and that L-arginine and L-sepiapterine normalize vascular NO production. Both substrates L-arginine and cofactor BH₄ are essential for proper NOS functioning. BH₄ has a role in stabilization of the dimeric eNOS, facilitates binding of L-arginine and donates electrons to the ferrous-dioxygen complex in the oxygenase domain, as the initiating step of L-arginine oxidation and NO synthesis. Reduced levels of BH₄ can lead to eNOS uncoupling as BH₄ promotes coupling of NAD(P)H oxidation to NO synthesis and inhibits superoxide formation [9;14;15]. Therefore eNOS can, under shortage of BH₄, catalyze an uncoupled NAD(P)H oxidation (uncoupled from NO formation), leading to generation of superoxide. In the current study, normalization of NO production after carbachol stimulation with pre-incubation with L-sepiapterin, a precursor of BH₄, suggests that BH₄ availability is impaired in adult rats exposed to neonatal hyperoxic stress. BH₄ bioavailability can be reduced through oxidation [16], reduced production as shown in aged mice [17], or when recycling from the oxidized form is impaired [18]. Conversely, administration of BH₄ results in an increased NO production in cells, associated with decreased reactive oxygen species levels. BH₄ administration attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats [19] and restored endothelial function in rat model of insulin resistance [20], as well as in patients with essential hypertension [21]. In another rodent model of developmental programming of hypertension (associated with intrauterine undernourishment), BH₄ reversed both impaired endothelium mediated vasorelaxation and NO production, and normalized excess vascular superoxide production [22].

L-arginine is essential for eNOS stabilization in the active dimerization state [9]. Both, the L- and D-enantiomers of arginine are present within the human circulation but only L-arginine is recognized by eNOS as the substrate for production of NO [23]. The current results show that L-arginine normalized vascular NO production after carbachol

stimulation in adult H rats. These data suggest that L-arginine availability could be decreased in adult rats exposed in neonatal period to hyperoxic stress, and contribute to reduced NO formation as well as reduced vascular capacity to scavenge superoxide anion through direct antioxidant effect [24]. Conversely, beneficial effects of L-arginine supplementation have been documented in both animal and human studies under pathological conditions such as hypercholesterolemia and hypertension [25-27].

Effects of supplemental L-arginine also could also be due to local competition with the endogenous eNOS inhibitor asymmetric dimethyl-L-arginine (ADMA). Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is a methylated form of L-arginine which competes with L-arginine as a substrate for eNOS activity, reducing the synthesis of NO. Oxygen derived free radicals can increase levels of ADMA by increasing the activity of its synthesizing enzyme arginine methyltransferase and inhibiting ADMA hydrolysing enzyme dimethylarginine dimethylaminohydrolase, reducing the pool of intracellular L-arginine [28]. Interestingly, ADMA, proposed as an early marker of endothelial dysfunction, is increased in premature *vs.* term infants, more so in male *vs.* female preterm, and in infants born to mother with preeclampsia or with neonatal infections [28;29]; all these clinical perinatal situations are known to be associated with increased markers of oxidative stress and/or reduced antioxidant defences [7;30]. Whether ADMA is increased or the ratio L-arginine to ADMA decreased after neonatal oxygen exposure and perpetuated to adulthood is currently not known.

Our results also showed a decreased expression of vascular eNOS evaluated by immunohistostaining, whereas when evaluated by Western blots eNOS total protein expression and dimer:monomer ratio are found increased; the following elements could reconcile the apparently conflicting results. For immunoblotting with SDS-polyacrylamide gel, the proteins are denatured and total eNOS protein expression is evaluated, whereas for immunoblotting using LT-PAGE technique the proteins are not denatured allowing detection of eNOS proteins as dimers as well as monomers. It has long been considered that homodimerization of eNOS is essential for NO production [31] and that, under certain conditions, eNOS can remain monomeric and lead to production of superoxide anion rather than NO [32]. However it is now recognized that changes in eNOS dimer:monomer ratio are not directly related to eNOS (un)coupling (*i.e.* uncoupled from NO production), because the oxidase activity of the monomers is limited and the dimeric form is more active and able to generate superoxide as well as NO [9].

In addition to conformational changes and post-translational phosphorylation, activation of eNOS is dependent on its specific subcellular localization. Most activable eNOS are located in plasmalemma caveolae, where interaction with its structural protein caveolin inhibits its activation [33]. In conditions such as diabetes (kidney), aging (vascular) and hypertension, eNOS may be differentially expressed in cytosol *vs.* membranes, resulting in a decreased NO production [34;35]. In the current study, the observed decrease in eNOS staining using immunohistochemistry is also consistent with what was reported in a hypertensive transgenic mouse model (over-expressing IC53 gene) along with a diminished endothelium-dependent vasodilatation and a down-regulation of the eNOS/NO pathway [36], and in luminal endothelial cells of atherosclerotic plaques, associated with impaired NO release [37].

These elements and our results suggest that total vascular eNOS protein expression and eNOS dimer:monomer ratio are increased, and that expression of active coupled eNOS at the endothelial cell membranes is decreased, contributing to decreased NO production. Studies have reported in other animal models of hypertension and endothelial dysfunction a significant decrease of the eNOS dimer to monomer ratio whereas the total amount of eNOS protein was unchanged or -similarly to current data-increased [12;38;39]. In intrauterine undernourished rats with elevated blood pressure as adults, endothelium mediated vasodilatation is impaired and eNOS expression (evaluated by RT-PCR) decreased [40]. Factors that modulate (increase) at the transcriptional and posttranscriptional levels expression of eNOS after neonatal hyperoxic stress were not explored in the current study but could involve laminar shear stress, increased production of hydrogen peroxide as well as transforming growth factor- β 1 (which can be increased through angiotensin II AT1 receptor and NADPH oxidase activation) [41].

In the current study, we also examined expression of two other NOS isoforms, neuronal (nNOS) and inducible (iNOS). Although iNOS is constitutively present in tissues such as lung epithelium and kidney distal tubules, it can become the predominant isoform in vascular smooth muscle in response to cytokines and other inflammatory mediators [42]. Dimerisation of the protein is also necessary for iNOS to produce NO, a process in which BH₄ is required [43]. Our results do not show any significant change in aorta iNOS expression in the H group and the NOS inhibitor we used has a poor affinity for iNOS. This is in agreement with a study by Franco et al. showing similar iNOS expression between hypertensive offspring of undernourished dams and control [40]. The involvement and role of NO produced by nNOS in cardiovascular control remains unclear but data suggest nNOS could be involved in the modulation of myogenic tone [44] and systemic arterial pressure [45]. We observed no difference in nNOS expression between groups. Therefore we can postulate that iNOS and nNOS do not participate significantly to the enhanced vascular superoxide production in adult rats subjected to neonatal hyperoxic stress.

We have previously shown in the same model an impaired endothelium-dependent relaxation, an increased in vascular superoxide anions production and a normalization of the endothelial dysfunction by superoxide dismutase analogue Tempol [8], pointing to a role for superoxide anion in impaired endothelium-mediated vasorelaxation through reduced NO bioavailability. We had also shown that increased vascular superoxide production in H adult rats was significantly decreased by apocynin [8], suggesting an increased production by NADPH oxidase. With the current studies we show that eNOS inhibitor L-NAME also decreased aorta superoxide anion production of H, as observed in other models of hypertension and vascular diseases [15;46]. Contribution of both NADPH oxidase activity and eNOS dysfunction to increased total vascular superoxide production and reduced NO bioactivity was also shown in experimental diabetes in rats [47] and in atherosclerotic apolipoprotein E knockout mice [48]. Superoxide can in turn further contribute to NO bio-inactivation and maintain eNOS uncoupled through oxidation of key cofactor such as BH₄, as well as decrease the caveolae number in endothelial cells [49].

The pathways by which a transient neonatal hyperoxic exposure results in adulthood to perpetuated changes resulting in eNOS uncoupling and more generally

eNOS uncoupling after neonatal O₂ exposure

vascular dysfunction are yet to be fully unravelled. Accelerated vascular aging could underlie these observations. Vascular aging is characterized by functional and structural impairment, increased vascular stiffness and endothelial dysfunction. Premature birth and low birth weight have been correlated with elevated blood pressure, impaired endothelial function and increased arterial stiffness in children, adolescents and adults [2;4;50]. In H adults, we recently showed increased aortic wall stiffness [51]. Vascular aging is associated with increased basal vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase and eNOS [46], with eNOS uncoupling [17;52;53] and with decrease in the proportion of active plasma membrane-bound eNOS relative to cytosol subcellular localization [54], resulting in further decrease in NO production and increased superoxide production, thereby maintaining/accelerating vascular dysfunction and premature aging. Whether deleterious perinatal conditions result in premature aging of the vascular system remains to be fully explored and is important for the growing proportion of young adults who survived premature birth.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Evaluation of NO production using DAF-2DA (10 μ M) in aorta of adult rats exposed to high oxygen as newborns (H) vs. control (CTRL) in baseline conditions (A), after stimulation with the acetylcholine analogue carbachol (100 μ M) (B), and with carbachol after pre-incubation with L-arginine (100 μ M) (C) and with L-sepiapterine (100 μ M) (D). The microphotographs are representative of experiments performed in n = 6 animals per group, compiled in the bar graphs. Bar scale = 100 μ m. *: p < 0.05 H vs. CTRL using unpaired *t*-test.

FIGURE 2: eNOS immunostaining in aorta of adult rats exposed to high oxygen as newborns (H) and control (remained in room air) (CTRL) (A). The microphotographs are representative of experiments performed in n = 6 animals per group, compiled in the bar graph. eNOS immunostaining is localized to the endothelium and is significantly decreased in H vs. CTRL. Bar scale = 100 μ m; e: endothelium. *: p < 0.05 H vs. CTRL using unpaired *t*-test.

FIGURE 3: Expression of total eNOS (A: histogram and representative immunoblots) relative to β -actin proteins. eNOS dimer:monomer ratio (B: histogram and representative immunoblots) in aorta from adult rats exposed to oxygen as newborns (H) and control (CTRL) as determined by immunoblotting quantified by with Gel Pro Analyser 3.1. *: p < 0.05 H vs. CTRL using unpaired *t*-test.

FIGURE 4: Representative sections of aorta from H and CTRL adult rats, after treatment with hydroethidine (2 μ M) without L-NAME (A) or with L-NAME (100 μ M) (B) pre-treatment (see Methods). Images were obtained with a laser scanning confocal microscope (LSM 510 laser scanning microscope, Zeiss) equipped with an argon laser. Fluorescence was detected with a 514-nm long-pass filter. The microphotographs are representative of six performed experiments (compiled in the bar graph). Bar scale = 100 μ m. *: p < 0.05 H vs. CTRL using unpaired *t*-test.

Acknowledgements:

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research, the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Pfizer CardioVascular Research Awards Program. Anne Monique Nuyt was supported by a fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

Conflict of Interest: none declared.

Reference List

1. Osmond,C. and Barker,D.J. (2000) Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ.Health Perspect.* **108 Suppl 3**, 545-553.
2. Cheung,Y.F., Wong,K.Y., Lam,B.C. and Tsoi,N.S. (2004) Relation of arterial stiffness with gestational age and birth weight. *Arch.Dis.Child* **89**, 217-221.
3. Nuyt,A.M. and Alexander,B.T. (2009) Developmental programming and hypertension. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* **18**, 144-152.
4. Martin,H., Hu,J., Gennser,G. and Norman,M. (2000) Impaired endothelial function and increased carotid stiffness in 9-year-old children with low birthweight. *Circulation* **102**, 2739-2744.
5. Cambonie,G., Comte,B., Zydorczyk,C. 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-R1245.
6. Racasan,S., Braam,B., van der Giezen,D.M. et al. (2004) Perinatal L-arginine and antioxidant supplements reduce adult blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **44**, 83-88.
7. Luo,Z.C., Fraser,W.D., Julien,P. et al. (2006) Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress? *Med Hypotheses* **66**, 38-44.
8. Zydorczyk,C., Comte,B., Cambonie,G. et al. (2008) Neonatal oxygen exposure in rats leads to cardiovascular and renal alterations in adulthood. *Hypertension* **52**, 889-895.
9. Forstermann,U. and Munzel,T. (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* **113**, 1708-1714.
10. Kojima,H., Nakatsubo,N., Kikuchi,K. et al. (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluoresceins. *Anal.Chem.* **70**, 2446-2453.
11. Franco,M.C., Ponzio,B.F., Gomes,G.N. et al. (2009) Micronutrient prenatal supplementation prevents the development of hypertension and vascular endothelial damage induced by intrauterine malnutrition. *Life Sci.* **85**, 327-333.
12. Marchesi,C., Ebrahimian,T., Angulo,O., Paradis,P. and Schiffrin,E.L. (2009) Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. *Hypertension* **54**, 1384-1392.
13. Zydorczyk,C., Gobeil,F., Jr., Cambonie,G. 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-R1068.
14. Vasquez-Vivar,J., Kalyanaraman,B., Martasek,P. et al. (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 9220-9225.
15. Bendall,J.K., Alp,N.J., Warrick,N. et al. (2005) Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with

- endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression. *Circ.Res* **97**, 864-871.
16. Landmesser,U., Dikalov,S., Price,S.R. et al. (2003) Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin.Invest* **111**, 1201-1209.
 17. Yang,Y.M., Huang,A., Kaley,G. and Sun,D. (2009) eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **297**, H1829-H1836.
 18. Chalupsky,K. and Cai,H. (2005) Endothelial dihydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 9056-9061.
 19. Hong,H.J., Hsiao,G., Cheng,T.H. and Yen,M.H. (2001) Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **38**, 1044-1048.
 20. Shinozaki,K., Nishio,Y., Okamura,T. et al. (2000) Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. *Circ.Res* **87**, 566-573.
 21. Higashi,Y., Sasaki,S., Nakagawa,K. et al. (2002) Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals. *Am.J.Hypertens.* **15**, 326-332.
 22. Franco,M.C., Fortes,Z.B., Akamine,E.H. et al. (2004) Tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in microvessels of intrauterine undernourished rats. *J Physiol* **558**, 239-248.
 23. Gornik,H.L. and Creager,M.A. (2004) Arginine and endothelial and vascular health. *J.Nutr.* **134**, 2880S-2887S.
 24. Wascher,T.C., Posch,K., Wallner,S., Hermetter,A., Kostner,G.M. and Graier,W.F. (1997) Vascular effects of L-arginine: anything beyond a substrate for the NO-synthase? *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **234**, 35-38.
 25. Drexler,H., Zeiher,A.M., Meinzer,K. and Just,H. (1991) Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet* **338**, 1546-1550.
 26. Rossitch E Jr, Alexander,E., III, Black,P.M. and Cooke,J.P. (1991) L-arginine normalizes endothelial function in cerebral vessels from hypercholesterolemic rabbits. *J.Clin.Invest* **87**, 1295-1299.
 27. Boger,R.H., Bode-Boger,S.M., Mugge,A. et al. (1995) Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis* **117**, 273-284.
 28. Sydow,K. and Munzel,T. (2003) ADMA and oxidative stress. *Atheroscler.Suppl* **4**, 41-51.
 29. Vida,G., Sulyok,E., Lakatos,O., Ertl,T., Martens-Lobenhoffer,J. and Bode-Boger,S.M. (2009) Plasma levels of asymmetric dimethylarginine in premature neonates: its possible involvement in developmental programming of chronic diseases. *Acta Paediatr.* **98**, 437-441.
 30. Comporti,M., Signorini,C., Leoncini,S., Buonocore,G., Rossi,V. and Ciccoli,L. (2004) Plasma F2-isoprostanes are elevated in newborns and inversely correlated to gestational age. *Free Radic Biol Med* **37**, 724-732.

31. Hellermann,G.R. and Solomonson,L.P. (1997) Calmodulin promotes dimerization of the oxygenase domain of human endothelial nitric-oxide synthase. *J.Biol Chem.* **272**, 12030-12034.
32. Stuehr,D., Pou,S. and Rosen,G.M. (2001) Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J.Biol Chem.* **276**, 14533-14536.
33. Feron,O., Dessy,C., Opel,D.J., Arstall,M.A., Kelly,R.A. and Michel,T. (1998) Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate. *J.Biol Chem.* **273**, 30249-30254.
34. Komers,R., Schutzer,W.E., Reed,J.F. et al. (2006) Altered endothelial nitric oxide synthase targeting and conformation and caveolin-1 expression in the diabetic kidney. *Diabetes* **55**, 1651-1659.
35. Dudzinski,D.M. and Michel,T. (2007) Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc.Res* **75**, 247-260.
36. Zhuo,M.L., Huang,Y., Chen,J.Z. et al. (2009) Endothelium-specific overexpression of human IC53 downregulates endothelial nitric oxide synthase activity and elevates systolic blood pressure in mice. *Cardiovasc.Res.* **84**, 292-299.
37. Oemar,B.S., Tschudi,M.R., Godoy,N., Brovkovich,V., Malinski,T. and Luscher,T.F. (1998) Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* **97**, 2494-2498.
38. Vaziri,N.D., Ni,Z. and Oveisi,F. (1998) Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **31**, 1248-1254.
39. Satoh,M., Haruna,Y., Fujimoto,S., Sasaki,T. and Kashihara,N. (2010) Telmisartan improves endothelial dysfunction and renal autoregulation in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens.Res* **33**, 135-142.
40. Franco,M.C., Arruda,R.M., Dantas,A.P. et al. (2002) Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. *Cardiovasc.Res* **56**, 145-153.
41. Searles,C.D. (2006) Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **291**, C803-C816.
42. Kibbe,M., Billiar,T. and Tzeng,E. (1999) Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. *Cardiovasc Res* **43**, 650-657.
43. Baek,K.J., Thiel,B.A., Lucas,S. and Stuehr,D.J. (1993) Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J.Biol.Chem.* **268**, 21120-21129.
44. Fleming,I. (2003) Brain in the brawn: the neuronal nitric oxide synthase as a regulator of myogenic tone. *Circ.Res* **93**, 586-588.
45. Kurihara,N., Alfie,M.E., Sigmon,D.H., Rhaleb,N.E., Shesely,E.G. and Carretero,O.A. (1998) Role of nNOS in blood pressure regulation in eNOS null mutant mice. *Hypertension* **32**, 856-861.
46. Jacobson,A., Yan,C., Gao,Q. et al. (2007) Aging enhances pressure-induced arterial superoxide formation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **293**, H1344-H1350.
47. Hink,U., Li,H., Mollnau,H. et al. (2001) Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ.Res* **88**, E14-E22.

48. Laursen, J.B., Somers, M., Kurz, S. et al. (2001) Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* **103**, 1282-1288.
49. Peterson, T.E., Poppa, V., Ueba, H., Wu, A., Yan, C. and Berk, B.C. (1999) Opposing effects of reactive oxygen species and cholesterol on endothelial nitric oxide synthase and endothelial cell caveolae. *Circ.Res* **85**, 29-37.
50. Bonamy, A.K., Bendito, A., Martin, H., Andolf, E., Sedin, G. and Norman, M. (2005) Preterm birth contributes to increased vascular resistance and higher blood pressure in adolescent girls. *Pediatr Res* **58**, 845-849.
51. Mivelaz, Y., Zydorczyk, C., Barbier, A. 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* In press.
52. Belik, J., Jerkic, M., McIntyre, B.A. et al. (2009) Age-dependent endothelial nitric oxide synthase uncoupling in pulmonary arteries of endoglin heterozygous mice. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **297**, L1170-L1178.
53. Kim, J.H., Bugaj, L.J., Oh, Y.J. et al. (2009) Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. *J.Appl.Physiol* **107**, 1249-1257.
54. Smith, A.R., Visioli, F. and Hagen, T.M. (2006) Plasma membrane-associated endothelial nitric oxide synthase and activity in aging rat aortic vascular endothelia markedly decline with age. *Arch.Biochem.Biophys.* **454**, 100-105.

FIGURE 1

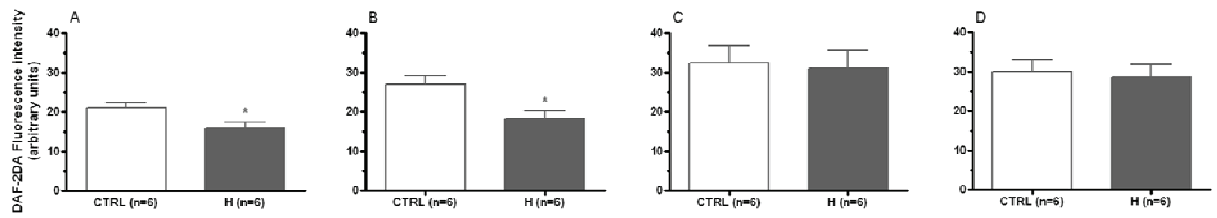
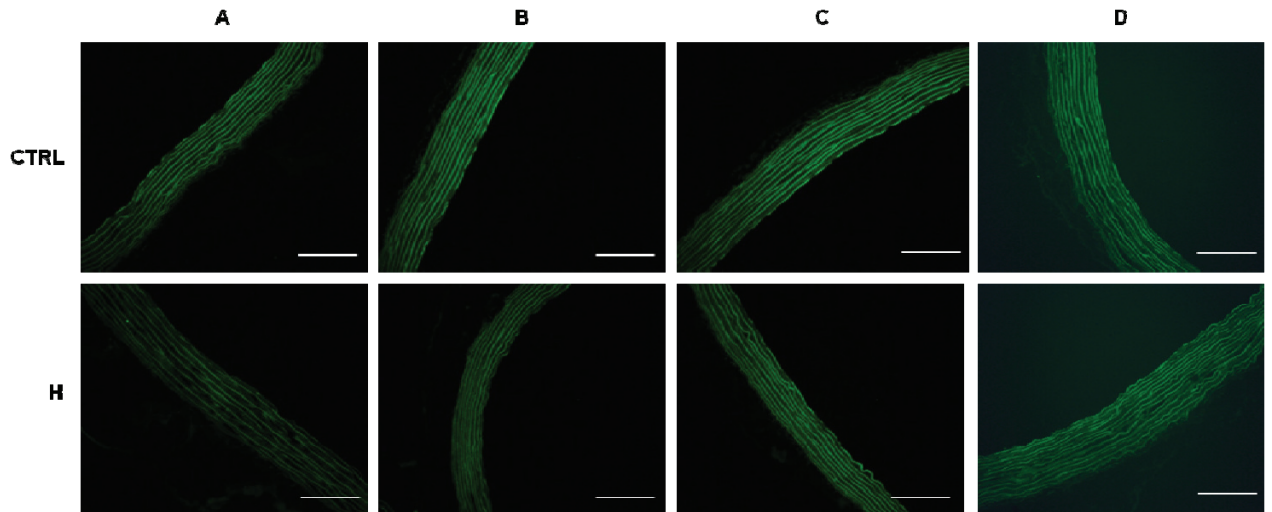


FIGURE 2

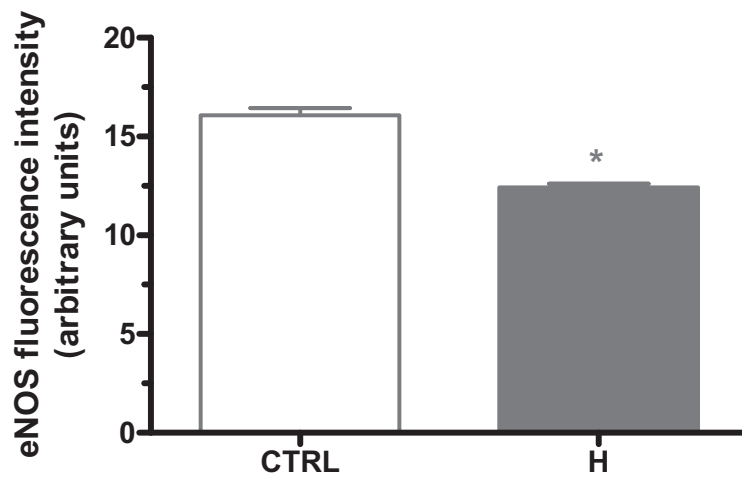
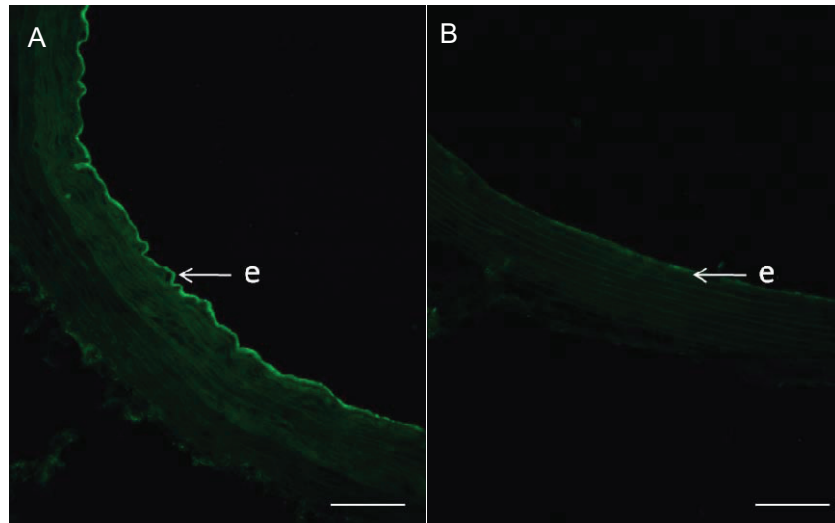


FIGURE 3

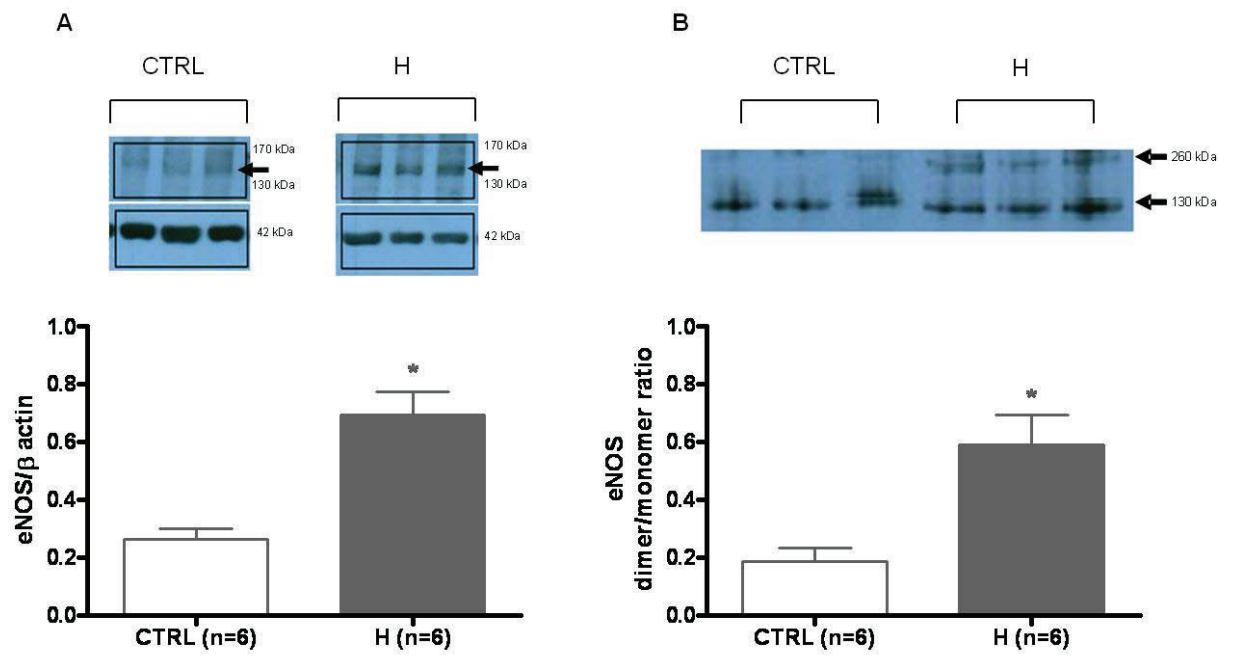
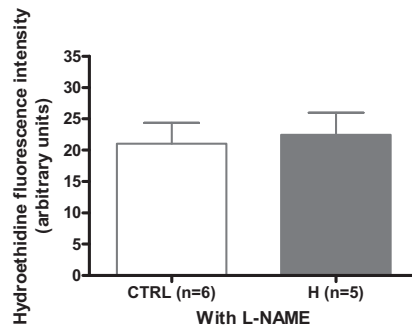
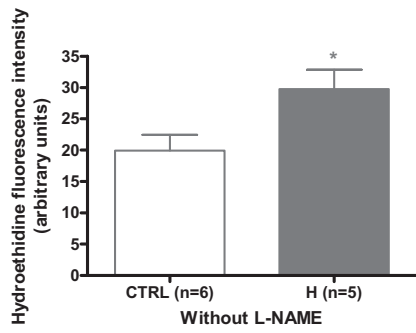
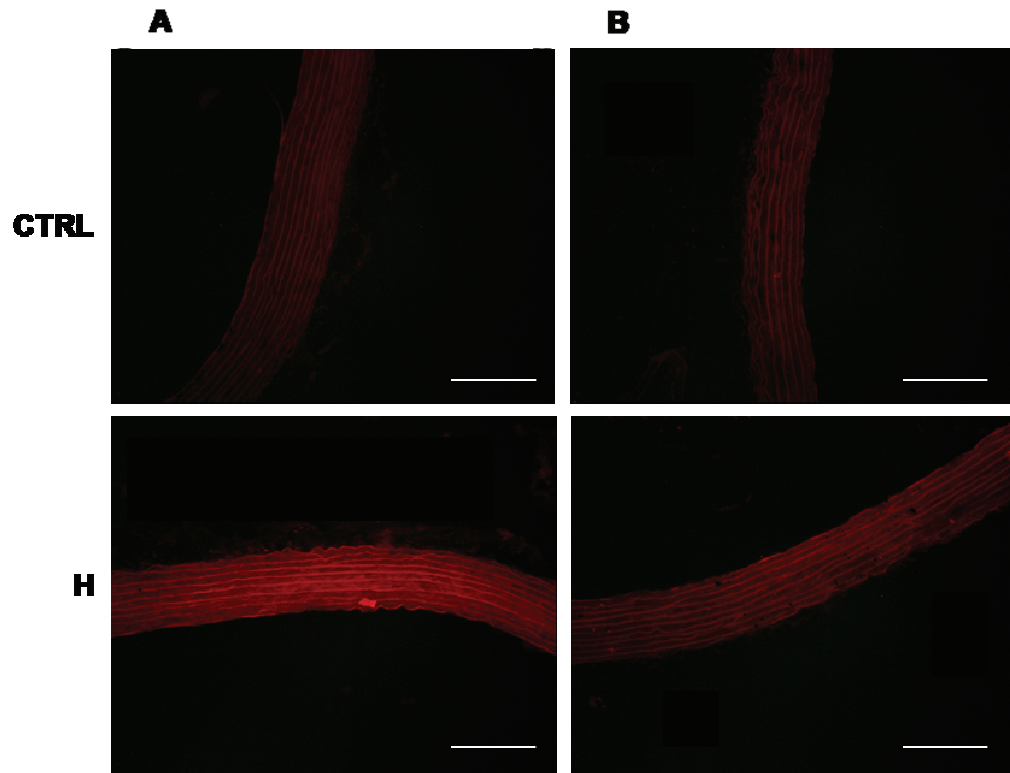


FIGURE 4



III - C TROISIÈME ARTICLE: NEONATAL OXYGEN EXPOSURE LEADS TO INCREASED AORTIC WALL STIFFNESS IN ADULT RATS: A DOPPLER ULTRASOUND STUDY

Contexte de l'étude

Nous avons observé à l'âge adulte une élévation de la pression sanguine, une dysfonction vasculaire en réponse au carbachol et à l'AngII chez les animaux ayant été exposés à une hyperoxie néonatale (groupe H).

Objectifs

Nous avons voulu regarder si ces dysfonctions vasculaires s'accompagnent d'une augmentation de la rigidité artérielle. Pour cela, nous avons mesuré la VOP par ultrasons après validation de la méthode par mesure intravasculaire.

Résultats

Nous avons observé une élévation de la VOP chez les animaux ayant été exposés à une hyperoxie néonatale

Conclusion

Cette élévation de la rigidité artérielle pourrait participer à l'élévation de la pression sanguine observée à l'âge adulte à la suite d'une exposition hyperoxique néonatale.

**NEONATAL OXYGEN EXPOSURE LEADS TO INCREASED AORTIC
WALL STIFFNESS IN ADULT RATS: A DOPPLER ULTRASOUND
STUDY**

First author surname: Mivelaz

Short title: Neonatal oxygen exposure and aortic stiffness

Mivelaz Y¹, Yzydorczyk C², Barbier A², Cloutier A², Fouron JC¹, de Blois D³, Nuyt AM²
Divisions of ¹Cardiology and ²Neonatology, Department of Paediatrics, Centre de recherche,
CHU Sainte-Justine, and ³Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Québec,
Canada

Corresponding author:

A.M. Nuyt, MD

Centre de recherche, CHU Sainte-Justine

Department of Pediatrics

Université de Montréal

3175, chemin de la Côte Sainte-Catherine

Montréal H3T 1C5, Québec, Canada

E-mail: **[adresse(s) courriel retirée(s)]**

Abstract Word count: 250

ABSTRACT

We have previously shown that neonatal high oxygen (O₂) exposure in rats leads to hypertension and vascular dysfunction in adulthood. Pulse wave velocity (PWV), an indirect measure of vascular biophysical properties (arterial stiffness or distensibility), is a sensitive marker of cardiovascular health. Its measurement in rats is mostly based on invasive hemodynamics measurements, prohibiting longitudinal studies particularly relevant in models of developmental programming of cardiovascular dysfunctions. With the current study we sought 1) to verify the feasibility and validity of measuring of aortic PWV in Sprague-Dawley (SD) rats by ultrasound; 2) to use the technique to compare aortic PWV in adult rats exposed to O₂ as newborns (80% day 3 to 10 of life) vs. controls and 3) to develop an algorithm to calculate PWV in a non-invasive manner. We calculated aortic PWV using standard echocardiography and electrocardiogram, and validated the measures with PWV obtained by intraaortic catheters. Aortic full length was measured at sacrifice. PWV was significantly increased in O₂ exposed (505±18 cm/s) vs. control animals (421±17 cm/s, p< 0.01). Of weight, femur length and distance from the manubrium to the anal margin (MA length), the latter showed the best correlation (R = 0.84, p< 0.0001) with full aorta length derived from: $(L) = 0.339 \times (\text{MA length}) + 4.281$.

The current data using echo-Doppler method demonstrated increased aortic stiffness in adult rats exposed to hyperoxia as newborns and suggests that non-invasive longitudinal studies of aortic PWV can be performed using the proposed algorithm for estimation of the full aorta length.

KEYWORDS: vascular function – ultrasonography – developmental origin of adult onset disease – oxidative stress

INTRODUCTION

The concept that many adult diseases can have their origins traced back to fetal life has been termed the “developmental origins of health and disease” (DOHAD) hypothesis¹. In addition to altered conditions in fetal life, increasing number of epidemiological and experimental studies indicate that events in early postnatal life can also have life-long consequences for the cardiovascular health of the adult^{2,3,4}. Premature birth and low birth weight have been correlated with elevated blood pressure, impaired endothelial function and increased arterial stiffness in children, adolescents and adults^{5,6}.

Experimental data suggest that oxidative stress may be an initiating trigger in programming of adult diseases. We have shown in a previous study that neonatal hyperoxic stress is associated with elevated blood pressure and with vascular dysfunction in conductance arteries of adult rats⁷. However, functional repercussions of the later observations have not been demonstrated. Pulse wave velocity (PWV) is an indirect measure of the biophysical properties of a vessel (arterial stiffness or distensibility) and a very sensitive marker of cardiovascular health⁸. Increased arterial stiffness is now recognized as an independent risk factor for cardiovascular events such as primary coronary events, stroke and mortality⁹. Its measurement in rats is mostly based on invasive hemodynamics measurements, prohibiting longitudinal studies particularly relevant in models of developmental programming of cardiovascular dysfunctions. Ultrasound assessment of aortic PWV is a simple and fast alternative. Previous studies have only assessed PWV on a small portion of the thoraco-abdominal length (4 to 5 cm), and this length was an estimate since the measure was taken on the surface of the animal^{10,11}. The combination of external measurement and the short distance may be a major source of imprecision. Therefore, we propose to evaluate an adaptation of the technique to measure the aortic pulse wave velocity (aortic PWV) on the full length of the aorta. Moreover, to the best of our knowledge, as non-

invasive aortic PWV has never been reported in Sprague-Dawley rats, reference control values are not yet available. The aims of the present study were: 1) to verify the feasibility of measuring aortic PWV in Sprague-Dawley rats by ultrasound; 2) to use the technique to compare aortic PWV in adult rats exposed to oxygen as newborns vs. controls and 3), to identify an anatomic marker that correlates the best with the full length of the aorta, allowing determination of aortic PWV in longitudinal studies.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Animals were used according to a protocol of the animal care committee of the Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine in accordance with the principles of the Canadian Council on Animal Care Guide for the Care and Use of Experimental Animals. Sprague-Dawley rat pups (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) were maintained in 80% O₂ (mixture of medical-grade 100% O₂ and room air with an oxycycler A82OCV, Biosherix) from days 3 to 10 of life (hyperoxia group, n = 3 litters) or in room air (control normoxia group; n = 14 litters). Pups were weaned at 4 weeks of age to regular chow. Survival of the pups, their growth and food intake were similar between groups. Both male and female offspring (no more than 2 animals per litter) were studied as adults between 6 and 9 months of age.

Experimental Procedures

Measurement of aortic PWV by ultrasound: Animals (n = 6 O₂-exposed and n = 6 controls) were lightly anaesthetized with isoflurane in order to maintain spontaneous breathing. The animals were placed on a warming pad to maintain normothermia in a prone position. The anterior chest hair was shaved using clippers and three prewired neonatal electrodes (Puppydog, Tyco-Kendall Co., Mansfield, MA, USA) were attached on the right forelimb, left forelimb and left hindlimb. With a Siemens Acuson CV70 ultrasound machine (Siemens Medical Solutions Inc., Mountain View, CA, USA) and a 13-5 MHz linear transducer, Doppler tracings of aortic flow and descending abdominal aorta, immediately above the aortic bifurcation, were recorded at a sweep speed of 200 mm/s simultaneously with the ECG and stored on CD-Rom. All Doppler measurements were obtained within 5 to 10 minutes after the anaesthesia induction; the animals were then allowed to recover from the anaesthesia and placed back in their cage.

Each tracing was then reviewed with Adobe Acrobat 6.0 Professional software (Adobe Systems Inc., San Jose, CA). After a 300% magnification and off-line calibration, the time elapsed from the peak of the R wave of the QRS to the onset of the flow wave was measured (Figure 1). For each tracing at least five measures were performed. The mean value and the coefficient of variation were calculated. For each rat, a time to the onset of the aortic valve (T1) and to the aortic bifurcation (T2) were obtained. The difference ($\Delta T = T2 - T1$) corresponds to the transit time of the pulse wave to travel from the aortic valve to the bifurcation. Five cardiac cycles were used to determine heart rate (HR) during both Doppler recordings. Mean of both values was used for statistical analysis. To assess within-subject intersessional variability, measurements were repeated for 5 cases.

Measurement of aortic PWV by intraaortic catheter:

Animals (n = 10 controls) were anaesthetized with pentobarbital (65 mg/kg i.p.). A polyethylene PE50 catheter was inserted in the aortic arch through the left carotid and another one in the distal abdominal aorta through the left femoral artery. The catheters were connected to a pressure transducer to record systolic and diastolic blood pressures and heart rate. Pulse wave was recorded at 500Hz. After sacrifice, the distance between the two catheters extremities was measured and PWV was calculated by dividing this distance by the time of propagation of the wave (cm/sec). For each animal, at least 10 measures obtained at 10 sec intervals were recorded and mean was calculated.

Anatomical measures: Rats (n = 6 O₂-exposed and n = 18 controls) were euthanized by aortic exsanguination under general anaesthesia (1 to 4 days after the ultrasound study). Weight and femur length and distance from the manubrium to the anal margin (MA length) were measured. After thoraco- and laparotomy, the aorta was incised immediately (1-2 mm) above the

aortic valve and a small wire with a very floppy distal extremity (Arrow Spring-Wire 0.018" - 45 cm, Arrow Int. Inc., Reading, PA) was gently introduced in the ascending aorta through the aortic arch and pushed until its extremity was visualized by transparency at the aortic bifurcation. A clip was placed on the wire where it entered the aorta. The length of the wire introduced was measured and reported as the length of the full aorta (L): from the aortic valve to the aortic bifurcation. Aortic PWV is calculated as the quotient of the separation distance (L) and the time difference between pulse arrivals, with respect to the R-peak of the ECG (ΔT).

One observer (YM), blinded to the rats group, performed all Doppler and aortic length measurements. All the measurements were performed by one investigator (YM) blinded to the group of the animals. For each animal, measures were obtained at least 5 times and showed high degree of consistency with 5 % variability from mean value. Based on the anatomic parameter with the greatest correlation with the measured aorta length, an algorithm derived from the regression linear line was established to estimate the aorta length.

Statistical analysis

All values are expressed as means \pm SE. Univariate statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test to compare non-parametric features. A linear regression analysis was performed and Spearman's correlation coefficient (R) was calculated to investigate the associations between the thoraco-abdominal aortic length (L) and the other anatomic parameters measured or calculated. The coefficient of variation was calculated to assess the variability for repeated measurements. Bland-Altman analysis was used to assess the concordance between the measured and calculated aorta length. All data were analyzed with commercially-available statistical software packages (GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA). A p value < 0.05 was considered significant.

RESULTS:

Control adult rats PWV measured by intraaortic catheters was 413 ± 16 cm/s. When using ultrasound to calculate PWV, the acquisition of the Doppler signal was possible in all rats. The aortic valve was clearly identifiable on a parasternal or suprasternal view of the ascending aorta and Doppler flow waves could be recorded in all cases (Figure 1). With colour Doppler, the abdominal aorta was identified and, either in a transverse or a sagittal view, the aortic bifurcation could be identified in all studies (Figure 1). The Doppler sample was placed as to record the flow just above the bifurcation.

Comparison of PWV of O₂-exposed vs. control adult rats

Characteristics of both groups and aortic PWV results are shown in Table 1. There was no significant difference for weight (for each gender), age and HR. Mean aortic PWV was significantly increased in O₂-exposed (505 ± 18 cm/s; n = 6) vs. control animals (421 ± 17 cm/s; p < 0.01; n = 6). Within each group, there was no difference in age, PWV and HR between genders.

Correlation between anatomic parameters and aorta length

Spearman's correlation coefficient showed the best significant correlation between the aortic and the MA length (R = 0.82, p < 0.0001; n = 24) (Figure 2). Femur length and weight were also significantly correlated but with lower strength (R = 0.77 for both). Therefore, the following algorithm for aortic length estimation based on the MA length was derived from the regression linear line equation:

$$[\text{Aortic length}] = 0.328 \times [\text{MA length}] + 4.593$$

The correlation between the measured and calculated aorta length is shown in Figure 3. The mean difference and the 95% limit of agreement between the two methods were calculated (0.08 cm, -0.47 cm and +0.63 cm respectively).

For each animal, the coefficient of variation for the PWV was less than 7%. The coefficient of variation calculated for the intraobserver variability was 7.5 %.

DISCUSSION

In our study, we confirmed that it was feasible to measure the thoraco-abdominal PWV in adult Sprague-Dawley rats with a standard ultrasound machine and have validated the method using intraarterial measurements. The ultrasound method allowed to show a significantly increased aortic PWV in adult rats exposed to high O as newborns compared to control. Finally we demonstrate that aorta length can be accurately estimated using the manubrium-anal external margin distance measured externally using the equation we derived.

In previous studies measuring PWV by ultrasound, the distance between the two sites of Doppler flow recording was only 4 to 5 cm and/or was measured externally (i.e. on the surface of the animal) without validation at sacrifice^{10,11}. The short distance and its external measurement may represent a significant source of error. The aortic valve and the abdominal aortic bifurcation, as selected in the current study, are two very easily identifiable anatomic structures localized at both extremities of the aorta allowing aortic PWV assessment on the full length of the aorta.

Comparison with other studies is complex because rat species, age and anaesthetic drugs are well recognized to be factors that can influence aortic PWV^{12,13,14}. Indeed, Soucy et al. showed in their study of Wistar rats that PWV increased very significantly with age, from 364 ± 7 cm/s at 3 to 4 months to 599 ± 19 cm/s at 22 to 24 months¹¹. Only Tatchum-Talom et al.¹⁴ performed a study similar to ours with regard to rat species and anaesthetic agent. Despite the fact that their rats were probably younger (age not specified, but range weight 200 to 250 grams), they report aortic PWV of 472 ± 42 cm/s in their control group which is slightly higher than the results in our control group, but nevertheless inferior than what we observed in the O₂-exposed group.

The investigation of mechanical and structural properties of arteries is crucial for studies of the mechanisms of developmental origins of cardiovascular disease. Several studies have

shown that endothelial-dependent and endothelial-independent vasodilation (well recognized precursor of hypertension and atherosclerosis) can be impaired and that flow-mediated dilation is decreased in low birth weight individuals from childhood to adult life ^{15,16,17,18,19}. PWV has been demonstrated to be an indirect measure of the biophysical properties (arterial stiffness or distensibility) of a vessel, and therefore a promising measure of cardiovascular health. In our study, we noted a significantly greater aortic PWV in adult rats exposed to hyperoxic stress in the neonatal period compared with control rats. This finding is in line with our previous observations that neonatal oxygen exposure is associated with increased blood pressure and impaired endothelium dependant vasodilatation of conductance vessels ⁷. Due to technical difficulties we were not able to record blood pressure simultaneously with aortic PWV, though it is reasonable to assume that the blood pressure was significantly higher in O₂-exposed rats vs. controls as we have previously reported ⁷. As elevated blood pressure can induce increased aortic PWV independent of impaired vascular structure, this raises the following question: what part of the increased aortic PWV is due to increased aortic stiffness and elevated blood pressure ^{20,21}? However, these two parameters are highly interrelated. Each might be the consequence of the other, but also might result from the same physiopathologic process. Indeed, it has been shown that angiotensin II can: 1) elevate blood pressure by enhancing vasoconstriction as well as sensitivity ²² and 2) increase aortic PWV by promoting structural vascular changes ²³. Further studies will be needed to clarify this aspect.

The observed increased PWV in adult rats subjected to neonatal hyperoxia are in agreement with studies in humans showing a correlation between altered perinatal conditions (low birth weight, prematurity; both associated with oxidative conditions) and increased indices of arterial rigidity in children as well as adults ^{5,19;24,25,26}. In another animal model, aorta of offspring of high fat diet fed dams have increased arterial stiffness in addition to reduced

endothelial cells volume and decreased smooth muscle cell number²⁷. Whether conductance vascular structure is altered after neonatal hyperoxic exposure is not known. The proportion of elastin vs. rigid collagen is a major determinant of arterial stiffness. Elastin synthesis in the vessels peaks in the prenatal period, mostly approaching term, decreases rapidly after birth and is minimal in the adult aorta²⁸. In rats, experimentally induced fetal growth inhibition results in lower elastin content of the aorta and persistent changes in aortic wall components²⁹. Composition of the aortic wall and other large conduit arteries is therefore determined relatively early during development, with little possibilities of “catch-up” or compensation later on.

In the perspective to study longitudinally the evolution of aortic PWV, we looked for anatomic measurements that correlate the best with the total aorta length. The best correlation was found with the MA length. The proposed algorithm for aortic length calculation showed a good agreement with the measured aorta length in the 24 rats studied. Indeed, the limits of agreement between the measured and calculated method is about ± 0.5 cm (5%). A 0.5 cm variation in aorta length will result in only a 5% variation of the PWV (a 25 cm/s variation for a PWV of 500 cm/s), which could be considered clinically of low relevance. We therefore propose that this method of assessment of total aortic length could be used to assess non-invasively aortic PWV and to monitor the progression of the clinical manifestation of vascular structural changes in different models studying vascular (patho)physiology over time (such as developmental programming of elevated blood pressure as in our studies) in Sprague-Dawley rats. To the best of our knowledge, this is the first report of an anatomical marker which could be used as a surrogate of the rat aorta length for the non-invasive measurement of the PWV.

Study limitations

We here report the method that we developed to measure PWV and derive the biophysical properties of the aorta. Technical considerations that may be important are the following: (1) the

ascending aorta was cut as close as possible to the aortic valve, but due to its elasticity and, probably that the real length of the aorta should be 1 or 2 mm longer. This imprecision represents between 1 to 2% of the mean length of the aorta; (2) because of the rapid velocities, the measured time differences between the onset of the Doppler flow in the ascending and abdominal aorta were relatively short. To minimize this issue, at least five measurements were performed on each Doppler tracings recorded with the highest sweep (200 mm/s) and off-line measurement performed after a 300 time magnification. Despite these technical considerations, the variability of the measures between animals was relatively small considering that statistically significant differences were detected between the groups despite a relatively small (about 20%) increase PWV observed in the H animals.

CONCLUSIONS

Assessment of the aortic stiffness is crucial to monitor cardiovascular health and the effects of preventive strategies and new therapies. In this animal study, PWV, a very sensitive marker of cardiovascular health, could be measured by standard ultrasound. Using this method, we found an increased aortic PWV in adult animals subjected to a brief period of hyperoxic stress as newborns. Whether this observation is associated with structural vascular change remains to be determined. The MA length could be used as a surrogate of the rat aorta length for the non-invasive follow-up of longitudinal studies, providing insight into arterial disease processes, and for monitoring the success of future medical therapies.

Acknowledgments - Funding Sources

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research, the Heart and Stroke Foundation of Canada and Pfizer Cardiovascular Research Foundation of Canada. Yvan Nivelaz was supported by a research grant from the Swiss National Science Foundation, SICPA Foundation, and the Société Académique Vaudoise. Anne Monique Nuyt was supported by a fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

Disclosures

We have no potential competing interests.

REFERENCES

1. Barker,D.J., P.D.Gluckman, K.M.Godfrey, J.E.Harding, J.A.Owens, and J.S.Robinson. 1993. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341:938-941.
2. Nuyt,A.M. and B.T.Alexander. 2009. Developmental programming and hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 18:144-152.
3. Cheung,Y.F., M.J.Taylor, N.M.Fisk, A.N.Redington, and H.M.Gardiner. 2000. Fetal origins of reduced arterial distensibility in the donor twin in twin-twin transfusion syndrome. *Lancet* 355:1157-1158.
4. Khorram,O., M.Momeni, M.Desai, and M.G.Ross. 2007. Nutrient restriction in utero induces remodeling of the vascular extracellular matrix in rat offspring. *Reprod. Sci* 14:73-80.
5. Tauzin,L., F.Risso, C.Buffat, G.Serra, and U.Simeoni. 2005. Vascular mechanisms in the developmental programming of cardio-vascular disease. *Pediatr Med Chir* 27:18-23.
6. 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* 89:217-221.
7. Yzydorczyk,C., B.Comte, G.Cambonie, J.C.Lavoie, N.Germain, S.Y.Ting, J.Wolff, C.Deschepper, R.M.Touyz, M.Lelievre-Pegorier, and A.M.Nuyt. 2008. Neonatal oxygen exposure in rats leads to cardiovascular and renal alterations in adulthood. *Hypertension* 52:889-895.

8. Safar, M.E. and P. Laurent. 2003. Pulse pressure and arterial stiffness in rats: comparison with humans. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 285:H1363-H1369.
9. Laurent, S., P. Boutouyrie, R. Asmar, I. Gautier, B. Laloux, L. Guize, P. Ducimetiere, and A. Benetos. 2001. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* 37:1236-1241.
10. Hartley, C.J., G.E. Taffet, L.H. Michael, T.T. Pham, and M.L. Entman. 1997. Noninvasive determination of pulse-wave velocity in mice. *Am. J. Physiol* 273:H494-H500.
11. Soucy, K.G., S. Ryoo, A. Benjo, H.K. Lim, G. Gupta, J.S. Sohi, J. Elser, M.A. Aon, D. Nyhan, A.A. Shoukas, and D.E. Berkowitz. 2006. Impaired shear stress-induced nitric oxide production through decreased NOS phosphorylation contributes to age-related vascular stiffness. *J. Appl. Physiol* 101:1751-1759.
12. Essalihi, R., M.L. Zandvliet, S. Moreau, L.A. Gilbert, C. Bouvet, C. Lenoel, F. Nekka, M.D. McKee, and P. Moreau. 2007. Distinct effects of amlodipine treatment on vascular elastocalcinosis and stiffness in a rat model of isolated systolic hypertension. *J. Hypertens.* 25:1879-1886.
13. Fitch, R.M., R. Vergona, M.E. Sullivan, and Y.X. Wang. 2001. Nitric oxide synthase inhibition increases aortic stiffness measured by pulse wave velocity in rats. *Cardiovasc. Res* 51:351-358.
14. Tatchum-Talom, R., C. Martel, and A. Marette. 2002. Influence of estrogen on aortic stiffness and endothelial function in female rats. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 282:H491-H498.

15. Franco, M.C., D.M. Christofalo, A.L. Sawaya, S.A. Ajzen, and R. Sesso. 2006. Effects of low birth weight in 8- to 13-year-old children: implications in endothelial function and uric acid levels. *Hypertension* 48:45-50.
16. Goh, K.L., A.C. Shore, M. Quinn, and J.E. Tooke. 2001. Impaired microvascular vasodilatory function in 3-month-old infants of low birth weight. *Diabetes Care* 24:1102-1107.
17. Goodfellow, J., M.F. Bellamy, S.T. Gorman, M. Brownlee, M.W. Ramsey, M.J. Lewis, D.P. Davies, and A.H. Henderson. 1998. Endothelial function is impaired in fit young adults of low birth weight. *Cardiovasc. Res* 40:600-606.
18. 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* 103:1264-1268.
19. 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* 102:2739-2744.
20. Albaladejo, P., P. Laurent, B. Pannier, A. Achimastos, M. Safar, and A. Benetos. 2003. Influence of sex on the relation between heart rate and aortic stiffness. *J. Hypertens.* 21:555-562.
21. Lantelme, P., C. Mestre, M. Lievre, A. Gressard, and H. Milon. 2002. Heart rate: an important confounder of pulse wave velocity assessment. *Hypertension* 39:1083-1087.
22. Zydorczyk, C., F. Gobeil, Jr., G. Cambonie, I. Lahaie, N.L. Le, S. Samarani, A. Ahmad, J.C. Lavoie, L.L. Oligny, P. Pladys, P. Hardy, and A.M. Nuyt. 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-R1068.
23. Simon,G., G.Illyes, and B.Csiky. 1998. Structural vascular changes in hypertension: role of angiotensin II, dietary sodium supplementation, blood pressure, and time. *Hypertension* 32:654-660.
 24. Lurbe,E., M.I.Torro, E.Carvajal, V.Alvarez, and J.Redon. 2003. Birth weight impacts on wave reflections in children and adolescents. *Hypertension* 41:646-650.
 25. 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* 73:116-121.
 26. 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.* 16:76-79.
 27. Armitage,J.A., L.Lakasing, P.D.Taylor, A.A.Balachandran, R.I.Jensen, V.Dekou, N.Ashton, J.R.Nyengaard, and L.Poston. 2005. Developmental programming of aortic and renal structure in offspring of rats fed fat-rich diets in pregnancy. *J Physiol* 565:171-184.
 28. Berry,C.L., T.Looker, and J.Germain. 1972. Nucleic acid and scleroprotein content of the developing human aorta. *J Pathol.* 108:265-274.
 29. Berry,C.L. and T.Looker. 1973. An alteration in the chemical structure of the aortic wall induced by a finite period of growth inhibition. *J Anat.* 114:83-94.

Table 1

| | Control group | Oxygen-exposed group |
|-------------------|---------------|----------------------|
| Age [months] | 7.6±0.2 | 7.9±0.5 |
| Weight [grams] | | |
| Females | 403±33 | 463±41 |
| Males | 716±30 | 785±65 |
| Male ratio [%] | 50% | 50% |
| Heart rate [bpm] | 322±26 | 346±39 |
| Aortic PWV [cm/s] | 421±17 | 505±18* |

All values except male ratio are expressed as mean ± SE

* p< 0.05

Aortic PWV: aortic pulse wave velocity

Figure legends

Figure 1

A. (left) Two-dimensional echocardiography of the ascending aorta with the aortic valve clearly identifiable (arrowhead).

(right) Doppler and ECG tracings at the level of the aortic valve. Timing lines were drawn at peak of R wave of ECG and at the onset the aortic wave (T1).

B. (left) Two-dimensional echocardiography with colour Doppler of the descending aorta with the aortic bifurcation clearly identifiable (arrowhead).

(right) Doppler and ECG tracings at the level of the aortic bifurcation. Timing lines were drawn at peak of R wave of ECG and at the onset the aortic wave (T2).

Figure 2

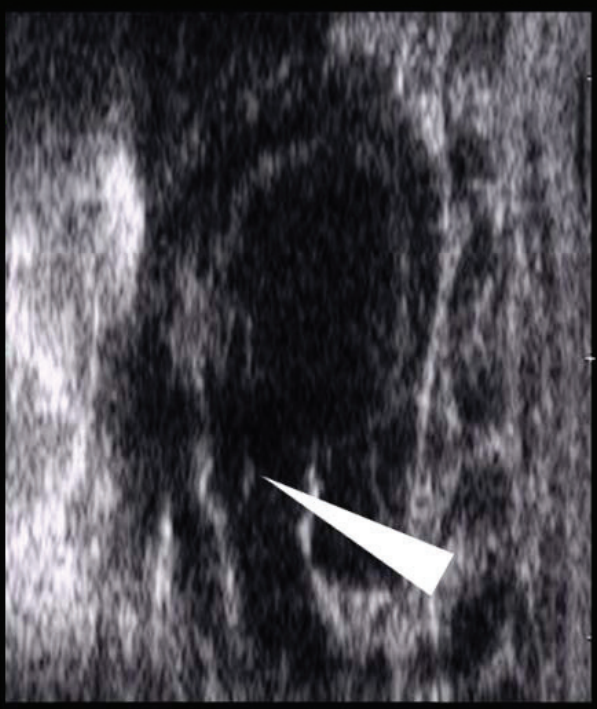
(right) Full aorta length (L) measured at sacrifice plotted against the length from manubrium to anal margin (MA) measured immediately before euthanasia

(left) Illustration of the measure of the MA length.

Figure 3

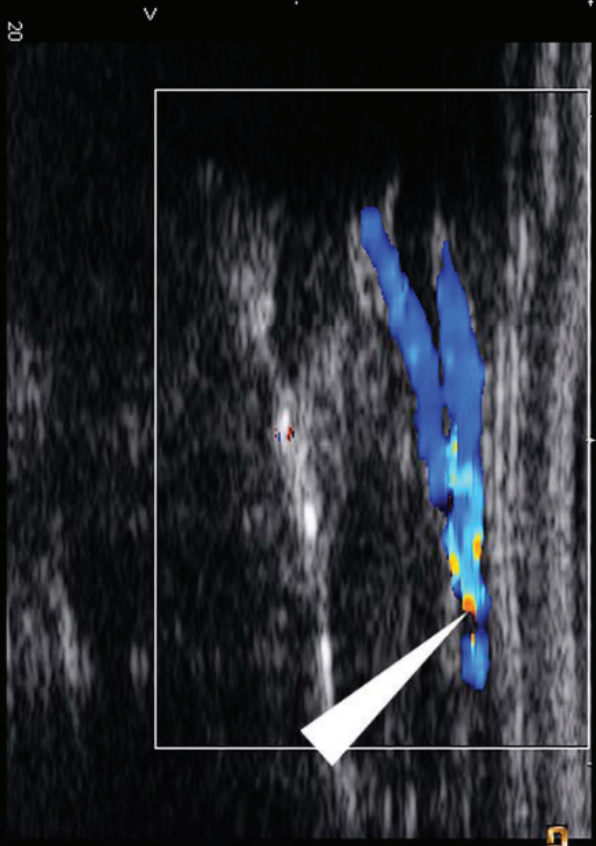
The difference between measured and calculated aorta length plotted against the average of the two corresponding measurements for all studied animals. The mean difference (continuous line) and the limits of agreement (dash line) are shown.

A

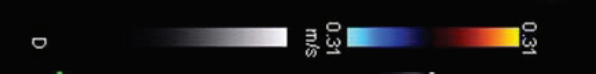


G

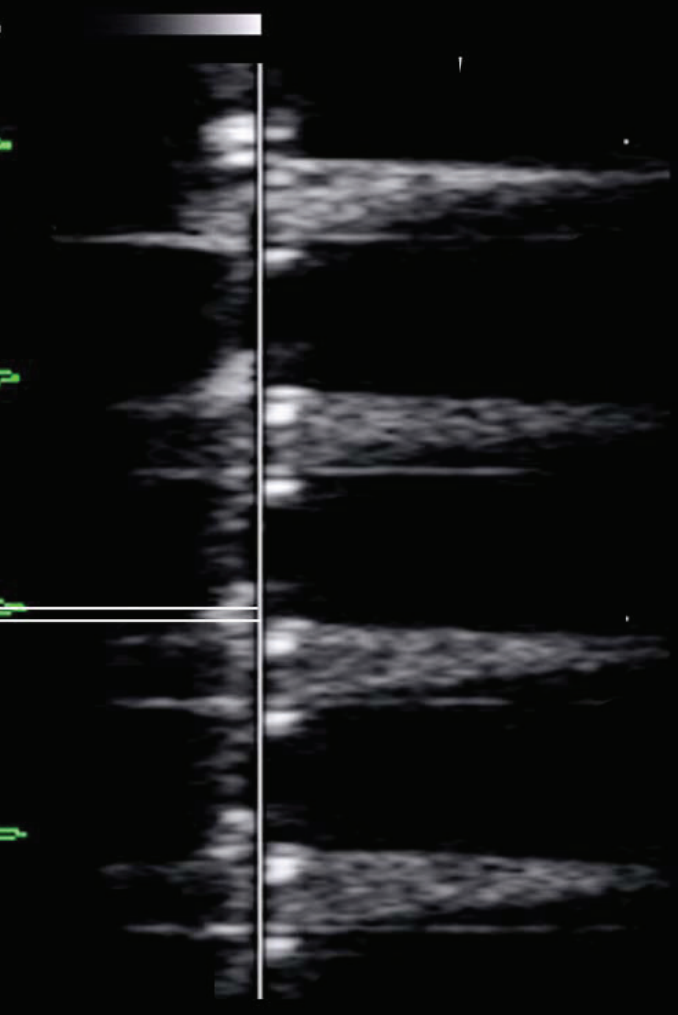
B



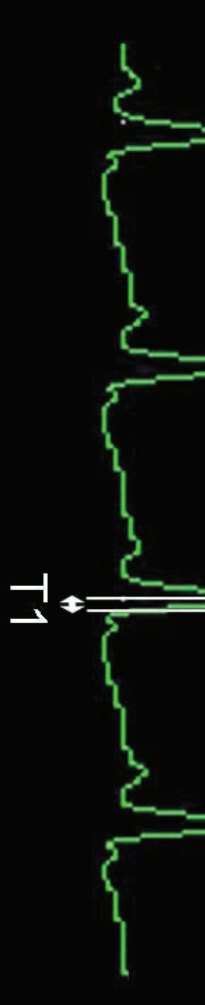
G1



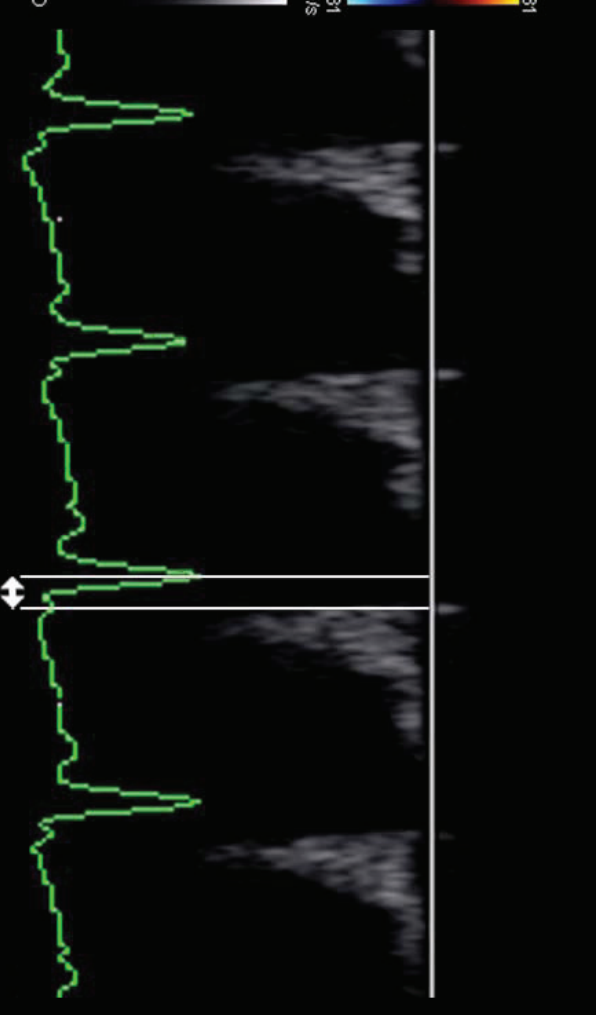
A



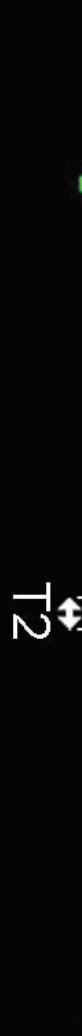
D

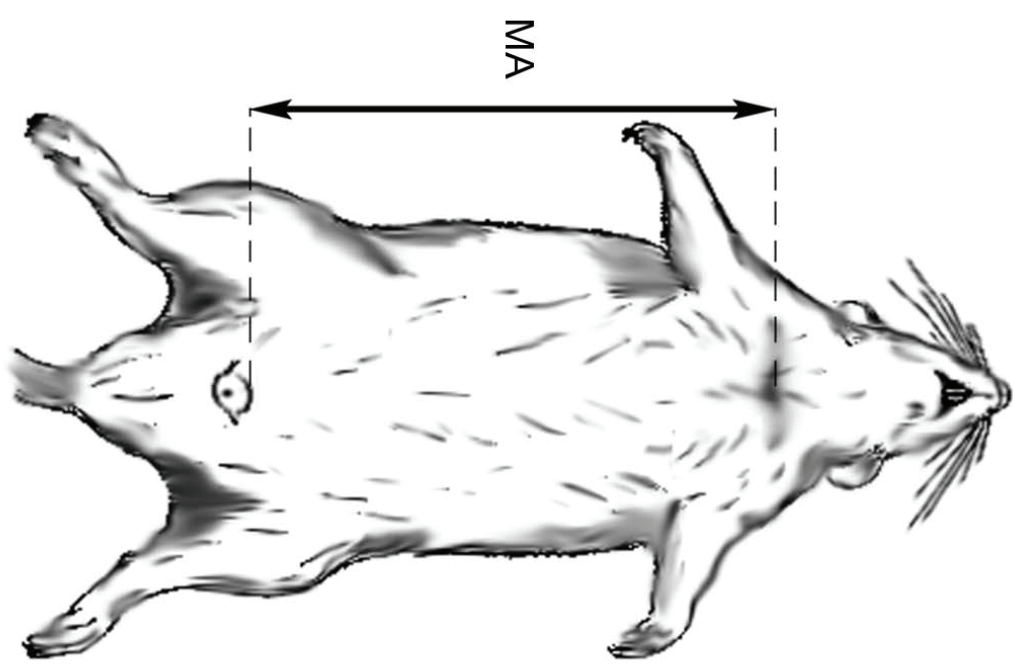
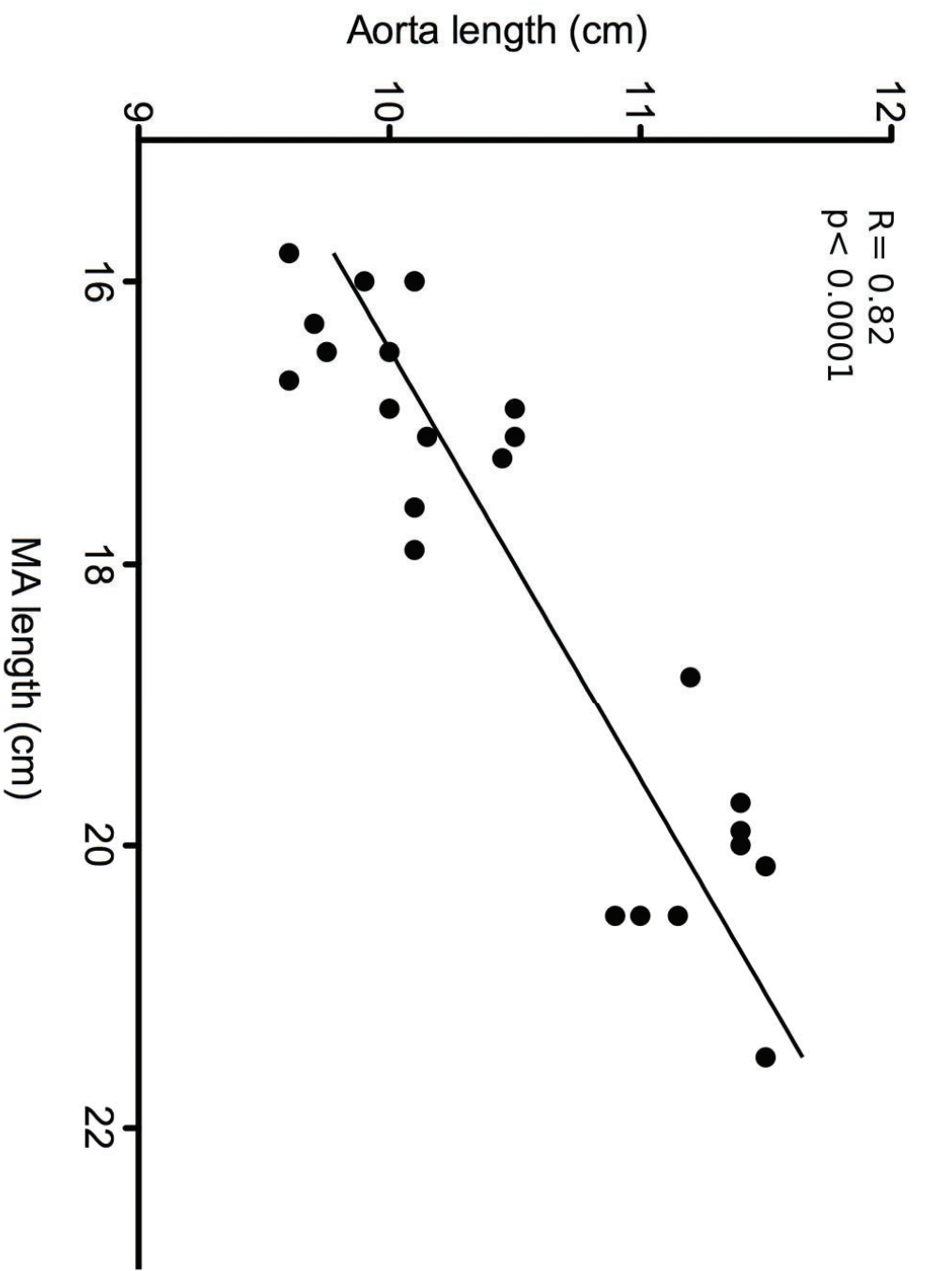


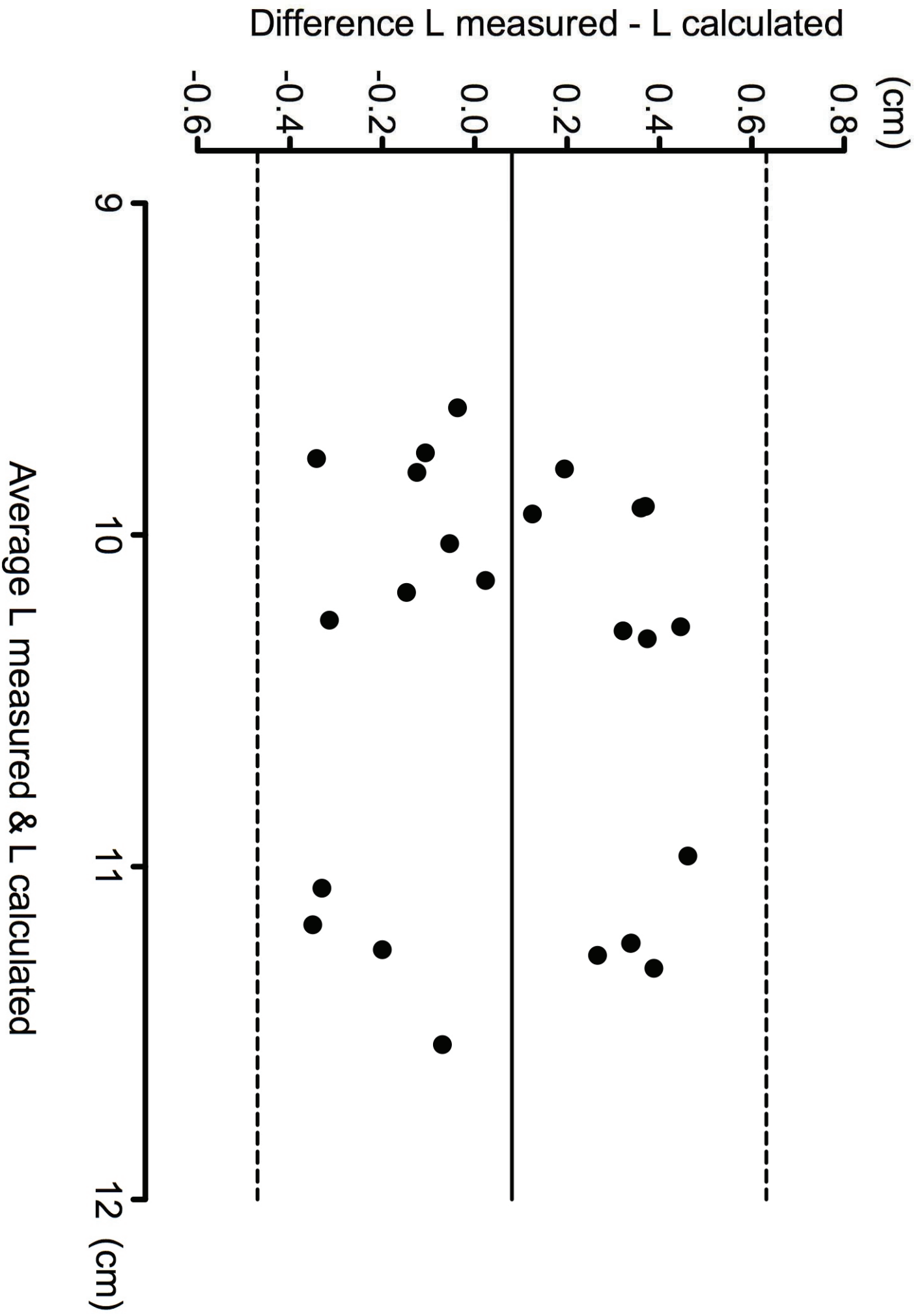
B



D







III - D RÉSULTATS ADDITIONNELS

Des résultats d'expériences complémentaires sont présentés dans cette section.

À la suite de nos observations selon lesquelles une exposition néonatale à un stress oxydant conduit à l'âge adulte à une élévation de la pression sanguine, une dysfonction vasculaire associée à une augmentation de la production d'anions superoxyde et une raréfaction microvasculaire. Nous avons évalué l'ontogenèse de ces dysfonctions, la présence d'un stress oxydant à l'âge de 4 semaines, âge auquel la pression sanguine n'est pas encore significativement augmentée. Nos données montrent une absence de dysfonction vasculaire et de production vasculaire accrue d'ERO à 4 semaines. Cependant des études histologiques de l'aorte (4 semaines) démontrent des changements de structure classiquement associés à une rigidité artérielle augmentée, qui pourrait participer à l'augmentation de la pression pulsée et de la pression sanguine observées à l'âge adulte.

Par la suite, étant donné que de nombreuses données supportent que le stress oxydant puisse jouer un rôle important dans le syndrome métabolique et qu'il soit plus un élément primaire que secondaire [133;576], nous avons envisagé que l'exposition néonatale dans notre modèle puisse également conduire à des altérations de certains paramètres métaboliques impliqués dans le développement du syndrome métabolique. Nos données actuelles suggèrent une susceptibilité des animaux ayant subi un stress oxydant néonatal.

Un déséquilibre nutritionnel pourrait conduire au développement d'un diabète de type 2.

L'ensemble de ces résultats sont commentés dans la partie « Discussion » de cette thèse.

III - D-1 MATERIELS ET METHODES

III - D-1-1 Histologie et immunohistochimie

À l'âge de 4 semaines, les rats ont été anesthésiés (kétamine (65 mg/kg) and xylazine (7 mg/kg), ip). L'aorte thoracique a été disséquée, fixée dans la formaline (10 %) puis enrobée de paraffine. Des coupes de 5 µm ont été marquées par la coloration de Verhoeff (fibres d'élastine) et le trichrome de Masson (fibres de collagène). La circonférence aortique a été mesurée en traçant la lamina élastique interne. La densité des fibres d'élastine et de collagène a été quantifiée au niveau de la média.

III - D-1-2 Mesure de l'activité des MMPS et de l'expression des TIMPS

Les aortes congelées ont été homogénéisées à l'aide d'un piston en acier inoxydable refroidi à -196°C avec de l'azote liquide. La poudre obtenue est diluée avec 1:4 v/v dans 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) contenant 3,1 mM de saccharose, 1 mM de dithiothréitol, 10 µg/mL de leupeptine, 10 µg/mL d'inhibiteur de trypsine de soja, 2 µg/mL d'aprotinine et cocktail inhibiteurs de protéases (P8340, Sigma). Cette solution a ensuite été homogénéisée sur de la glace à l'aide d'un pilon culot motorisé (Kontes) pendant 2 min. L'homogénat est ensuite centrifugé à 10 000 x g pendant 5 min à 4°C; le surnageant a été conservé dans la glace pour les analyses biochimiques ultérieures. La teneur en protéines aortiques a été déterminée par la méthode de l'acide bicinchoninique (Sigma).

Mesure d'activité par zymographie gélatine : Les échantillons non chauffés ont été dilués avec de l'eau afin de charger une quantité constante de protéines par puits (20 µg d'homogénat d'aorte). Ils sont soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 8 % copolymérisé avec de la gélatine (2 mg/mL, Sigma). Après 1,5 h, les gels ont été incubés

pendant 1 h à température ambiante dans une solution 2,5 % de Triton X-100 et incubés à 37°C pendant 20 h dans un tampon d'incubation (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ et 0,05 % NaN₃). Une coloration avec 0,05 % de bleu de Coomassie G-250 dans un mélange de méthanol: acide acétique: eau (2,5:1:6,5 v/v) est effectuée, suivi d'une décoloration dans le méthanol aqueux à 4 % et 8 % d'acide acétique. Les activités gélatinolytiques ont été détectées sous forme de bandes, analysées par densitométrie à l'aide d'image J (National Institutes of Health, USA). L'analyse Intergel a été possible après la normalisation de l'activité gélatinolytique avec un étalon interne (surnageant d'ester de phorbol activé cellules HT-1080, American Type Culture Collection).

Mesure d'expression par western blot : L'homogénat d'aorte (20 µg de protéines) a été chargé sur gel de polyacrylamide 10 %, les protéines séparées par électrophorèse à une tension constante de 150 V dans des conditions réductrices, puis électro-transférées sur membrane de difluorure polyvinylidène (BioRad) dans un tampon Towbin (20 % méthanol v/v, 25 mM Tris-base, 192 mM de glycine et 0,05 % w/v dodécyl sulfate de sodium). Les standards positifs et/ou les normes de poids moléculaire (161-0374, BioRad) ont également été chargés afin de confirmer la masse moléculaire des protéines à sonder. Les membranes polyfluorure de vinylidène ont été perméabilisées par trempage dans du méthanol pendant 1 min. Les protéines ont été transférées sur ces membranes à 100 V pendant 1 h. Les membranes ont été ensuite bloquées dans 5 % w/v poudre de lait écrémé dans du tampon TTBS (0,001 % v/v de Tween-20, 2 M Tris (pH 7,6), 0,10 M de NaCl) pendant 2 h à température ambiante ou une nuit à 4°C. Les membranes ont été incubées pendant une nuit à 4°C, dans 5 ml de 5 % w/v de poudre de lait écrémé dans du tampon TTBS avec un anticorps monoclonal anti-souris TIMP-1 (1:200 dilution; AA7, Santa Cruz), un anticorps

monoclonal anti-souris TIMP-2 (1:200 dilution; 3F373, Santa Cruz) et un anticorps polyclonal anti-lapin TIMP-4 (1:1000 dilution; AB816, Chemicon). Après le stripping de MMP-2 et TIMP-4 (incubation avec le tampon de décapage (21059, Thermo Scientific) pendant 15 min à température ambiante). Les mêmes membranes ont été re-sondées avec respectivement les anticorps TIMP-1 et TIMP- 2. La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (1:2,500 dilution) a été utilisé pour normaliser les niveaux de protéines sur chaque membrane. La même procédure a été répétée 3 fois : rinçages dans du TTBS, puis l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (anti-souris ou anti-lapin) a été ajouté (dans 10 mL dans 5 % w/v poudre de lait écrémé dans du tampon TTBS) pendant 60 min. Les membranes ont été visualisées à l'aide d'un kit de détection de la peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech) et les bandes quantifiées à l'aide d'image J.

III - D-1-3 Courbe de croissance et consommation alimentaire

Les animaux ont été pesés hebdomadairement entre la 7^{ème} et la 25^{ème} semaine de vie. À partir de la 15^{ème} semaine, les rats ont été placés dans des cages individuelles pendant 2 semaines afin de mesurer la consommation quotidienne de croquettes. Celle-ci a été ramenée au poids corporel des rats.

III - D-1-4 Composition corporelle

Les animaux âgés entre 20 et 26 semaines ont été analysés pour une détermination de la masse grasse et maigre au niveau abdominal par densitométrie (GE Lunar piximus).

Après anesthésie par injection intrapéritonéale (ip) de kétamine (65 mg/kg de poids corporel) et xylazine (7 mg/kg de poids corporel), les rats sont placés sur le dos et scannés au niveau des vertèbres lombaires (autour de L4). Le contenu total intra-abdominal des

tissus mous (masse maigre et grasse) a été calculé en utilisant un logiciel d'analyse d'image. La densité minérale osseuse a été évaluée sur l'os du tibia.

III - D-1-5 Tolérance au glucose et résistance à l'insuline

Après une nuit de jeûne, les rats ont été soumis à un test de tolérance au glucose avec injection ip (IPGTT) d'une solution de glucose à 30 % à la dose de 1 g/kg de poids corporel. Des échantillons de sang ont été prélevés au niveau de la veine saphène à 0, 15, 30, 60, 90 et 120 min après l'injection afin de mesurer la concentration plasmatique de glucose (glucomètre One Touch Ultra de LifeScan Canada; Burnaby, Colombie-Britannique, Canada) et d'insuline à 0 et 120 minutes par méthode Elisa (Millipore Corporation).

Une évaluation de la résistance à l'insuline a été faite avec le calcul de l'index HOMA, pour 'Homeostatic Model Assessment' : $HOMA = ([\text{Glycémie à jeun (mM)}] \times [\text{insulinémie à jeun (pM)}]) / 22.5$ [499].

III - D-1-6 Evaluation d'indices de stress oxydant

III - D-1-6-1 MDA

Les concentrations postprandiales plasmatiques de MDA ont été mesurées par HPLC suivant la méthode décrite par Levy *et coll.* [456].

III - D-1-6-2 Glutathion

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 x g. La séparation se fait par électrophorèse capillaire de zone (P/ACE™ MDQ système d'électrophorèse capillaire de Beckman Coulter) comme décrit précédemment [117].

III - D-1-7 Lipides plasmatiques : cholestérol total, triglycérides et acides gras non estérifiés

Les concentrations plasmatiques à jeun de cholestérol et de triglycérides ont été déterminées par kit enzymatique (BioMerieux Marcy-l'Etoile, France). La quantification des acides gras non-estérifiés (NEFA) a été réalisée avec le réactif NEFA-HR(2) (Wako Chemicals GmbH, Fuggerstraße 12, D-41468 Neuss).

III - D-1-8 Leptine

Des échantillons de plasma d'animaux nourris ont permis de quantifier les concentrations de leptine avec un kit enzymatique (Biovendor GmbH, D-69120 Heidelberg, Germany).

III - D-1-9 Expression d'Akt-1 et GLUT-4 par western blot

Des échantillons de muscle du tibia et de foie prélevés sur des animaux à jeun ont été homogénéisés et les protéines ont été extraites avec un tampon d'extraction (urée 5 M; Thiourée 2 M; CHAPS 4 %; Tris 40 mM; 50 mM DTT; Biolyte 30-10 0,2 %; PIC). Après centrifugation (18 000 x g, 15 min, 4°C), les surnageants ont été collectés pour la détermination de la teneur en protéines (utilisation d'un kit CRDC (BioRad), standard: albumine bovine). Les protéines dénaturées (25 µg) ont été séparées (gel de polyacrylamide-SDS) et transférées pendant 1h à température pièce sur une membrane de polyvinylidène fluoride (PVDF), lesquelles ont été bloquées pendant 1 h à température ambiante avec 5 % de lait en 1X TBS-Tween pour tous les anticorps. Elles sont ensuite

incubées avec des anticorps (Ac) monoclonaux primaires toute la nuit à 4°C : Ac lapin anti-Akt-1 (1/25000 lait 5 % + 1 X TBS-Tween); Ac lapin anti-GLUT-4 (1/5000 lait 5 % + 1 X TBS-Tween); Ac lapin anti- β -actine (1/1000 dans le lait 5 % + 1 X TBS-Tween), Ac chèvre anti-vimentine (1/200 lait de 5 % + 1 X TBS-Tween). L'incubation avec les anticorps secondaires se fait pendant 1h à température pièce : Ac anti lapin pour GLUT-4, Akt-1 et β -actine (1/5000 lait 5 % + 1X TBS-Tween), Ac anti-chèvre pour vimentine (1/10 000 lait 5 % + 1 X TBS-Tween). Les anticorps ont été visualisés en utilisant une méthode améliorée de chemiluminescence (Immobilon Western; Millipore Corporation). Les films (Biorad) ont été numérisés à l'aide d'un scanner à plat, et les images analysées avec Gel analyseur Pro 3.1 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA), les résultats ont été normalisés à β -actine (Akt-1) et à la vimentine (GLUT-4).

III - D-2 ONTOGENÈSE DE LA DYSFONCTION VASCULAIRE

III - D-2-1 Effets de l'exposition néonatale à l'oxygène sur la vasomotricité ex-vivo à 4 semaines

Dans cette partie de notre travail, nous avons étudié la réactivité vasculaire à l'AngII et au carbachol chez les animaux âgés de 4 semaines. Nos données montrent qu'elle est similaire entre les groupes (H et NNI). Les courbes dose-réponse à l'Ang II (Figure 20 A) et au carbachol (Figure 20 B) ne sont pas différentes entre les groupes.

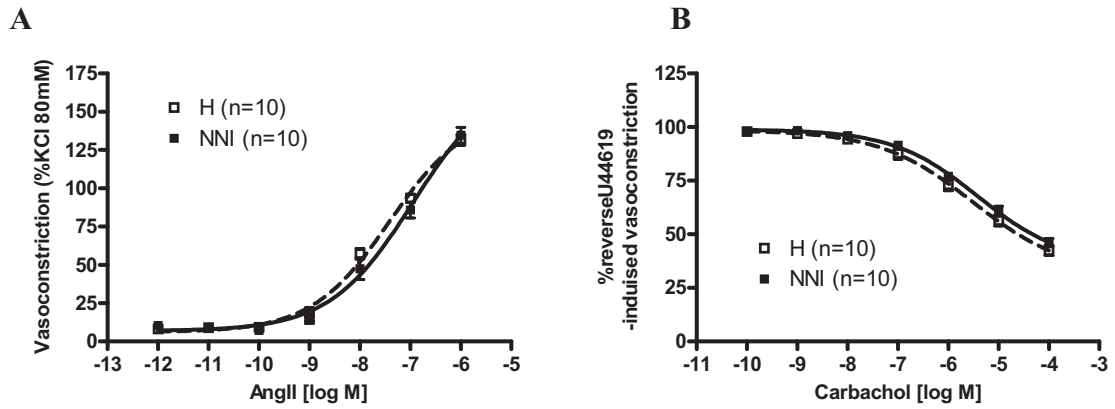


Figure 20 : Réponse vasocontractile à l'angiotensine II dans le groupe H et NNI (A). La contraction est exprimée (%) par rapport à la réponse KCl (80 mM). Réponse vasodilatatrice en réponse au carbachol dans le groupe H et NNI (B). La vasodilatation est exprimée (% reverse) de la vasoconstriction du U46619 (0,3 μ M). Les données représentent la moyenne \pm SEM.

III - D-2-2 Effets de l'exposition néonatale sur la production vasculaire d'anions superoxide à l'âge de 4 semaines

La production d'anions superoxide n'est pas différente entre les groupes (H : $17,0 \pm 0,5$ vs NNI : $17,0 \pm 0,7$ UA) (Figure 21 A et 21 B).

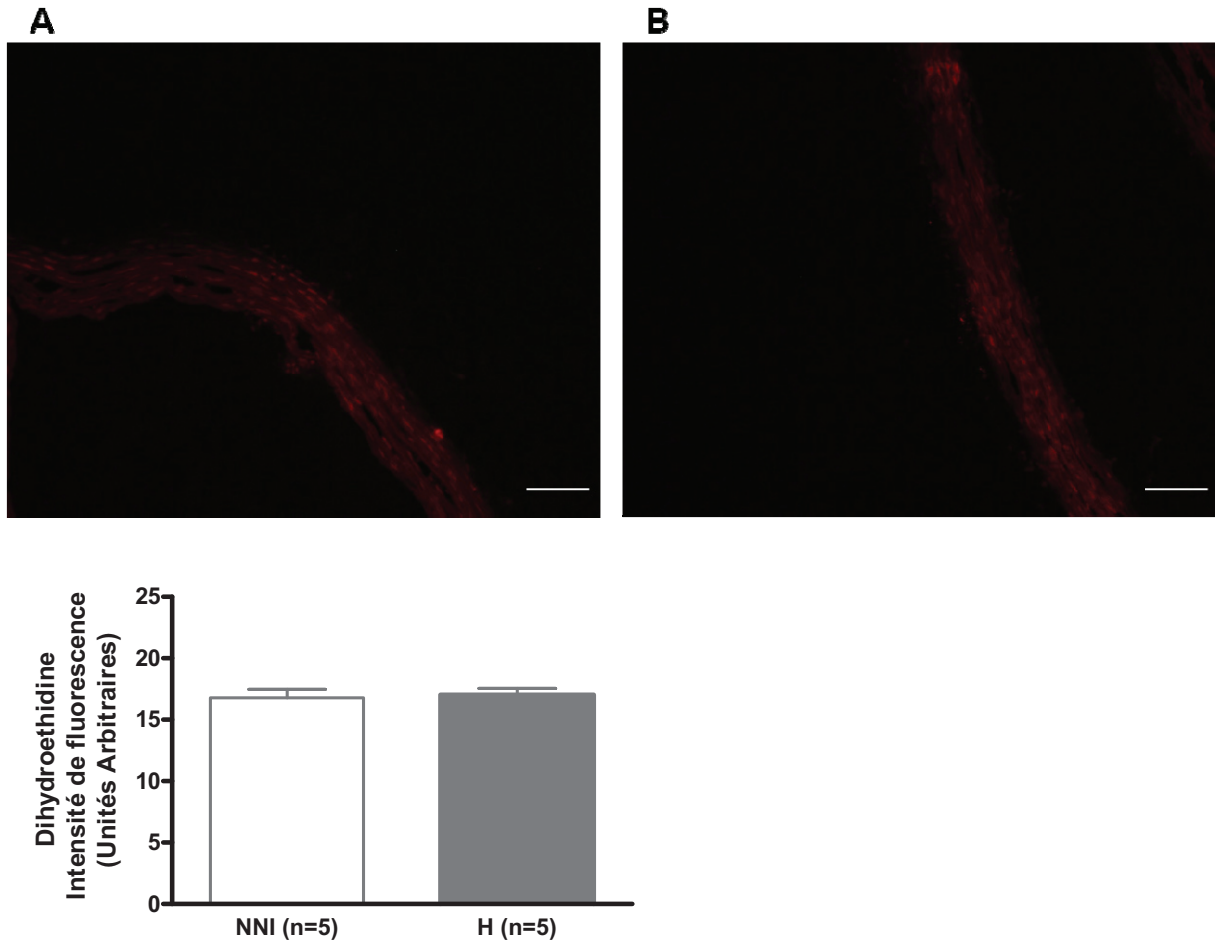


Figure 21 : Sections d'aorte dans le groupe H (A) et NNI (B) après le traitement avec la dihydroéthidine ($2 \mu\text{M}$). Images obtenues par un microscope confocal (LSM 510 laser scanning microscope, Zeiss) équipé d'un faisceau argon. La fluorescence a été détectée à 514 nm. Les données représentent au moins 6 expériences (les microphotographies sont représentatives). Échelle = $100 \mu\text{m}$.

III - D-2-3 Effets sur l'architecture de la media à 4 semaines

Nos analyses du remodelage de la matrice extracellulaire montrent qu'en comparaison au groupe NNI, la densité des fibres d'élastine est significativement diminuée dans le groupe H ($31 \pm 2 \%$ vs $44 \pm 2 \%$, $p < 0,001$) (Figure 22 A) alors que la densité des fibres de collagène (Figure 22 B) est significativement augmentée ($54 \pm 7 \%$ vs $29 \pm 5 \%$, $p < 0,001$). Par conséquent, le rapport élastine/collagène (Figure 22 C) est diminué dans le groupe soumis à l'hyperoxie ($0,6 \pm 0,1$ vs $2,4 \pm 0,4$, $p < 0,001$).

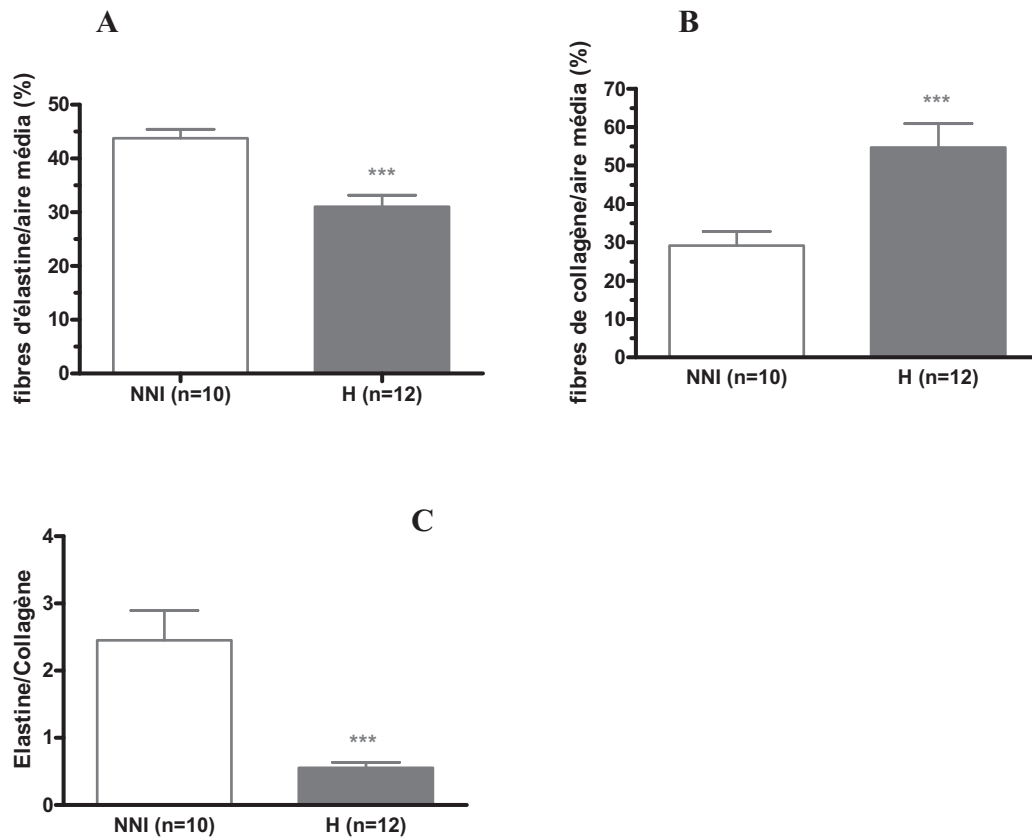


Figure 22 : Chez le rat âgé de 4 semaines, mesure de la densité de fibres d'élastine en utilisant la coloration de Verhoeff (A); *** $p < 0,001$ H vs NNI; Mesure de la densité de fibres de collagène en utilisant le trichrome de Masson (B); *** $p < 0,001$ H vs NNI. (C) Ratio élastine/collagène; *** $p < 0,001$ H vs NNI. La densité est exprimée (%) à l'aire de la média. Les données représentent la moyenne \pm SEM.

Tel qu'illustré sur la Figure 23, nous pouvons observer que la coloration de Verhoeff (identifiant les fibres d'élastine) est plus faible dans le groupe H en comparaison au groupe NNI (Figure 23 B vs A) alors que la coloration au trichrome de Masson (identifiant les fibres de collagène) est plus importante dans le groupe H en comparaison au groupe NNI (Figure 23 D vs C).

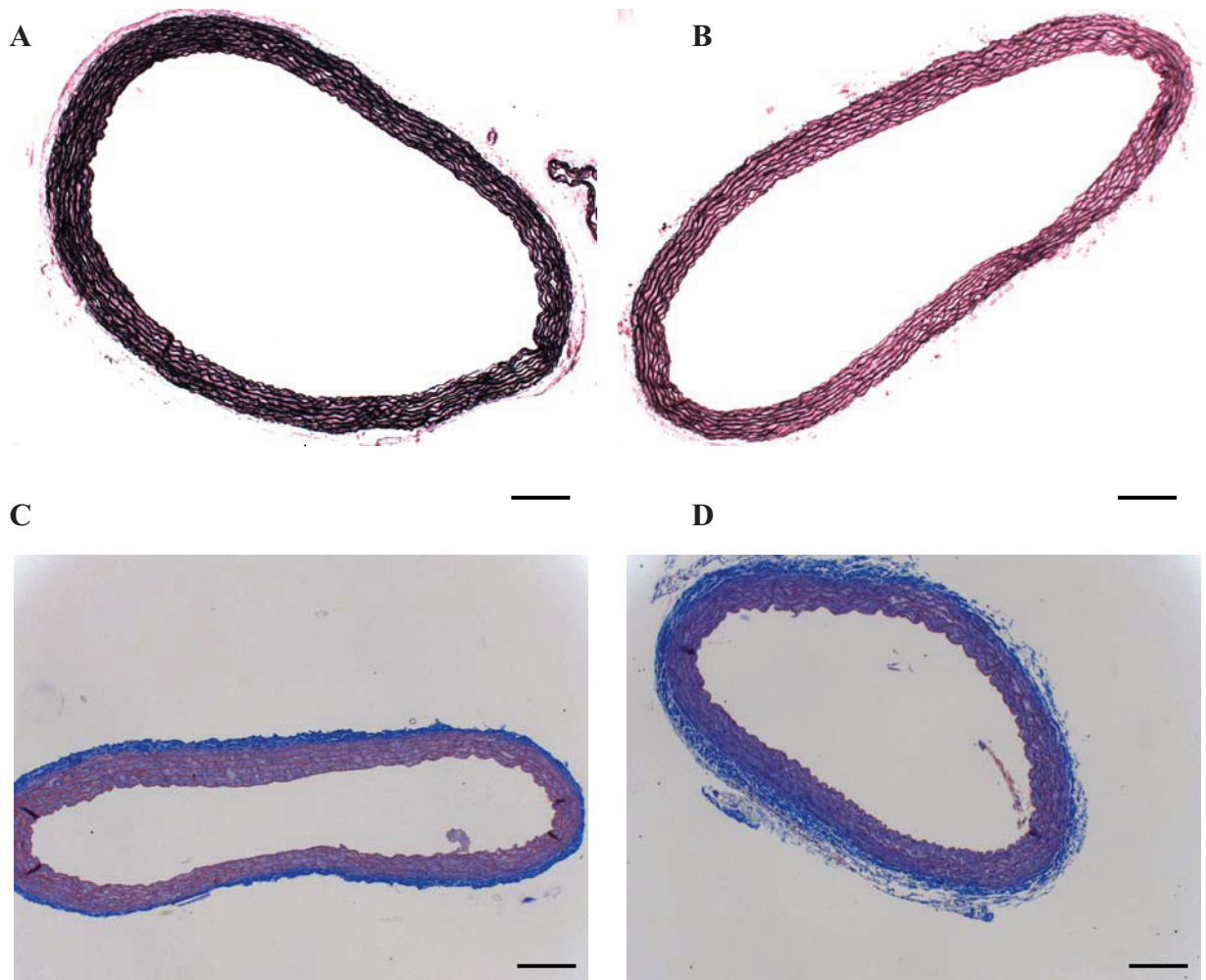


Figure 23 : Coloration de Verhoeff sur l'aorte dans le groupe NNI (A) et du groupe H (B) d'animaux âgés de 4 semaines, grossissement 20X. Trichrome de Masson sur l'aorte dans le groupe NNI (C) et dans le groupe H (D), grossissement 20X.

III - D-2-4 Effets sur l'activité et l'expression des MMPS et TIMPS à l'âge de 4 semaines

Par zymographie nous n'avons pas observé de différence dans l'activité de la MMP-2 (Figure 24 A) ni dans NGAL/MMP-9 (Figure 24 B). Ceci a été confirmé par les analyses par western blot de l'expression de TIMP-1, TIMP-2 et TIMP-4 ne montrant aucun changement significatif (Figures 24 C, D et E).

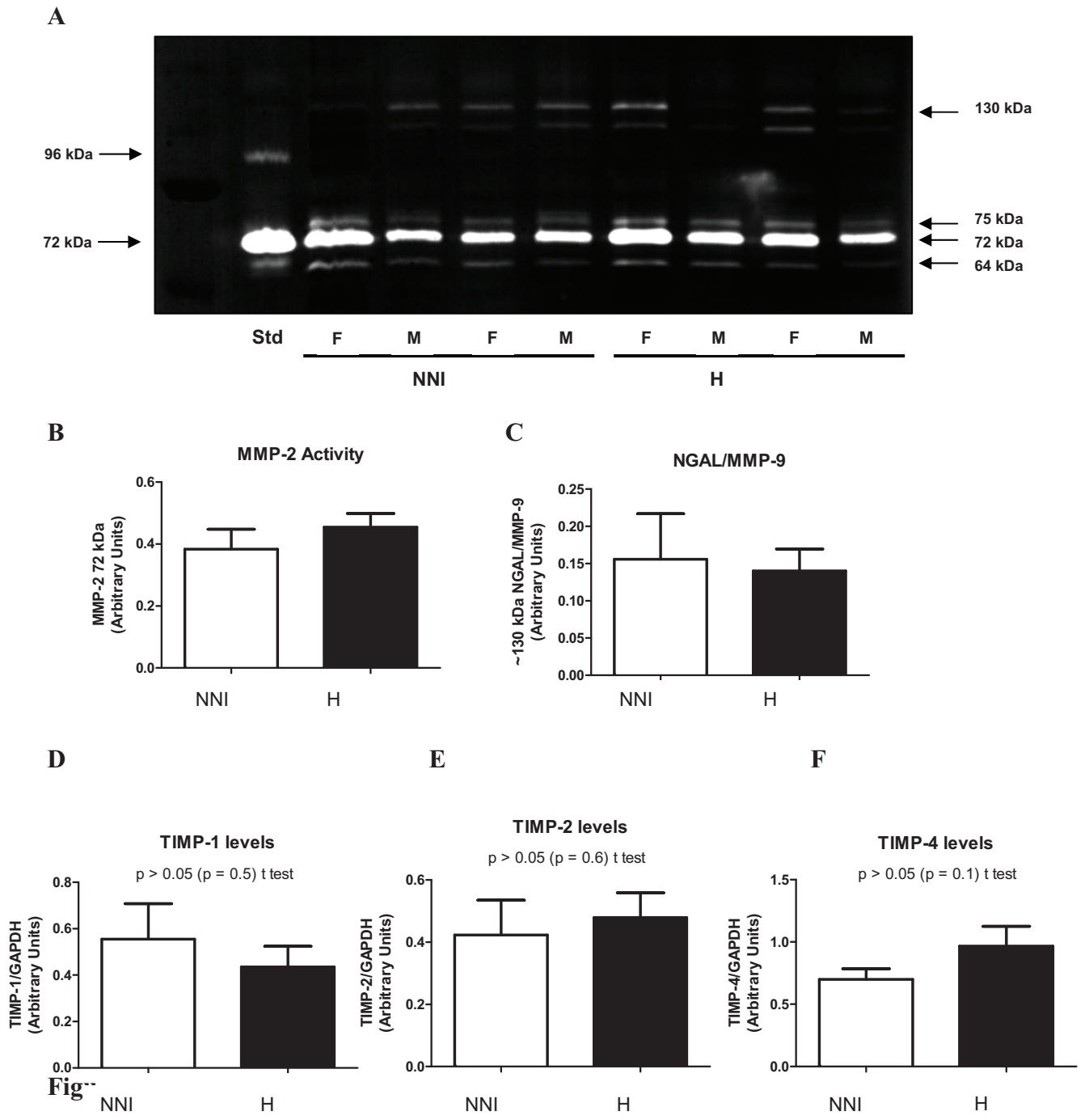


Fig. moyenne \pm SEM (n=5, 6 rats/groupes).

a

En conclusion, à l'âge de 4 semaines, les dysfonctions vasculaires observées à l'âge adulte à la suite d'un stress oxydant néonatal ne sont pas installées; cependant la diminution du rapport élastine/collagène qui traduit une rigidité artérielle augmentée est déjà présente avant l'élévation de la pression sanguine. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la pression pulsée et de la pression sanguine observées à l'âge adulte.

III - D-3 CONSÉQUENCES MÉTABOLIQUES

Étant donné l'importance des données de la littérature sur le rôle du stress oxydant dans les changements de paramètres métaboliques conduisant au développement du diabète de type 2/syndrome métabolique, nous avons émis l'hypothèse que le stress oxydant néonatal pourrait programmer des altérations de certains paramètres métaboliques et conduire ultérieurement à un diabète de type 2.

Les données qui sont ci-après ont été réalisées chez les mâles et les femelles du même groupe d'âge. Pour les paramètres où nous n'avons pas observé de différence de genre, dans le but de ne pas alourdir le texte, uniquement les résultats des mâles sont décrits. Pour les données où nous avons observé une différence de genre (composition corporelle, niveaux de MDA, aire sous la courbe de glucose) les résultats des mâles et femelles sont présentés.

III - D-3-1 Croissance, consommation alimentaire et composition corporelle

Dans les deux sexes, tel que présenté sur la Figure 25, les courbes de poids sont linéaires ($r^2 = 97\%$) et similaires. Cependant, dans les groupes où les mères ont été échangées entre le 3^{ème} et 10^{ème} jour de la vie des nouveau-nés (groupes NN et NH), la croissance des animaux entre la 7^{ème} et la 15^{ème} semaine d'âge est plus faible comparativement à ceux dont les

mères n'ont pas été interchangeées (groupe NNI). L'exposition au stress hyperoxique est associée à une diminution significative du poids (par rapport au groupe NH, $p < 0,01$). Néanmoins, à 25 semaines d'âge, plus aucune différence de poids entre les groupes n'est observée, un phénomène de rattrapage (catch up en anglais) ayant eu lieu.

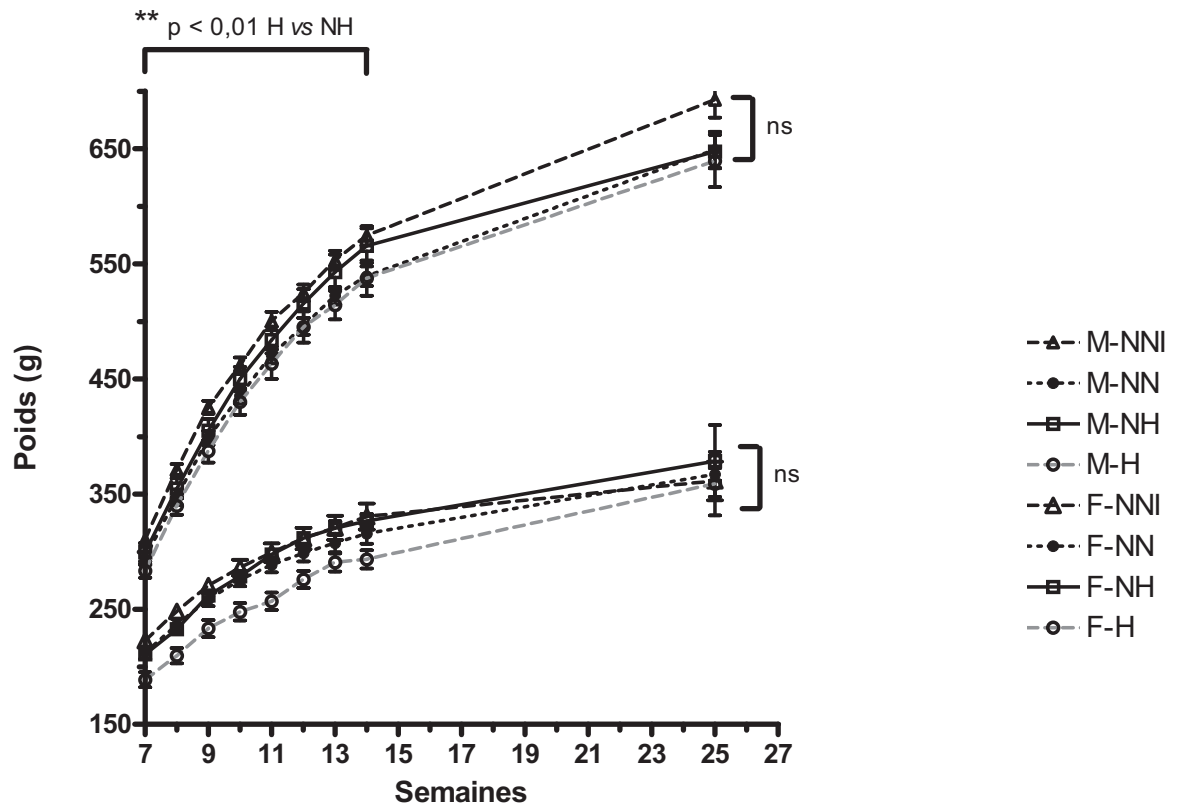


Figure 25 : Courbe de croissance entre la 7^{ème} et 25^{ème} semaine.

La consommation quotidienne de croquettes a été mesurée pendant 2 semaines entre l'âge de 15 et 17 semaines. Aucune différence significative n'est observée chez les mâles : $45,5 \pm 2,3$ vs $43,1 \pm 2,3$ g/jour/g de poids corporel dans les groupes H et NNI ($n=7$ /groupe). La tendance est similaire chez les femelles : $51,9 \pm 4,8$ vs $50,1 \pm 5,9$ g/jour/g de poids corporel ($n=7$ /groupe). Aucun effet significatif de sexe sur la consommation de croquettes n'a été observé. La leptine étant une hormone sécrétée par le tissu adipeux qui intervient dans la

régulation de l'appétit et du poids, nous en avons mesuré les niveaux plasmatiques à l'état nourri chez les animaux à 17 semaines. Les concentrations ne sont pas modifiées par le stress oxydant postnatal d'une semaine. Étant donné que nous n'observons pas d'effet du sexe, l'ensemble des données a été poolé : $248,1 \pm 38,1$ (pg/ml) (n=19) vs $255,3 \pm 28,1$ (pg/ml) (n=16) dans le groupe H et NNI respectivement.

Les données de la composition corporelle des mâles sont rapportées dans le Tableau 6. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes dans le contenu en masses maigre, grasse ni dans la densité minérale osseuse. Cependant, des différences significatives de sexe ont été détectées au niveau de la masse maigre et la masse grasse qui sont plus importantes chez les femelles que chez les mâles.

Tableau 6 : Composition corporelle des animaux mâles âgés de 20 semaines.

| | NNI | NN | NH | H |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| Masse maigre (%) | | | | |
| MÂLES | $73,2 \pm 1,2$ (7) | $67,9 \pm 3,3$ (7) | $75,2 \pm 3,0$ (6) | $69,6 \pm 3,0$ (8) |
| FEMELLES | $65,3 \pm 1,1$ (8) ** | $62,9 \pm 1,5$ (7) | $60,6 \pm 1,4$ (8) ** | $60,0 \pm 2,6$ (6) * |
| Masse grasse (%) | | | | |
| MÂLES | $26,7 \pm 1,3$ (7) | $33,2 \pm 3,4$ (7) | $24,8 \pm 3,1$ (6) | $30,4 \pm 3,1$ (8) |
| FEMELLES | $37,0 \pm 1,7$ (8)** | $38,0 \pm 1,3$ (7) | $41,5 \pm 1,3$ (8) ** | $40,01 \pm 2,6$ (6) * |
| DMO (g/cm²) | | | | |
| MÂLES | $0,20 \pm 0,01$ (7) | $0,21 \pm 0,01$ (7) | $0,20 \pm 0,01$ (6) | $0,21 \pm 0,01$ (8) |
| FEMELLES | $0,19 \pm 0,01$ (8) | $0,19 \pm 0,01$ (7) | $0,19 \pm 0,01$ (8) | $0,18 \pm 0,01$ (6) |

Différences de sexe: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

DMO : densité de masse osseuse

III - D-3-2 Tolérance au glucose et résistance à l'insuline

Les conséquences métaboliques du stress oxydant postnatal ont été testées chez les animaux adultes. La tolérance au glucose a été évaluée grâce à une IPGTT. Le Tableau 7 présente les données de glucose et d'insuline plasmatiques obtenues chez les animaux mâles. Elles ont permis de calculer le HOMA, indice de la résistance à l'insuline. Aucun effet significatif du sexe n'a été observé. Même si l'analyse des données entre les groupes n'a pas montré de différence significative, il existe une tendance à des valeurs plus élevées dans le groupe H pour la glycémie (0 and 120 min), le HOMA et le rapport des concentrations plasmatiques glucose/insuline 2 h après l'injection de glucose (142 et 167 % de différence entre le groupe H et respectivement, les groupes NNI et NH).

Tableau 7 : Réponse des animaux mâles adultes à la suite d'une charge de glucose. Concentrations plasmatiques de glucose et insuline; évaluation de la résistance à l'insuline avec le HOMA et le ratio glucose/insuline calculé 2h après l'injection ip.

| | NNI | NN | NH | H |
|----------------------------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|
| Glycémie t=0 min (mM) | 5,9 ± 0,2 (8) | 5,8 ± 0,2 (9) | 5,8 ± 0,2 (8) | 6,5 ± 0,2 (10) |
| Glucose t=120 min (mM) | 5,7 ± 0,2 (8) | 5,9 ± 0,3 (9) | 5,4 ± 0,2 (8) | 6,1 ± 0,3 (10) |
| Insuline t=0 min (µg/L) | 1,2 ± 0,2 (8) | 1,5 ± 0,2 (9) | 0,8 ± 0,2 (8) | 1,5 ± 0,3 (10) |
| Insuline t=120 min (µg/L) | 1,8 ± 0,4 (8) | 1,9 ± 0,2 (9) | 1,6 ± 0,2 (8) | 1,5 ± 0,3 (10) |
| HOMA | 7,5 ± 1,4 (8) | 9,3 ± 1,1 (9) | 4,8 ± 1,0 (8) | 10,8 ± 2,3 (10) |
| Glucose/Insuline (t=120) | 4,0 ± 0,7 (8) | 3,3 ± 0,4 (9) | 3,7 ± 5,8 (8) | 9,7 ± 5,8 (10) |

Les calculs de l'aire sous la courbe de l'excursion glycémique à la suite de la charge permettent une évaluation de la tolérance globale au glucose (Figure 26). Chez les mâles adultes, le fait d'avoir interchangé les mères n'a pas eu d'effet sur la tolérance au glucose

(NNI, NN et NH pas significativement différents) alors qu'une exposition à l'hyperoxie en période néonatale conduit à l'âge adulte, à une diminution de la tolérance au glucose, l'ASC mesurée chez les animaux du groupe H étant supérieure à celles mesurées dans les groupes NH, NN, NNI.

Chez les femelles, le fait d'avoir interchangé les mères (NN) ainsi que d'avoir eu une exposition à l'hyperoxie indirecte (NH) ou directe (H) a conduit à augmenter l'ASC de glucose en comparaison au groupe dont les mères n'ont pas été échangées (NNI).

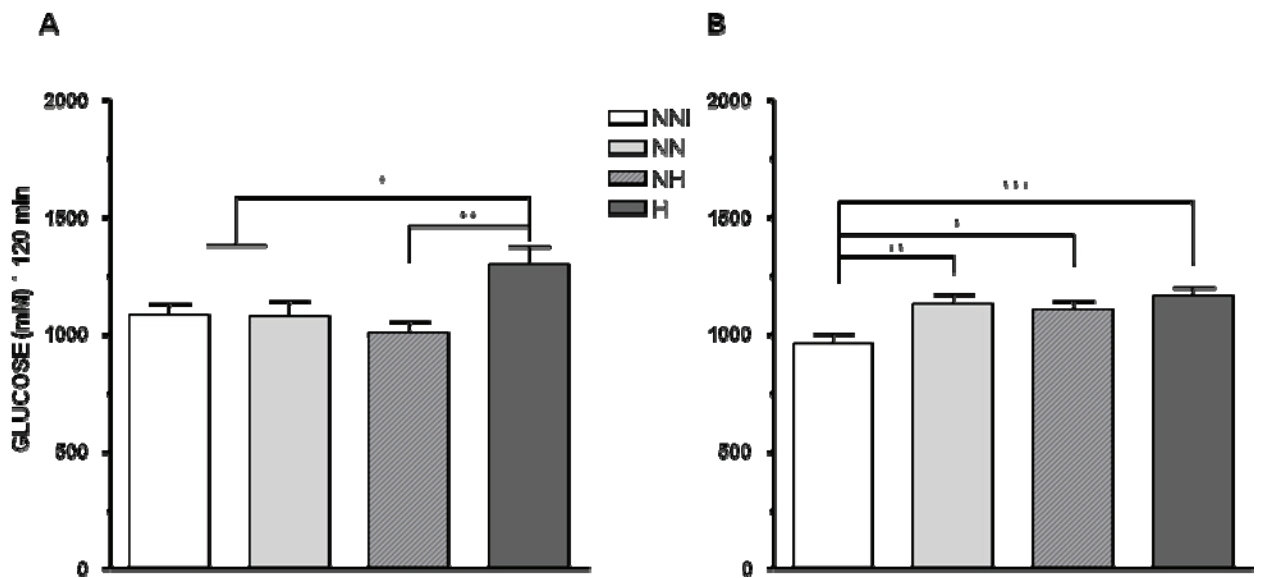


Figure 26 : Aire sous la courbe de l'excursion glycémique (ASC) après un test de tolérance au glucose faite chez les animaux mâles ($n = 9$) (A) et femelles ($n = 9$) (B) adultes; Pour les mâles, * $p < 0,05$ H vs NN et NNI; ** $p < 0,01$ H vs NH; Pour les femelles, * $p < 0,05$ NNI vs NH; ** $p < 0,01$ NNI vs NN; *** $p < 0,001$ NNI vs H, à la suite d'une analyse de variance (ANOVA) et les post-tests adéquats.

III - D-3-3 Paramètres plasmatiques lipidiques

Aucune différence significative n'a été observée dans les concentrations plasmatiques de cholestérol, triglycérides et NEFA entre les groupes NNI et NH (Tableau 8). L'analyse des données n'a pas non plus montré d'effet significatif du sexe.

Tableau 8 : Concentrations plasmatiques de paramètres lipidiques d'animaux mâles adultes.

| | NNI | H |
|---------------------------|-----------------|-----------------|
| Cholestérol (mM) | 1,07 ± 0,07 (6) | 0,89 ± 0,07 (6) |
| Triglycérides (mM) | 1,55 ± 0,27 (6) | 1,29 ± 0,62 (6) |
| NEFA (mM) | 0,81 ± 0,08 (6) | 0,65 ± 0,14 (6) |

NEFA : acides gras non estérifiés

III - D-3-4 Effets sur des paramètres de stress oxydant

- Évaluation de la peroxydation des lipides

Les concentrations plasmatiques de MDA ont été mesurées chez les mâles (Figure 27 A) et femelles (Figure 27 B) à l'âge adulte. Elles montrent que le fait d'avoir interchangé les mères entre le 3^{ème} et 10^{ème} jour de vie (groupe NN) n'a pas été associé avec des changements significatifs. Par contre, l'exposition à un environnement enrichi en oxygène soit directement à l'hyperoxie (groupe H), soit indirectement par la mère (groupe NH) (chez les mâles uniquement) a conduit à l'âge adulte, à une augmentation des niveaux de MDA en comparaison aux groupes non exposés à l'hyperoxie (NNI et NN). L'analyse des données a montré une différence de sexe uniquement dans le groupe NH (les mâles ont des niveaux de MDA plus élevés : 4049 ± 1279 µM vs 2452 ± 771 µM chez les femelles, p < 0,01).

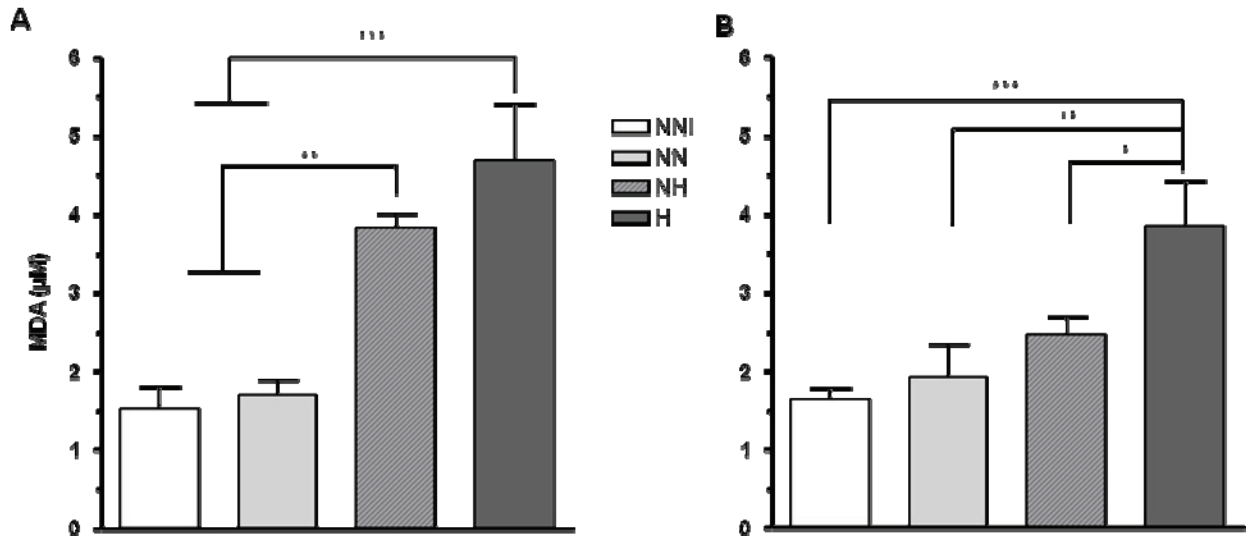


Figure 27 : Concentrations plasmatiques de malondialdéhyde (MDA) chez les mâles (A) et femelles (B) adultes (moyenne \pm SEM; $n=5$ à 6 rats/groupe); Chez les mâles (A) ** $p < 0,01$ NH vs NN et NNI; *** $p < 0,001$ H vs NN et NNI; Chez les femelles (B) * $p < 0,05$ H vs NH; ** $p < 0,01$ H vs NN; *** $p < 0,001$ H vs NNI à la suite d'une analyse de variance (ANOVA) et les post-tests adéquats en utilisant un test ANOVA.

- Evaluation du statut anti-oxydant circulant

Les concentrations érythrocytaires de glutathion oxydé et réduit ont été mesurées. La Figure 28 montre que dans le groupe H en comparaison avec le groupe NNI, le ratio GSSG/GSH (A) est significativement plus élevé; le calcul du potentiel redox (B) [672] a révélé un environnement plus oxydé à la suite d'un stress hyperoxique.

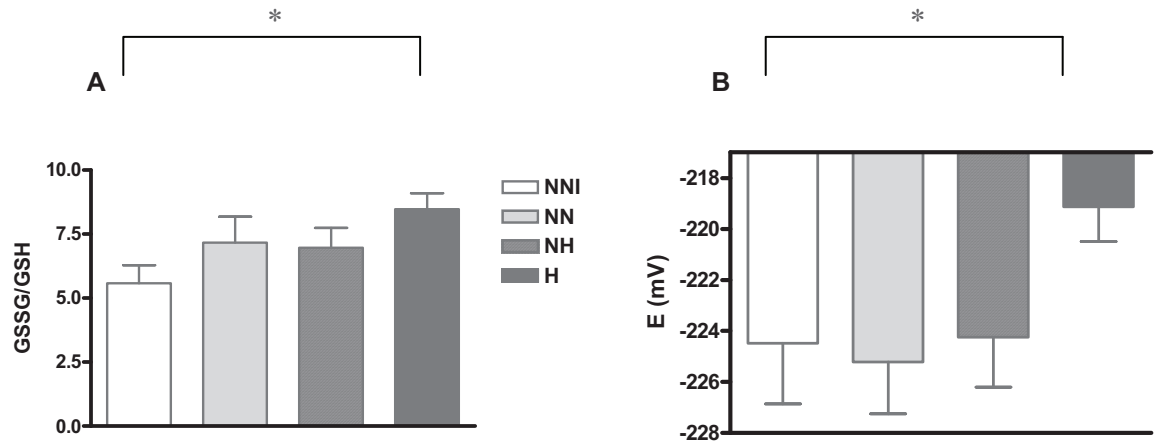


Figure 28 : Rapport glutathion oxydé/glutathion réduit (GSSG/GSH) (A) dans les érythrocytes de rats mâles adultes ayant été exposés à l'oxygène en période néonatale. * $p < 0,05$ H vs NNI en utilisant un test ANOVA. Le potentiel redox (E) érythrocytaire a été calculé (B), * $p < 0,01$ H vs NNI en utilisant un test ANOVA. Pas de différence entre NNI, NN et NH. (n = 6).

III - D-3-5 Expression d'Akt-1 et de GLUT-4

Afin d'investiguer un peu plus loin les mécanismes possiblement impliqués dans l'intolérance au glucose observée dans le groupe H, nous avons mesuré les expressions hépatiques d'Akt-1 et de GLUT-4 dans les différents groupes. Nous n'avons pas observé pas de différences significatives entre les groupes H et NNI aussi bien dans l'expression hépatique tant de Akt-1 (Figure 29) que de GLUT-4 (données non présentées).

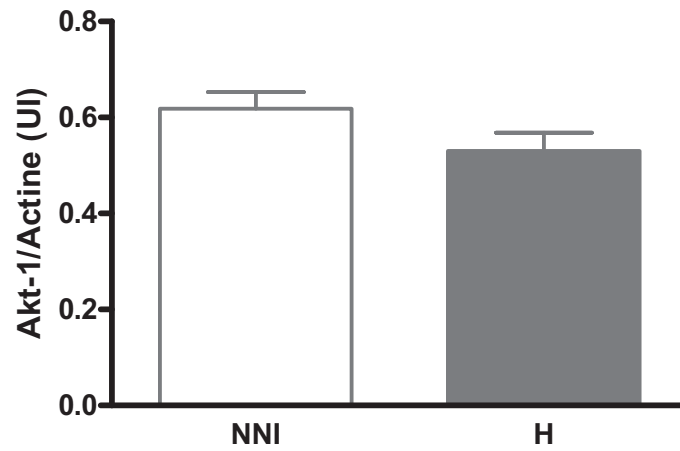


Figure 29 : Expression d'Akt-1 rapportée à la β -actine dans le foie de rats mâles adultes ($n = 6$) ayant été exposés à l'oxygène en période néonatale (H) et contrôle (NNI), déterminée par immunoblotting et quantifiée par Gel Pro Analyser 3.1 et après analyse statistique avec des tests t de Student non pairés.

IV - DISCUSSION

IV - A EFFETS D'UN STRESS OXYDANT NÉONATAL SUR LA FONCTION ET STRUCTURE CARDIOVASCULAIRE

IV - A-1 EFFETS D'UN STRESS OXYDANT NÉONATAL SUR LA PRESSION SANGUINE ET LE RYTHME CARDIAQUE

La pression sanguine a été mesurée chez nos animaux entre la 4^{ème} semaine et la 16^{ème} semaine de vie. Les méthodes de mesure de la pression sanguine peuvent être directes ou « invasives », et indirectes ou « non invasives ». Dans le laboratoire, nous avons utilisé une méthode de mesure directe dans le groupe LP par cannulation de l'artère fémorale, mais nous avons constaté un taux de mortalité excessif conséquence de la lourde chirurgie, des problèmes de cathéters (arrachage, bouchage). Par conséquent l'utilisation de cette technique a été abandonnée pour les études actuelles où la pression sanguine devait être mesurée sur plusieurs semaines. L'équipement requis pour une mesure de la pression artérielle par cathéter intra-aortique et télémétrie (considéré actuellement comme « gold standard ») n'était pas disponible au Centre de recherche du CHU Ste Justine. Nous avons donc privilégié l'utilisation d'une technique basée sur le principe du manchon caudal à la queue (tail-cuff method). Les rongeurs ont une queue thermorégulée, par conséquent les vaisseaux sanguins à ce niveau sont hautement réactifs. Cela permet l'enregistrement de la pulsation du flot sanguin et de la pression sanguine. L'entraînement des rongeurs à l'immobilisation dans la cage de contention, le positionnement de la queue, et le chauffage de la queue (27-30 °C) sont des paramètres à prendre en compte pour optimiser les résultats. De plus, cette méthode est peu coûteuse, simple d'utilisation et l'animal est conscient durant toute l'expérience. Il a été montré que les mesures de la pression sanguine

aussi bien à la queue que par l'utilisation d'un cathéter artériel étaient équivalentes à la fois chez le rat normotendus et hypertendus [347].

Nous avons observé chez les animaux ayant été exposés à une hyperoxie en période néonatale (groupe H) une élévation significative de la pression sanguine systolique et diastolique dans les deux sexes comparativement aux contrôles. Globalement, la pression sanguine pour tous les groupes expérimentaux est plus élevée tant chez les mâles que chez les femelles, ce qui est une observation tout à fait concordante avec la littérature. Les mécanismes sous-jacents à cette différence entre les sexes ne sont pas élucidés, l'implication des hormones sexuelles étant la voie la plus souvent évoquée (la testostérone comme stimulateur et les œstrogènes comme protecteurs de l'élévation de la pression sanguine, cf. introduction I - B-2-7).

Nous sommes conscients que l'immobilisation de l'animal et le chauffage de la queue peuvent générer un stress et par conséquent que notre groupe H serait plus susceptible au stress induit par cette méthode, se traduisant alors par une élévation de la pression sanguine. Cependant, les pressions ont été mesurées plusieurs fois par semaine (2 à 3 fois) toujours par la même personne et aucun effet d'habituation n'a été observé (pouvant alors se traduire par une diminution de la pression sanguine).

Chez l'animal, la classification de la pression sanguine n'est pas aussi clairement définie que chez l'homme (voir introduction chapitre I – A-2-3). Chez le rat SHR ainsi que chez le rat hypertendu à la suite de l'administration de sodium (Dahl salt sensitive), la pression artérielle systolique est aux alentours de 200 mm Hg en comparaison aux valeurs physiologiques observées chez le rat SD (aux alentours de 130 mm Hg) [539], on peut alors certainement parler d'hypertension. Quant aux valeurs que nous observons dans le groupe

H, je pense qu'il serait préférable de dire que nos animaux ont une élévation significative de la pression sanguine plutôt qu'une hypertension.

Nous avons aussi observé une augmentation significative du rythme cardiaque associée à l'élévation de la pression sanguine qui pourrait s'expliquer notamment par une désensibilisation des barorécepteurs. Cela est en accord avec la majorité des études qui ont montré que la sensibilité des barorécepteurs peut être diminuée avec l'hypertension [274]. Plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer les effets de l'angiotensine II sur le rythme cardiaque. Une activation des mécanismes sympathico-surréaliens, se traduisant par la relâche de catécholamines à partir de la médulla surrénalienne [219;714], par la stimulation des ganglions et des terminaisons nerveuses sympathiques [457], [865] [222]. Une élévation du rythme cardiaque est observée chez des individus avec petit poids à la naissance [600].

Nous avons voulu étudier si cette élévation de pression sanguine pouvait s'expliquer par des modifications dans les propriétés vasomotrices.

IV - A-2 EFFETS D'UN STRESS OXYDANT NÉONATAL SUR LA RÉACTIVITÉ VASCULAIRE

Ces expériences de réactivité vasculaire ont été réalisées sur les artères carotidiennes qui sont des artères de conduction, et non de résistance. Nous ne pouvons donc considérer que ces artères participent à la résistance systémique et à la pression sanguine. Mais il est admis maintenant que les larges conduits artériels peuvent jouer un rôle dans la pathophysiologie des maladies vasculaires hypertensives [660]. De plus, ces larges conduits ne sont pas considérés comme des conduits passifs, mais plus comme des conduits actifs en réponse à des substances telles que l'AngII [201] et ainsi servir de modèle expérimental. Par

conséquent nous pouvons envisager que les dysfonctions mentionnées par la suite seraient aussi présentes dans les vaisseaux de résistance.

IV - A-2-1 Réactivité à l'Angiotensine II

Nous avons observé que la vasocontraction en réponse à l'AngII était exagérée dans le groupe H pour les deux sexes. Cette vasocontraction exagérée semble être spécifique de l'AngII car nous n'avons pas observé de différences entre les différents groupes dans les réponses aussi bien à l'analogue du thromboxane A₂, le U46619, tel qu'observé dans d'autre forme d'hypertension artérielle chronique [339], qu'en réponse à la phényléphrine tel que décrit par Brawley *et coll.* [96]. Une réponse vasculaire exagérée à l'AngII a déjà été démontrée dans l'hypertension expérimentale. L'AngII augmente la réponse contractile chez le rat SHR comparé aux contrôles (WYK), et nous avons observé un phénomène similaire dans le modèle LP [855].

De plus, il est aussi intéressant de remarquer que chez les mâles uniquement, la sensibilité à l'AngII est augmentée pour tous les groupes dont la mère a été interchangée entre le 3^{ème} et 10^{ème} jour de vie (H, NH, NN) en comparaison au groupe CTRL (NNI). Cependant, avec la méthode utilisée, nous n'avons pas observé de différence dans la vasoconstriction maximale des vaisseaux étudiés (ni la pression artérielle) entre les groupes NH, NN et NNI.

L'AngII exerce ses actions par l'intermédiaire de deux récepteurs, AT1 et AT2. Nous n'avons pas démontré quel type de récepteur de l'AngII était impliqué dans cette vasocontraction exagérée. Mais, il est bien établi que les effets de l'AngII sur le tonus vasculaire se manifestent directement par une vasoconstriction à la suite de l'interaction avec le récepteur AT1 au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires. Dans le modèle LP nous avons démontré que le récepteur AT1 seulement était impliqué dans la

vasocontraction en réponse à l'AngII (l'utilisation du losartan 1 μ M a inhibé la vasocontraction) et que son expression était augmentée [855] après une privation anténatale en protéines.

IV - A-2-2 Réactivité endothélium dépendante et indépendante

Nous avons observé dans le groupe H, pour les deux sexes, un défaut de relaxation endothélium-dépendant en réponse au carbachol, un analogue de l'acétylcholine, mais pas en réponse au nitroprussiate de sodium, un nitrovasodilatateur (générateur de NO) [531]. Ces expériences suggèrent que la réponse des cellules musculaires lisses vasculaires au NO n'est pas altérée, mais qu'il existe un problème plus en amont : une diminution de la production (synthèse) de NO, avec ou sans une augmentation de la formation d'anions superoxyde [240], ou une réduction de la biodisponibilité en L-arginine (substrat) ou/et BH4 (cofacteur).

En plus du NO, il est bien documenté que la prostacycline (PGI_2) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) jouent un rôle important dans le contrôle du tonus vasculaire [60], et par conséquent pourraient également intervenir dans le défaut de relaxation observé dans le groupe H [524].

EDHF joue en effet un rôle important dans les artères humaines, notamment au niveau des microvaisseaux et un défaut d'effet vasodilatateur a été observé avec le vieillissement et l'hypercholestérolémie [772]. Au niveau des CMLV, il existe des récepteurs muscariniques, par conséquent il n'est pas à exclure que le carbachol conduise à une réponse vasomotrice via EDHF. Nous n'avons pas testé cette hypothèse dans ce modèle, mais dans le modèle LP nous avons démontré que la vasocontraction exagérée observée dans le groupe LP n'était pas une conséquence d'un défaut de libération des EDHF [855].

PGI₂ a été le premier vasorelaxant dérivé de l'endothélium découvert par Moncada et coll. en 1976 [584]. Comme les autres prostaglandines, PGI₂ est synthétisée à partir de l'acide arachidonique par de nombreuses étapes, notamment la cyclo-oxygénase qui conduit à la formation de prostaglandines H₂ (PGH₂) qui est par la suite transformée en PGI₂ [406].

De manière similaire au NO, PGI₂ diffuse facilement hors des cellules endothéliales où il inhibe la contraction et l'agrégation plaquettaire. À la différence du NO, les effets de PGI₂ s'exercent par sa liaison aux récepteurs membranaires qui activent l'adénylate cyclase dans les cellules cibles, résultant en une augmentation des niveaux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) qui activent la protéine kinase A, conduit à diminuer le calcium cytosolique, et provoque une hyperpolarisation en augmentant l'activité des canaux potassiques [584]. Dans la majorité des vaisseaux sanguins, la PGI₂ ne joue qu'un rôle mineur dans la relaxation endothélium-dépendante, son effet venant surtout s'ajouter à celui du NO [200]. Les peroxy-nitrites peuvent nitroser et inactiver la prostacycline synthase [770], limitant par conséquent son action vasodilatatrice. Le rôle potentiel de PGI₂ ne fut pas exploré dans la série d'études de ce doctorat.

IV - A-3 EFFETS D'UN STRESS OXYDANT NÉONATAL SUR LA PRODUCTION DE NO

Le NO est impliqué entre autres dans la régulation du tonus vasculaire, du flot régional périphérique et par conséquent est important dans le maintien de la pression sanguine [341]. Nous avons voulu savoir si l'observation dans le groupe H d'une dysfonction endothélium-dépendante en réponse au carbachol s'accompagnait de modifications dans la production de NO.

Plusieurs techniques sont décrites dans la littérature pour mesurer la production de NO [142;400;490;502;586;747;818]. Nous avons privilégié la technique rapportée par Kojima *et coll.* [397-399] qui ont développé le 4, 5-diaminofluorescein diacétate (DAF-2DA) très souvent utilisé, pour mesurer la production de NO aussi bien au niveau de cellules isolées [397] que de tissus hétérogènes [401;475].

DAF-2DA est perméable aux cellules, est clivé intracellulairement par des estérases en DAF-2 et la réaction avec le NO conduit à la formation d'un composé vert fluorescent le triazolofluorescéine (DAF-2T). La fluorescence augmente en fonction de la concentration en NO (Figure 19). Ce composé est uniquement généré à l'intérieur des cellules, par conséquent c'est un bon indicateur de la production intracellulaire de NO, mais ne peut être utilisé pour évaluer la production extracellulaire.

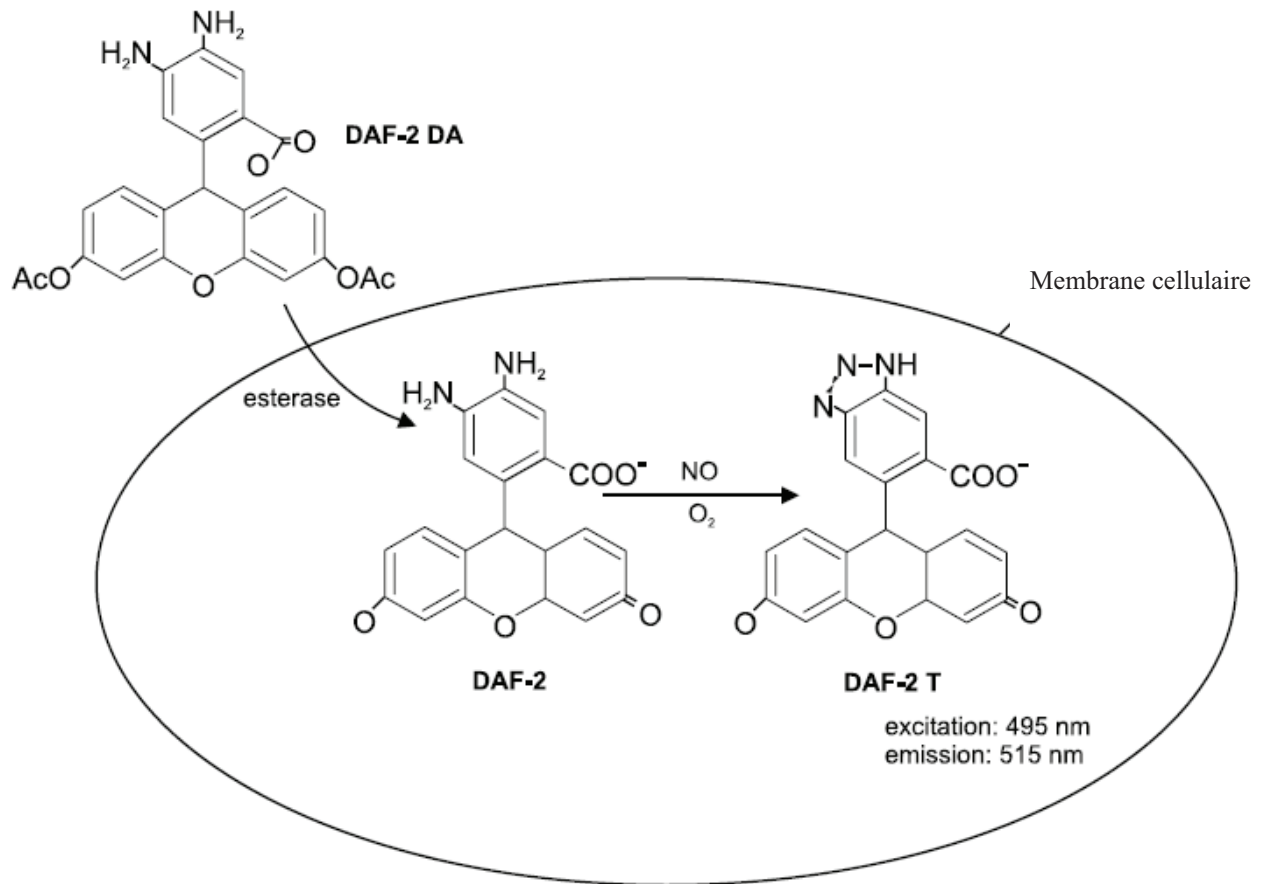


Figure 30 : Mécanisme d'action du 4, 5-diaminofluorescéine diacétate (DAF-2DA) adaptée de [397].

DAF-2T : triazolofluorescéine

Nous avons observé dans le groupe H, tant au niveau basal (sans stimulation) qu'après stimulation par le carbachol, que la production de NO était plus faible que dans le groupe CTRL. La préincubation avec la L-arginine de même qu'avec BH4 a normalisé le défaut de production de NO observé dans le groupe H à un niveau similaire au groupe CTRL, suggérant une déficience en L-arginine et BH4 dans ce groupe.

Concernant le déficit en L-arginine, il a été montré que de faibles niveaux en L-arginine peuvent contribuer au développement et au maintien de l'hypertension aussi bien qu'à la dysfonction endothéliale et aux dommages aux organes cibles [615]. Il existe un paradoxe vis-à-vis de la L-arginine. Il semble bien évident que la production endogène de NO soit

dépendante de la concentration extracellulaire d'arginine, et non de la concentration intracellulaire. Plusieurs mécanismes ont été envisagés pour expliquer ce phénomène. L'un des plus probables est la compartimentalisation de la L-arginine dans le cytoplasme. En effet, eNOS ainsi que le transporteur principal de la L-arginine, le transporteur cationique d'acides aminés-1, sont localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules endothéliales et par conséquent n'auraient pas vraiment accès au pool intracellulaire, alors que la forme extracellulaire peut rapidement avoir accès à ce transporteur [505].

Une supplémentation à long terme avec la L-arginine a permis chez des rats adultes ayant subi un RCIU, de prévenir le développement de l'hypertension et de la protéinurie [266], de restaurer le défaut de vasodilatation chez ces animaux [464]. Cette dernière observation fut aussi faite chez des individus hypertendus, diabétiques ou hypercholestérolémiques [165;307;606;650] et aussi a diminué l'hypertension et les dommages rénaux induits par l'AngII [622].

Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer les effets bénéfiques de la L-arginine sur l'hypertension. Elle prévient les dommages rénaux et améliore l'hypertension à la suite d'une infusion chronique d'AngII via l'inhibition de la production d'endothéline-1 [623]. Également, elle agit comme un ACEi chez l'homme [317], augmente l'excrétion urinaire de GMPc et des nitrates prévenant alors l'hypertension dépendante du sodium chez le rat [140;338]. La L-arginine possède aussi un rôle antioxydant. Elle diminue l'excrétion urinaire de H_2O_2 , du 8-iso-PGF 2α chez le rat sensible au sel, prévient la sur-régulation des sous-unité gp91^{phox} et p47^{phox} de la NADPH oxydase dans le cortex rénal [248], et réduit les espèces réactives de l'oxygène en amortissant leur relâche à partir des cellules endothéliales [807].

Concernant le déficit en BH4, une diminution dans sa concentration a été observée chez le rat diabétique [605], chez le rat SHR [330], chez le rat présentant une hypertension sensible au sel [415], chez le porc après blessure ischémique [749] ainsi que chez des patients diabétiques [321;688], chez les fumeurs [310;320], et chez des patients hypercholestérolémiques [725]. *In vitro*, la supplémentation de cellules humaines endothéliales aortiques par BH4 a permis le rétablissement d'une production de NO [410] qui avait été inhibée après une exposition à de fortes concentrations de glucose [157;663]. Ses mécanismes d'action ne sont pas clairement définis. Au niveau des NOS, BH4 permet au flot d'électrons de se diriger directement vers la L-arginine en maintenant le groupement hème dans une forme redox active [726;727;783]. Aussi, elle possède un rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydant depuis qu'il a été montré que les ptérines, dont fait partie BH4, possèdent des propriétés antioxydantes en scavengant les espèces réactives de l'oxygène [742]. En effet, BH4 a altéré la relâche d'anions superoxide chez le rat préhypertendu [159], et, chez le rat insulino-résistant, a prévenu le stress oxydant vasculaire [689], la peroxydation des lipides et l'activation des facteurs de transcription du facteur nucléaire kappa B (NFκB) et d'AP-1 [689]. La production endogène de BH4 peut être modulée par des facteurs « environnementaux » tel que l'acide folique. L'acide folique a renversé la dysfonction endothéliale observée aussi bien dans des modèles animaux de maladies cardiovasculaires que chez des patients présentant des facteurs de risques cardiovasculaires [781;789;836]. Les folates stabilisent BH4 en stimulant sa régénération à partir de BH2. Cela permet de recoupler eNOS, par conséquent d'augmenter la production de NO. Les folates auraient également un puissant pouvoir antioxydant en scavengant directement les anions superoxide produits par le non-couplage d'eNOS. Ils peuvent aussi interagir avec le site de liaison des ptérines d'eNOS, permettant ainsi d'augmenter la liaison de BH4 et de

faciliter le transfert d'électrons du domaine réductase au domaine catalytique [788]. La restauration de la fonction endothéliale à la suite d'une augmentation des niveaux intracellulaires de BH4 a été observée chez des patients présentant une hypercholestérolémie [789], un diabète de type II [781] ou une hyperhomocystéinémie [836]. Le métabolisme de l'acide folique n'a pas été étudié dans notre modèle expérimental.

Nous avons par la suite regardé si ce défaut de production de NO dans le groupe H s'accompagnait de modifications dans l'expression des NOS.

Nous avons obtenu des résultats apparemment contradictoires concernant l'expression d'eNOS. Lorsqu'évaluée par immunohistochimie, l'expression d'eNOS aortique est diminuée, tel qu'observé au niveau de l'aorte thoracique de rats spontanément hypertendus [167] ou dans la lumière de cellules athérosclérotiques associé avec un défaut de relâche de NO [556]. Lorsqu'évaluée par Western blot, nous avons observé une augmentation de l'expression d'eNOS.

Nous avons aussi regardé l'expression au niveau vasculaire des deux autres isoformes de NOS. Nous n'avons pas observé de différence dans l'expression aussi bien d'iNOS que d'nNOS au niveau de l'aorte entre nos groupes, indiquant que ces deux isoformes ne peuvent pas être impliquées dans le défaut de production de NO observée dans le groupe H. Franco *et coll.* ont aussi montré qu'il n'y avait pas de différence d'expression dans l'isoforme iNOS entre des individus hypertendus et des animaux CRTL dans un modèle de RCIU [240].

IV - A-4 PRÉSENCE D'UN STRESS OXYDANT

IV - A-4-1 Défenses antioxydantes

Nous devons considérer l'hypothèse qu'une exposition néonatale à un stress oxydant peut modifier de façon permanente les défenses antioxydantes. Dans les études de réactivité vasculaire *ex-vivo*, nous avons utilisé le tempol pour déterminer si une augmentation de la production d'anions superoxide pouvait être responsable de l'exagération de la réponse à l'AngII et du défaut de vasodilatation endothélium-dépendant en réponse au carbachol observés dans le groupe H. La co-incubation avec le tempol a normalisé ces dysfonctions au niveau du groupe CTRL et n'a eu aucun effet dans les autres groupes. Bien que nous n'ayons pas mesuré l'expression de la SOD, nous pouvons émettre l'hypothèse que la normalisation des dysfonctions après la co-incubation par le tempol pourrait suggérer aussi une diminution de l'activité et/ou de l'expression de la SOD dans le groupe H, par conséquent une augmentation de la concentration en anions superoxide car ils ne peuvent pas être dismutés en peroxyde d'hydrogène. Cette hypothèse est supportée par des études à la fois chez les animaux [445;626;731] et chez l'homme [319].

Par ailleurs le tempol peut aussi normaliser la pression artérielle en diminuant les niveaux d'anions superoxide dans le système vasculaire et le système nerveux sympathique [844], tel que démontré chez des rats infusés avec l'AngII [547] et chez le rat SHR [676].

IV - A-4-2 Mesure de la production d'anions superoxide

Les anions superoxide possèdent un nombre impair d'électrons, faisant des anions superoxide une molécule hautement réactive, instable, de durée de vie très courte et par

conséquent nous avons envisagé deux approches différentes pour les détecter dans les systèmes biologiques.

La chemiluminescence est la méthode la plus souvent décrite et relativement facile à mettre en œuvre. Pour cela, nous avons utilisé le bis-N methyl acridinium, plus connu sous le nom de lucigénine, et le dihydroéthidium.

IV - A-4-2-1 La lucigénine

La lucigénine a été utilisée pour détecter la production d'anions superoxide dans différentes formes d'hypertension artérielle : celles produites par l'infusion d'AngII [620], celles sensibles au sel [842], ou bien celles produites par cerclage aortique [91]. Li *et coll.* ont démontré que les fortes concentrations de lucigénine, jusqu'à 250 μM , pouvaient réagir avec de nombreuses enzymes contenant un groupement flavine pour conduire à une détection d'anions superoxide par chemiluminescence beaucoup trop élevée en comparaison à la détection obtenue par d'autres méthodes. Cependant en utilisant de faibles concentrations de lucigénine ($\leq 20 \mu\text{M}$) ce phénomène ne se produisait pratiquement pas [463]. Similairement, Münzel *et coll.* ont montré que de faibles concentrations de lucigénine ($< 5 \mu\text{M}$) permettaient d'avoir une évaluation précise du taux de production d'anions superoxyde à partir de segments vasculaires [530].

Par conséquent, en utilisant 5 μM de lucigénine nous avons montré dans les deux sexes, que la production aortique d'anions superoxide était augmentée et ce significativement après stimulation par l'AngII. Comme mentionné en introduction, il existe de nombreuses sources d'anions superoxide. Dans différents modèles d'hypertension et de diabète de type 2, les espèces réactives de l'oxygène sont produites principalement par le non-couplage

d'eNOS et la NADPH oxydase [793;819]. Cette dernière au niveau vasculaire (cellules endothéliales et CMLV) est la principale source d'anions superoxide [518;519;578;754]. Il est bien caractérisé que dans l'hypertension et le diabète de type 2, l'AngII stimule la NADPH oxydase conduisant alors à une augmentation de la production d'anions superoxide [281].

Nous avons utilisé l'apocynine, inhibiteur réversible de la NADPH oxydase tant au niveau vasculaire qu'au niveau des neutrophiles [723] qui prévient l'assemblage de la sous-unité p47^{phox} au niveau de la membrane [510]. L'apocynine a normalisé au niveau du groupe CTRL l'augmentation de la production d'anions superoxide observée dans le groupe H. Cependant, il reste à déterminer si l'activité ou l'expression de la NADPH oxydase sont augmentées.

Des résultats similaires ont été observés dans d'autres modèles d'hypertension artérielle chez le rongeur : dans le groupe LP [855], à la suite d'une restriction calorique durant la gestation [239], dans un modèle d'hypertension lié aux minéralocorticoïdes [78] ainsi que dans des formes d'hypertension dépendante de l'AngII [429;620].

Par conséquent, l'AngII en augmentant la production d'anions superoxide via la NADPH oxydase pourrait contribuer aux dysfonctions à l'AngII et au carbachol rencontrées dans le groupe H, comme démontré par Rajagopalan *et coll.* [620].

IV - A-4-2-2 Le dihydroéthidium

Le dihydroéthidium est un composé perméable aux cellules. En présence d'anions superoxide il peut par une oxydation à deux électrons former un composé rouge fluorescent, le bromure d'éthidium et être piégé intracellulairement en s'intercalant au niveau de l'ADN [72;127;651]. Ce composé a permis de détecter les ERO dans de

nombreux tissus [80;731]. Les anions superoxide extracellulaires ne semblent pas contribuer à la fluorescence observée. Et surtout, il a été montré que ni le NO, les peroxy-nitrites, l'hypochlorite ou l'oxygène singulet n'oxydent la dihydroéthidine [80]. Cela suggère par conséquent que la fluorescence du bromure d'éthidium traduit bien la présence d'anions superoxide produit intracellulairement.

Nous avons pu par cette technique confirmer l'augmentation de la production d'anions superoxide dans le groupe H en comparaison au groupe CTRL (la fluorescence est similaire avec les autres groupes NH, NN) dans les deux sexes.

IV - A-4-3 Mise en évidence du non-couplage d'eNOS

Une déficience en BH4 peut être le facteur clé dans le non-couplage d'eNOS (eNOS uncoupling) [381]. Une déplétion d'artères coronariennes de chien a conduit l'isoforme eNOS à produire des espèces réactives de l'oxygène [158] et à des altérations de la fonction endothéliale [156;390].

De nombreuses études ont mentionné que dans les cas d'un non-couplage d'eNOS, le rapport dimère/monomère était diminué [116;492;669;784].

En utilisant une électrophorèse à faible température (LT-PAGE), nous avons observé une augmentation du rapport dimère/monomère d'eNOS associée avec une augmentation de la forme dimérique ce qui est contraire à la majorité des études décrites ci dessus.

Cependant, il a été montré que des changements dans le rapport dimère/monomère ne sont pas directement reliés au eNOS uncoupling, parce que seule la forme dimérique est biochimiquement active et donc capable de générer soit du NO, soit des anions superoxide. Aussi, dans l'état non couplé, eNOS est sous forme dimérique [62;235].

Une des meilleures méthodes pour détecter un non couplage d'eNOS est de mesurer la production d'anions superoxyde à la suite de l'utilisation d'un inhibiteur d'eNOS. La pré-incubation avec le L-NAME (un inhibiteur non spécifique) [356], a normalisé l'élévation de la production d'anion superoxyde observée dans le groupe H au niveau du groupe CTRL, traduisant donc que dans notre modèle expérimental l'isoforme eNOS est non couplée et elle peut participer à la production d'anions superoxyde. Ces résultats sont en accord avec ce qui a été rapporté dans deux modèles d'hypertension [415;609].

IV - A-5 HYPEROXIE NÉONATALE ET ANOMALIES STRUCTURALES

IV - A-5-1 Remodelage vasculaire

Les artères sont 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, dont le coeur. Nous avons observé que la force tensionnelle de ces artères en réponse au chlorure de potassium (KCl) est similaire entre les groupes, par conséquent que le remodelage vasculaire ne semble pas participer aux dysfonctions vasculaires à l'AngII et au carbachol observées dans le groupe H.

IV - A-5-2 Raréfaction microvasculaire

La raréfaction microvasculaire (qui se définit comme une réduction des capillaires et artérioles) est souvent associée avec l'hypertension [90;464]. La raréfaction microvasculaire peut augmenter la résistance vasculaire périphérique [551] et est

généralement considérée comme une conséquence plutôt qu'une cause de l'hypertension [437].

Nous avons observé la présence d'une raréfaction microvasculaire au niveau d'un site majeur de résistance vasculaire périphérique (le muscle strié) dans le groupe H dès l'âge de 4 semaines de vie, alors que la pression sanguine n'est pas encore augmentée, suggérant par conséquent que la raréfaction microvasculaire précède l'élévation de la pression sanguine associée avec une hyperoxie néonatale. Des observations similaires ont été rapportées chez le rat spontanément hypertendu juvénile [438] et chez le jeune adulte présentant un risque élevé de développer une hypertension [550]. Également, nous avons montré dans le modèle LP la présence d'une raréfaction microvasculaire chez le rat nouveau-né (7 jours de vie) mais pas chez le rat fœtus (au dernier jour de gestation) [611]. Des enfants nés prématurés (qui n'avait pas eu de ROP en période néonatale), présentent à l'âge adulte une réduction de la vascularisation rétinienne [135]. Mitchell *et coll.* ont 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 [515].

Nous pouvons postuler que l'augmentation de la pression sanguine pourrait résulter du moins en partie d'un mécanisme d'adaptation permettant le recrutement de capillaires permettant ainsi une perfusion adéquate des tissus périphériques [277].

IV - A-5-3 Diminution du nombre de néphrons

Nous avons observé une diminution du nombre de néphrons dans le groupe H, suggérant une altération dans la formation de néphrons à la suite d'une insulte oxydante néonatale. Ces données ont été le point de départ d'un étudiant à la maîtrise qui s'est attaché à explorer les mécanismes sous-jacents à cette diminution du nombre de néphrons et un article sera soumis sous peu. Je ne discuterai pas donc de cette observation car ceci ne fait pas partie des objectifs de mes études doctorales et représente un champ d'expertise tout autre.

Dans le groupe LP, nous n'avions pas observé de différence dans le nombre de néphrons, mais la technique de comptage de néphrons utilisée était différente et moins fiable (dans le groupe LP, la coloration Harris-Hématoxyline et éosine comme décrite par Zeman *et coll.* [860] que celle utilisée pour les études de ce doctorat, soit une digestion acide [28]).

IV - A-5-4 Rigidité artérielle

La mesure de la vitesse de l'onde pulsée est un bon élément prédictif de mortalité cardiovasculaire chez des patients hypertendus [507]. La mesure de la vitesse d'onde pulsée est une méthode simple, non invasive et reproductible pour déterminer la rigidité artérielle [34]. Nous avons observé une augmentation de la VOP mesurée entre la valve aortique et juste avant la bifurcation ilio-fémorale) dans le groupe H dans les deux sexes, traduisant une rigidité artérielle plus importante dans ce groupe. Ces données sont en accord avec ce qui a été observé chez l'homme où une corrélation a été montrée entre les faibles poids de naissance, les naissances prématurées et l'augmentation de la rigidité artérielle aussi bien chez les enfants, adolescents et adultes [744].

Également, il a été montré une augmentation de la résistance vasculaire après une hyperoxie [804]. Cette élévation de la vitesse d'onde pulsée pourrait être la conséquence d'un défaut de production de NO. Il semble qu'une diminution de la biodisponibilité du NO augmente la rigidité artérielle, en effet une corrélation existe entre la dysfonction endothéliale et l'augmentation de la VOP [824], concordant ainsi avec nos données.

IV- B ONTOGENÈSE DES PHÉNOMÈNES DÉCRITS

IV - B-1 ONTOGENÈSE DE L'ÉLEVATION DE LA PRESSION SANGUINE ET DE LA DYSFONCTION VASCULAIRE

Nous avons mesuré la pression sanguine et regardé la réactivité vasculaire à l'AngII et au carbachol à l'âge de 4 semaines. Chez le rat SHR, l'âge de 4 semaines est déjà considéré comme un état préhypertenseur [40]. À cet âge, alors que la raréfaction est déjà présente, nous n'avons pas observé de différence dans la pression sanguine entre les groupes. Nous avons voulu regarder si les dysfonctions à l'AngII et au carbachol étaient déjà présentes à cet âge. Nous n'avons pas observé de différence entre les groupes. Des données similaires ont été observées chez le rat SHR : à 4 semaines de vie, la vasocontraction en réponse à un autre vasoconstricteur, le 5-hydroxytryptamine (5-HT), était similaire au groupe CTRL (Wistar) [107]. Par conséquent, les dysfonctions vasculaires à l'AngII et au carbachol ne précèdent par l'élévation de la pression sanguine dans notre modèle expérimental.

IV - B-2 ONTOGENÈSE DU STRESS OXYDANT

Il est bien établi que l'hypertension est associée avec l'augmentation du stress oxydant vasculaire. Cependant si le stress oxydant est une cause ou la conséquence de

l'hypertension, cela n'est pas clairement défini [284]. Quelques évidences suggèrent que l'augmentation de la production d'anions superoxide pourrait être une cause de l'hypertension plutôt qu'une conséquence [173].

Nous avons évalué la production d'anions superoxide par l'utilisation du dihydroéthidium sur des section d'aortes de 4 semaines et nous n'avons pas observé de différence entre les groupes suggérant que l'augmentation du stress oxydant au niveau aortique n'est pas encore présente à cet âge. Un résultat similaire a été montré par Budzyn *et coll.* [107].

Il est bien documenté que l'AngII augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène présents dans les vaisseaux d'animaux hypertendus [415;854;857], comme nous n'observons pas de différence dans la vasoréactivité à l'AngII à l'âge de 4 semaines, il n'est pas surprenant de ne pas observer d'augmentation dans la production d'anions superoxide à cet âge.

IV - B-3 STRUCTURE VASCULAIRE À 4 SEMAINES

Les fibres d'élastine et de collagène participent aux propriétés mécaniques des vaisseaux sanguins respectivement à pression faible-moderée et à pression plus élevée [77;697]. Les propriétés élastiques de l'aorte sont dépendantes de la présence de l'élastine dans le mur artériel. Le collagène est 100 fois plus rigide que l'élastine, par conséquent une perte d'élastine s'accompagne d'une réduction de la compliance vasculaire conduisant à une augmentation de la pression pulsée. Nous avons observé une augmentation de la densité des fibres de collagène et une diminution de la densité des fibres d'élastine, traduisant une rigidité artérielle plus importante dans le groupe H dès 4 semaines de vie. Cela pourrait expliquer l'élévation à la fois de la VOP et de la pression sanguine observée dans ce même groupe à l'âge adulte.

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 oxygène chez qui il a été trouvé une augmentation de la synthèse du collagène de type I et une diminution du dépôt d'élastine [136;474]. Nous pouvons aussi envisager que la fragmentation du réseau de fibres élastiques sans changements dans la pression artérielle peut conduire à une distension du mur artériel et à un recrutement précoce des fibres de collagène. Également lors du vieillissement, l'aorte développe une fragmentation et une dégénérescence de l'élastine, ainsi qu'une augmentation du contenu en collagène avec comme conséquence une perte d'élasticité et une augmentation de la rigidité [674]. D'un point de vue clinique, l'altération dans les propriétés viscoélastiques à la suite d'un défaut d'élastine pourrait expliquer la réduction de la compliance aortique observée chez les enfants prématurés. Ligi *et coll.* ont observé une corrélation entre l'âge gestationnel et le contenu en élastine. Ce contenu en élastine est diminué dans les artères du cordon ombilical chez des enfants prématurés ou nés petits pour l'âge gestationnel [464] associé avec une augmentation de la rigidité artérielle [110].

IV - B-4 REMODELAGE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

Pour expliquer la dégradation des fibres d'élastine et l'augmentation de la densité des fibres de collagène, nous avons étudié le remodelage de la matrice extracellulaire par les métalloprotéinases (MMPs). Il est bien établi que dans l'hypertension le stress oxydant favorise la prolifération et l'hypertrophie des CMLV, le dépôt de collagène et des altérations dans l'activité des MMPs, conduisant à un épaississement de la média et à un remodelage vasculaire tel qu'observé dans de nombreuses maladies cardiovasculaires dont l'hypertension [93;225;251;811]. De plus, des études cliniques et expérimentales ont

mentionné une augmentation de l'expression et de l'activité des MMPs, notamment des MMP-2 (72-kDa gélatinase A) et MMP-9 (92- kDa gélatinase B) dans le plasma et tissu vasculaire d'individus hypertendus [850]. Les MMP-2 et MMP-9 dégradent l'élastine [681]. Nous n'avons pas observé de modification aussi bien dans l'activité que l'expression des MMP-2 et -9, ni dans l'expression de leurs inhibiteurs tissulaires, les TIMPs, traduisant que dans notre modèle, la dégradation de l'élastine ne peut s'expliquer par une augmentation de l'activité et expression des MMPs.

IV - C EFFETS MÉTABOLIQUE D'UN STRESS OXYDANT NÉONATAL

La dernière partie de ce projet s'est intéressé à l'étude des conséquences métaboliques associées au traitement hyperoxique. Les maladies cardiovasculaires, identifiées comme principales complications de l'obésité, du diabète de type 2 et du syndrome métabolique ont un impact de plus en plus préoccupant sur la santé publique [285]. Leur origine fœtale/postnatale est un champ de recherche actuellement en pleine expansion. Nous avons montré que le stress oxydant était impliqué dans le développement de l'hypertension et des dysfonctions vasculaires observées chez le rat adulte à la suite d'un stress oxydant néonatal [854] et qu'il pourrait également être impliqué dans la résistance à l'insuline, une des figures du diabète de type 2 et du syndrome métabolique.

IV - C-1 EFFETS SUR LA CROISSANCE ET LA COMPOSITION CORPORELLE

Les enfants avec un surplus de poids durant l'enfance seront plus enclins à développer une obésité par la suite [42], notamment s'ils étaient petits à la naissance et ont présenté un phénomène de rattrapage rapide de croissance [813]. Barker *et coll.* ont proposé que la

taille du fœtus et de l'enfant soit des déterminants de la santé à l'âge adulte [46;47]. A l'opposé, une diminution de la croissance après le sevrage a été observée chez des enfants dont la mère avait consommé de l'alcool durant sa grossesse [559] ou à la suite d'une infusion d'AngII chez le rat [558]. Une insulïnémie à jeun élevée a été rapportée chez des nourrissons nés avec un petit poids de naissance et ayant présenté un rattrapage staturo-pondéral en comparaison à ceux avec petit poids de naissance, mais sans rattrapage pondéral [707]. L'analyse de l'évolution pondérale dans nos différents groupes d'animaux montre que l'application d'un stress (hyperoxie, changement de mère entre le 3^{ème} et 10^{ème} jour de vie) conduit à une diminution de la courbe de la croissance suivie d'un phénomène de rattrapage puisqu'à l'âge adulte (25 semaines), il n'y a plus de différences. Il est par conséquent, possible d'envisager que ces animaux soumis à un stress hyperoxique néonatal, soient susceptibles de développer des maladies chroniques cardiovasculaires et métaboliques à l'âge adulte.

Par ailleurs, des modifications de composition corporelle ont été proposées pour expliquer les différences observées dans la sensibilité à l'insuline [562]. Dans notre modèle, en amont de la composition corporelle aucun changement n'a été observé dans la prise de nourriture ni dans les niveaux de leptine circulant, une hormone importante dans la régulation de l'homéostasie de la prise alimentaire et de la dépense énergétique [82;790;849]. Ceci est conforté par l'absence de modifications dans les paramètres de composition corporelle mesurés. Par conséquent, ces éléments ne peuvent expliquer les différences de poids observées à l'âge de 15 semaines. Cependant, des mesures de l'évolution des niveaux de leptine plasmatique entre le jeûne et la réponse post-prandiale pourraient nous permettre d'avoir une image plus précise de son rôle dans notre modèle.

IV - C-2 EFFETS SUR LA TOLÉRANCE AU GLUCOSE ET LES PARAMÈTRES LIPIDIQUES

Des études animales ont montré qu'un rattrapage de croissance peut être associé à une augmentation de l'adiposité, à un défaut de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline [303]. De plus, il est maintenant bien établi que le stress oxydant est associé avec la résistance à l'insuline [29]. L'évaluation de la sensibilité à l'insuline des animaux a été réalisée par la mesure de la réponse à la charge intrapéritonéale de glucose. L'excursion glycémique a été évaluée. Même si aucun changement significatif n'est observé, la glycémie à jeun dans le groupe H est augmentée de 142 % lorsque comparée à la valeur du groupe NH. Ceci suggère un léger état de résistance à l'insuline à jeun qui est confirmé par la valeur de l'index HOMA (+167 %). Ce paramètre est reconnu un bon reflet de la résistance de l'organisme aux effets de l'insuline [87]. L'élévation de l'ASC observée dans le groupe H en comparaison aux autres groupes traduit, en cohérence avec le HOMA, un défaut de tolérance au glucose dans ce groupe. Cependant, il est à noter que l'importance de la réponse à l'insuline n'a pas pu être évaluée du fait de l'absence d'échantillons au cours du temps de l'IPGTT. Il a été montré que des enfants prématurés devenus adultes qui présentent une élévation de la pression artérielle systolique ainsi que, en conditions postprandiales, des concentrations plasmatiques élevées de glucose mais aussi d'insuline, arborent également des niveaux plasmatiques élevés de cholestérol total et de triglycérides [336]. Les NEFA, constituants majeurs des triglycérides au niveau du tissu adipeux, du foie et du muscle, sont impliqués directement dans la pathogenèse des désordres métaboliques qui peuvent conduire à une résistance à l'insuline et au syndrome métabolique [719]. Dans notre modèle, aucune différence significative n'a été mise en évidence. Ceci suggère donc que les animaux du groupe H sont sur la voie de l'insulino-résistance et d'un état pré-

diabétique qui n'est pas encore associé à des modifications du profil lipidique plasmatique. Le stress associé au changement de mère n'a pas d'effet significatif sur ces paramètres, montrant la spécificité de la toxicité de l'exposition à l'oxygène.

IV - C-3 EFFETS SUR L'ÉTAT RÉDOX ET LES CAPACITÉS ANTI-OXYDANTES

L'hyperglycémie est connue pour induire un stress oxydant en partie par la génération de radicaux libres [264;810]. Chez des patients présentant des anomalies du métabolisme glucidique, l'hyperglycémie augmente directement la production de radicaux libres et l'hyperinsulinémie diminue la fonction endothéliale par une augmentation du stress oxydant à la suite d'une activation de la NADPH oxydase [88;859]. Ainsi, nos données montrent clairement chez les animaux ayant subi une hyperoxie post-natale, d'une part un défaut de production de NO dans le groupe H tant au niveau basal qu'après stimulation par le carbachol, d'autre part une augmentation de différents marqueurs du stress oxydant tant au niveau vasculaire qu'au niveau circulant avec les concentrations de MDA. Il est intéressant de noter que celles-ci sont liées à des changements significatifs dans le potentiel redox érythrocytaire devenant plus oxydé. L'insulte oxydante néonatale et ses conséquences multiples ne peuvent donc, à l'âge adulte, être complètement compensées par le principal antioxydant intracellulaire, le glutathion.

IV - C-4 EFFETS SUR LA CASCADE DE SIGNALISATION DE L'INSULINE

Le muscle et le tissu adipeux sont des tissus essentiels dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline. Dans ces tissus cibles, notamment au niveau du muscle squelettique, l'insuline favorise l'entrée du glucose au travers de la translocation vers la membrane plasmique du

transporteur de glucose, GLUT-4 [287]. Des données ont montré que la PI3 kinase active Akt/PKB, une kinase sérine/thréonine impliquée dans la translocation de GLUT-4 induite par l'insuline [395]. Des défauts dans la cascade du signal conduisant à la translocation de GLUT-4 et à l'entrée de glucose peuvent jouer un rôle clé dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline musculaire [255;692]. De plus, des études *in vitro* ont mis en évidence qu'Akt peut contribuer à la translocation de GLUT-4 induite par l'insuline [741]. Par ailleurs, une augmentation de la concentration des acides gras libres intracellulaires peut réduire la translocation de GLUT-4 au niveau de la membrane plasmique conduisant alors à une résistance aux effets de l'insuline dans l'utilisation du glucose au niveau du muscle et du tissu adipeux [656;736]. Nos résultats ne montrent pas de différences significatives aussi bien dans l'expression de GLUT-4 au niveau du foie et du muscle que d'Akt au niveau hépatique. Ceci traduit que dans les conditions analysées, ces voies de signalisation ne sont pas significativement altérées mais des études complémentaires (différents états nutritionnels) sont nécessaires pour confirmer ces observations.

V - CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette thèse a permis de montrer les conséquences à long terme d'une exposition à un stress oxydant néonatal sur des paramètres vasculaires et métaboliques.

Concernant les paramètres vasculaires, à l'âge adulte, nous avons observé à la suite d'une exposition à une hyperoxie néonatale une élévation de la pression sanguine systolique et diastolique associée à une altération de la réactivité vasculaire aussi bien à l'AngII qu'au carbachol. Ces dysfonctions sont abolies par le tempol, suggérant une production accrue d'anions superoxide. Ceci a été effectivement retrouvé et de plus nos études ont démontré qu'elle est induite par la NADPH oxydase et le non couplage d'eNOS. La dysfonction endothéliale dépendante observée peut être expliquée par un défaut de production de NO aussi bien au niveau basal qu'après stimulation par le carbachol, associée à un déficit en L-arginine et L sépiaptérine, puisque la supplémentation par le substrat et le cofacteur, respectivement, a permis de restaurer la production de NO. Nous avons aussi observé une modification de certains paramètres structuraux, une augmentation de la VOP, une diminution du nombre de néphrons, et dès l'âge de 4 semaines la présence d'une raréfaction microvasculaire qui précède l'élévation de la pression sanguine. Aussi à cet âge, il n'y a pas de dysfonctions vasculaires ni à l'AngII ni au carbachol, le stress oxydant n'est pas présent, mais le rapport élastine/collagène est diminué, traduisant une augmentation de la rigidité artérielle qui pourrait participer à l'élévation de la VOP et de la pression sanguine à l'âge adulte.

Concernant les paramètres métaboliques, une exposition à un stress oxydant néonatal a conduit à une diminution du poids au cours de la croissance, suivie d'un catch up de croissance à l'âge adulte. À cet âge, une augmentation du stress oxydant circulant a été observée. La mesure de la tolérance au glucose a montré une tendance au développement

d'une insulino résistance pour le moment sans perturbation du profil lipidique ni dans les voies de signalisation de l'insuline.

Ce doctorat a ouvert la porte aux perspectives suivantes :

Déterminer à quel moment le stress oxydant apparaît au cours du développement de l'hypertension

Des expériences d'étude de marqueurs de stress oxydant vasculaire et circulant devraient être réalisées à différent temps après l'exposition néonatale à l'hyperoxie afin de déterminer si le stress oxydant est primaire ou secondaire à l'élévation de la pression sanguine et les dysfonctions vasculaires, et ainsi pourrait y contribuer plutôt qu'en être la conséquence.

Explorer la rigidité artérielle

- Mesure des produits finaux de la glycation

La diminution de l'élasticité du système cardiovasculaire est un processus normal de l'avancée en âge. Cette diminution d'élasticité se traduit par une accumulation graduelle de collagène vasculaire interstitiel, des cross-link de glucose se développent ainsi que la formation de AGEs se produit entre les protéines ayant une longue $\frac{1}{2}$ vie (collagène et glucides). Dans les vaisseaux, la formation de ces AGEs favorise la dysfonction endothéliale [738], la rigidité vasculaire [33;378;392;835] et les niveaux sont augmentés dans le sang et les tissus de sujets diabétiques à la suite d'une hyperglycémie [154]. Nous devrions mesurer les niveaux de méthylglyoxal (MG), précurseur des AGEs, un dicarbonyl hautement réactif, issu de la glycolyse anaérobie. Des niveaux élevés de MG pourraient également jouer un rôle important dans l'hypertension. Avec l'avancée en âge, une

augmentation de la formation des AGEs (traduit par une augmentation progressive au niveau aortique des niveaux de MG) a en effet été mentionnée chez le rat SHR [517] associée avec une élévation de la pression sanguine [803]. Également, il a été mentionné que MG pouvait perturber l'interaction des cellules endothéliales avec la matrice extracellulaire en réagissant avec les résidus arginine du collagène IV à l'intérieur d'une courte région de collagène contenant RGD (Arg-Gly-Asp) [588], ce qui favorise l'adhésion des cellules au collagène de type IV. Nous pourrions détecter ces AGEs par l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-AGEs qui ont été utilisés pour reconnaître *N* (epsilon)-carboxyméthyl lysine (CML) et avec *N* (epsilon)-carboxyéthyl lysine (CEL). Ce dernier est un bon indicateur des AGEs induits par MG ou par les produits de la glycosylation [537]. Concernant la localisation, un immunomarquage pour CEL et CML a été observé au niveau de l'endothélium, très faible dans les cellules musculaires de l'aorte.

- Peptides de synthèse et de dégradation du collagène

Il est bien admis que des changements dans la rigidité artérielle peuvent être provoqués par une augmentation des protéines fibreuses de collagène. De nombreux types de collagène sont trouvés dans le mur vasculaire (I, III, IV, V, VI, VIII, XII, XIV), mais plus de 90 % du collagène est constitué de collagène I (60 %) et III (30 %) [355]. Chez le rat, le collagène I est plus prévalent dans l'aorte au niveau de l'adventice, le collagène III quant à lui est retrouvé à la fois dans la média et l'adventice. Ces deux types de collagène sont responsables de l'étirement tensionnel et de la rigidité du mur vasculaire.

Il a été proposé qu'une augmentation du contenu en collagène pouvait résulter à la fois d'une altération dans les peptides de synthèse ou de dégradation du collagène [814]. Les

collagènes I et III sont synthétisés sous forme de procollagène avec une petite extrémité -NH₂ terminale, et un propeptide -COOH [355].

Le propeptide carboxyterminal du procollagène I (PIPC) est un peptide dérivé de la synthèse de collagène, et semble être un bon marqueur pour déterminer la synthèse de collagène et la fibrose myocardique dans l'hypertension [473].

Il existe un peptide (12 kDa) de dégradation du collagène (CITP) qui est retrouvé intact dans la circulation et de nombreuses études ont montré que la concentration sérique de CITP corrèle avec l'intensité de dégradation des fibrilles de collagène de type I [37;212]. Les niveaux sériques de CITP ont notamment été étudiés chez le rat SHR adulte avec hypertrophie du ventricule gauche et fibrose myocardique [191].

Des concentrations sériques importantes de PIPC sont retrouvées chez des patients avec hypertension essentielle et chez le rat SHR [190;191] suggérant par conséquent une augmentation de la synthèse de collagène de type I.

- Évaluation de la structure et fonction vasculaire chez l'enfant prématuré en comparaison à l'enfant à terme

Nous proposons de mesurer les marqueurs de la synthèse et dégradation du collagène (évoqués précédemment) à la naissance chez des enfants nés avant la 30^{ème} semaine de grossesse, et chez des enfants nés à terme, puis à l'âge d'un an. Nous mesurerons aussi les niveaux plasmatiques de MMP-1 et TIMP-1 aussi bien que des marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation: VCAM-1, les niveaux de MDA, et les niveaux urinaires du 8-iso-PGF₂α. À l'âge d'un an, la pression sanguine, la vitesse de l'onde de pouls et

l'épaisseur carotidienne intima-média seront mesurées par radiologie et corrélées avec les marqueurs biochimiques à cet âge.

Augmentation des risques de développement du diabète de type 2 et longévité

Un des aspects qu'il pourrait être intéressant de poursuivre dans le cadre de ce projet réside dans la potentielle susceptibilité des animaux ayant subi un stress hyperoxique néonatal, de développer un diabète de type 2 ou un syndrome métabolique. Nos résultats suggèrent en effet qu'ils se trouvent à l'âge adulte dans un état métabolique pré-diabétique. Si l'on tente une extrapolation de ce modèle à une situation chez l'homme, il est possible d'envisager que ces adultes ayant subi une atteinte oxydante post-natale, présentent une dysfonction vasculaire, sans éventuel surpoids et soient dans un état pré-diabétique silencieux. Un déséquilibre alimentaire plus ou moins prolongé pourrait précipiter le développement d'un diabète de type 2 avec ses conséquences. Il pourrait donc être intéressant, dans la continuité de ce travail, de tester cette hypothèse dans notre modèle avec des animaux ayant subi un stress hyperoxique néonatal et soumis à l'âge adulte, à un stress métabolique plus ou moins intense/long. La transition métabolique pourrait être induite avec un régime de type Western, riche en acides gras saturés et/ou sucres simples qui pourrait participer au développement d'une résistance à l'insuline [121;690;780] et/ou d'un diabète de type 2 dont nous pourrions suivre la cinétique d'apparition. Un régime riche en fructose favorisant également une hypertriglycémie, une intolérance au glucose et une insulino-résistance dans les adipocytes pourrait également être utilisé [567]. Cependant cette approche semble plus éloignée de conditions nutritionnelles rencontrées chez l'homme.

Enfin, les résultats obtenus dans le cadre de ce travail suggèrent un vieillissement précoce des animaux ayant été exposés au stress hyperoxique. Le vieillissement est en effet

caractérisé par une accumulation de dommages reliés au stress oxydant et des données de la littérature suggèrent un vieillissement précoce dans des modèles de programmation de l'hypertension (induite par une restriction totale ou partielle en protéines durant la gestation) [506]. De plus, un phénomène de rattrapage de croissance ayant été également associé avec une diminution de l'espérance de vie [138]. L'impact d'une hyperoxie néonatale sur le vieillissement vasculaire pourrait être le sujet d'études importantes pour les populations d'individus à risque.

Ce travail montre donc qu'il existe une série d'avenues à explorer pour mieux comprendre les conséquences du stress néonatal et les mécanismes associés à la programmation fœtale des maladies cardiovasculaires de l'adulte afin de pouvoir développer des approches de prévention plus efficaces.

VI - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. (1998) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* **352**, 837-853.
2. (2001) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* **285**, 2486-2497.
3. World Health Organization. Iron deficiency anaemia. assessment, prevention and control. 2001. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
4. (2003) Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *JAMA* **289**, 2560-2571.
5. (2003) The World Health report 2002. Midwifery **19**, 72-73.
6. Aaltonen,J., Ojala,T., Laitinen,K., Poussa,T., Ozanne,S. and Isolauri,E. (2010) Impact of maternal diet during pregnancy and breastfeeding on infant metabolic programming: a prospective randomized controlled study. *Eur.J Clin Nutr.*
7. Abdel-Hakeem,A.K., Henry,T.Q., Magee,T.R. et al. (2008) Mechanisms of impaired nephrogenesis with fetal growth restriction: altered renal transcription and growth factor expression. *Am.J Obstet Gynecol* **199**, 252-257.
8. Abe,J., Takahashi,M., Ishida,M., Lee,J.D. and Berk,B.C. (1997) c-Src is required for oxidative stress-mediated activation of big mitogen-activated protein kinase 1. *J Biol.Chem.* **272**, 20389-20394.
9. Adaikalakoteswari,A., Balasubramanyam,M. and Mohan,V. (2005) Telomere shortening occurs in Asian Indian Type 2 diabetic patients. *Diabet.Med* **22**, 1151-1156.
10. Adaikalakoteswari,A., Balasubramanyam,M., Ravikumar,R., Deepa,R. and Mohan,V. (2007) Association of telomere shortening with impaired glucose tolerance and diabetic macroangiopathy. *Atherosclerosis* **195**, 83-89.
11. Aghajafari,F., Murphy,K., Willan,A. et al. (2001) Multiple courses of antenatal corticosteroids: a systematic review and meta-analysis. *Am.J Obstet Gynecol* **185**, 1073-1080.
12. Ago,T., Kitazono,T., Ooboshi,H. et al. (2004) Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* **109**, 227-233.

13. Agostoni,C., Grandi,F., Gianni,M.L. et al. (1999) Growth patterns of breast fed and formula fed infants in the first 12 months of life: an Italian study. *Arch.Dis.Child* **81**, 395-399.
14. Aguilera,G., Kiss,A. and Luo,X. (1995) Increased expression of type 1 angiotensin II receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus following stress and glucocorticoid administration. *J Neuroendocrinol.* **7**, 775-783.
15. Aguirre,V., Werner,E.D., Giraud,J., Lee,Y.H., Shoelson,S.E. and White,M.F. (2002) Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol.Chem.* **277**, 1531-1537.
16. Akasaki,T., Ohya,Y., Kuroda,J. et al. (2006) Increased expression of gp91phox homologues of NAD(P)H oxidase in the aortic media during chronic hypertension: involvement of the renin-angiotensin system. *Hypertens.Res* **29**, 813-820.
17. Alberti,K.G. and Zimmet,P.Z. (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet.Med* **15**, 539-553.
18. Alderton,W.K., Cooper,C.E. and Knowles,R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem.J.* **357**, 593-615.
19. Aldini,G., le-Donne,I., Vistoli,G., Maffei,F.R. and Carini,M. (2005) Covalent modification of actin by 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE): LC-ESI-MS/MS evidence for Cys374 Michael adduction. *J Mass Spectrom.* **40**, 946-954.
20. Alexander,B.T. (2003) Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring. *Hypertension* **41**, 457-462.
21. Alexander,B.T., Hendon,A.E., Ferril,G. and Dwyer,T.M. (2005) Renal denervation abolishes hypertension in low-birth-weight offspring from pregnant rats with reduced uterine perfusion. *Hypertension* **45**, 754-758.
22. Ali,M.H., Pearlstein,D.P., Mathieu,C.E. and Schumacker,P.T. (2004) Mitochondrial requirement for endothelial responses to cyclic strain: implications for mechanotransduction. *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **287**, L486-L496.
23. Alikhani-Koopaei,R., Fouladkou,F., Frey,F.J. and Frey,B.M. (2004) Epigenetic regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression. *J Clin Invest* **114**, 1146-1157.
24. Allen,R.G. and Tresini,M. (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic.Biol.Med* **28**, 463-499.
25. Alwasel,S.H., Sahajpal,V. and ASHTON,N. (2010) Renal magnesium handling is not subject to developmental programming. *Kidney Blood Press Res* **33**, 94-99.

26. Ambasta,R.K., Kumar,P., Griendling,K.K., Schmidt,H.H., Busse,R. and Brandes,R.P. (2004) Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol.Chem.* **279**, 45935-45941.
27. Ames,B.N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* **221**, 1256-1264.
28. Amri,K., Freund,N., Vilar,J., Merlet-Benichou,C. and Lelievre-Pegorier,M. (1999) Adverse effects of hyperglycemia on kidney development in rats: in vivo and in vitro studies. *Diabetes* **48**, 2240-2245.
29. Ando,K. and Fujita,T. (2009) Metabolic syndrome and oxidative stress. *Free Radic.Biol.Med* **47**, 213-218.
30. Ares,M.P., Kallin,B., Eriksson,P. and Nilsson,J. (1995) Oxidized LDL induces transcription factor activator protein-1 but inhibits activation of nuclear factor-kappa B in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **15**, 1584-1590.
31. Arikan,S., Konukoglu,D., Arikan,C., Akcay,T. and Davas,I. (2001) Lipid peroxidation and antioxidant status in maternal and cord blood. *Gynecol Obstet Invest* **51**, 145-149.
32. Armstrong,J. and Reilly,J.J. (2002) Breastfeeding and lowering the risk of childhood obesity. *Lancet* **359**, 2003-2004.
33. Asif,M., Egan,J., Vasan,S. et al. (2000) An advanced glycation endproduct cross-link breaker can reverse age-related increases in myocardial stiffness. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 2809-2813.
34. Asmar,R., Benetos,A., Topouchian,J. et al. (1995) Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies. *Hypertension* **26**, 485-490.
35. Assari,T. (2006) Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Med Immunol.* **5**, 4.
36. Atherton,A., Hill,D.W., Keen,H., Young,S. and Edwards,E.J. (1980) The effect of acute hyperglycaemia on the retinal circulation of the normal cat. *Diabetologia* **18**, 233-237.
37. Autio,P., Risteli,J., Kiistala,U., Risteli,L., Karvonen,J. and Oikarinen,A. (1993) Serum markers of collagen synthesis and degradation in skin diseases. Altered levels in diseases with systemic manifestation and during systemic glucocorticoid treatment. *Arch.Dermatol.Res.* **285**, 322-327.

38. Aviram,M., Rosenblat,M., Bisgaier,C.L., Newton,R.S., Primo-Parmo,S.L. and La Du,B.N. (1998) Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* **101**, 1581-1590.
39. Avogaro,A., de Kreutzenberg,S.V. and Fadini,G.P. (2008) Oxidative stress and vascular disease in diabetes: is the dichotomization of insulin signaling still valid? *Free Radic.Biol.Med* **44**, 1209-1215.
40. Baba,A., Fukuda,K., Kuchii,M., Hano,T., Nishio,I. and Masuyama,Y. (1987) Effects of nicardipine on blood pressure and platelet cytosolic free calcium concentration in SHR. *J Cardiovasc Pharmacol.* **10 Suppl 10**, S70-S71.
41. Bagby,S.P. (2007) Maternal nutrition, low nephron number, and hypertension in later life: pathways of nutritional programming. *J Nutr.* **137**, 1066-1072.
42. Baird,J., Fisher,D., Lucas,P., Kleijnen,J., Roberts,H. and Law,C. (2005) Being big or growing fast: systematic review of size and growth in infancy and later obesity. *BMJ* **331**, 929.
43. Balasubramanyam,M., Adaikalakoteswari,A., Monickaraj,S.F. and Mohan,V. (2007) Telomere shortening & metabolic/vascular diseases. *Indian J Med Res* **125**, 441-450.
44. Ballinger,S.W., Patterson,C., Yan,C.N. et al. (2000) Hydrogen peroxide- and peroxy-nitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ.Res* **86**, 960-966.
45. Banfi,B., Molnar,G., Maturana,A. et al. (2001) A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol.Chem.* **276**, 37594-37601.
46. Barker, D. J. Fetal and infant origins of adult disease. 1992. LONDON, British Medical Journal.
47. Barker, D. J. Mothers babies and diseases in later life. 1994. LONDON, British Medical Journal.
48. Barker,D.J. (1995) Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* **311**, 171-174.
49. Barker,D.J. (1997) Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *Br.Med.Bull.* **53**, 96-108.
50. Barker,D.J. (2004) Developmental origins of adult health and disease. *J.Epidemiol.Community Health* **58**, 114-115.
51. Barker,D.J., Bull,A.R., Osmond,C. and Simmonds,S.J. (1990) Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* **301**, 259-262.
52. Barker,D.J., Eriksson,J.G., Forsen,T. and Osmond,C. (2002) Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int.J Epidemiol.* **31**, 1235-1239.

53. Barker,D.J., Gluckman,P.D., Godfrey,K.M., Harding,J.E., Owens,J.A. and Robinson,J.S. (1993) Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* **341**, 938-941.
54. Barker,D.J., Hales,C.N., Fall,C.H., Osmond,C., Phipps,K. and Clark,P.M. (1993) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* **36**, 62-67.
55. Barker,D.J., Meade,T.W., Fall,C.H. et al. (1992) Relation of fetal and infant growth to plasma fibrinogen and factor VII concentrations in adult life. *BMJ* **304**, 148-152.
56. Barker,D.J. and Osmond,C. (1986) Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* **1**, 1077-1081.
57. Barker,D.J., Osmond,C., Golding,J., Kuh,D. and Wadsworth,M.E. (1989) Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* **298**, 564-567.
58. Barker,D.J., Winter,P.D., Osmond,C., Margetts,B. and Simmonds,S.J. (1989) Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* **2**, 577-580.
59. Bartesaghi,S., Valez,V., Trujillo,M. et al. (2006) Mechanistic studies of peroxy-nitrite-mediated tyrosine nitration in membranes using the hydrophobic probe N-t-BOC-L-tyrosine tert-butyl ester. *Biochemistry* **45**, 6813-6825.
60. Bassenge,E. (1995) Control of coronary blood flow by autacoids. *Basic Res Cardiol.* **90**, 125-141.
61. Bateson,P., Barker,D., Clutton-Brock,T. et al. (2004) Developmental plasticity and human health. *Nature* **430**, 419-421.
62. Bauersachs,J. and Schafer,A. (2005) Tetrahydrobiopterin and eNOS dimer/monomer ratio--a clue to eNOS uncoupling in diabetes? *Cardiovasc Res* **65**, 768-769.
63. Baydas,G., Karatas,F., Gursu,M.F. et al. (2002) Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Arch.Med Res* **33**, 276-280.
64. Bean JW. Effects of oxygen at increased pressure. *Physiol Rev* **25**, 1-47. 1945.
65. Beckman,K.B. and Ames,B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* **78**, 547-581.
66. Bedard,K. and Krause,K.H. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* **87**, 245-313.

67. Belaiba,R.S., Djordjevic,T., Petry,A. et al. (2007) NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic.Biol.Med* **42**, 446-459.
68. Ben-Shlomo,Y., McCarthy,A., Hughes,R., Tilling,K., Davies,D. and Smith,G.D. (2008) Immediate postnatal growth is associated with blood pressure in young adulthood: the Barry Caerphilly Growth Study. *Hypertension* **52**, 638-644.
69. Benediktsson,R., Lindsay,R.S., Noble,J., Seckl,J.R. and Edwards,C.R. (1993) Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet* **341**, 339-341.
70. Bennaars-Eiden,A., Higgins,L., Hertzfel,A.V., Kapphahn,R.J., Ferrington,D.A. and Bernlohr,D.A. (2002) Covalent modification of epithelial fatty acid-binding protein by 4-hydroxynonenal in vitro and in vivo. Evidence for a role in antioxidant biology. *J Biol.Chem.* **277**, 50693-50702.
71. Beno,I., Volkovova,K., Staruchova,M. and Koszeghyova,L. (1994) The activity of Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase of gastric mucosa in chronic gastritis, and the effect of alpha-tocopherol. *Bratisl.Lek.Listy* **95**, 9-14.
72. Benov,L., Szejnberg,L. and Fridovich,I. (1998) Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic.Biol.Med* **25**, 826-831.
73. Bergel,E. and Belizan,J.M. (2002) A deficient maternal calcium intake during pregnancy increases blood pressure of the offspring in adult rats. *BJOG*. **109**, 540-545.
74. Bergvall,N., Iliadou,A., Johansson,S. et al. (2007) Genetic and shared environmental factors do not confound the association between birth weight and hypertension: a study among Swedish twins. *Circulation* **115**, 2931-2938.
75. Bernal-Mizrachi,E., Fatrai,S., Johnson,J.D. et al. (2004) Defective insulin secretion and increased susceptibility to experimental diabetes are induced by reduced Akt activity in pancreatic islet beta cells. *J Clin Invest* **114**, 928-936.
76. Berry,C., Hamilton,C.A., Brosnan,M.J. et al. (2000) Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation* **101**, 2206-2212.
77. Berry,C.L., Greenwald,S.E. and Rivett,J.F. (1975) Static mechanical properties of the developing and mature rat aorta. *Cardiovasc.Res.* **9**, 669-678.
78. Beswick,R.A., Dorrance,A.M., Leite,R. and Webb,R.C. (2001) NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension* **38**, 1107-1111.
79. Bhat,P.V. and Manolescu,D.C. (2008) Role of vitamin A in determining nephron mass and possible relationship to hypertension. *J Nutr.* **138**, 1407-1410.

80. Bindokas,V.P., Jordan,J., Lee,C.C. and Miller,R.J. (1996) Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci.* **16**, 1324-1336.
81. Blankenberg,S., Rupprecht,H.J., Bickel,C. et al. (2003) Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N.Engl.J Med* **349**, 1605-1613.
82. Bluher,S. and Mantzoros,C.S. (2007) Leptin in reproduction. *Curr.Opin.Endocrinol.Diabetes Obes.* **14**, 458-464.
83. Bogdarina,I., Welham,S., King,P.J., Burns,S.P. and Clark,A.J. (2007) Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circ.Res* **100**, 520-526.
84. Boguszewski,M.C., Johannsson,G., Fortes,L.C. and Sverrisdottir,Y.B. (2004) Low birth size and final height predict high sympathetic nerve activity in adulthood. *J Hypertens.* **22**, 1157-1163.
85. Boloker,J., Gertz,S.J. and Simmons,R.A. (2002) Gestational diabetes leads to the development of diabetes in adulthood in the rat. *Diabetes* **51**, 1499-1506.
86. Bonikos,D.S., Bensch,K.G. and Northway,W.H., 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**, 623-650.
87. Bonora,E., Targher,G., Alberiche,M. et al. (2000) Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* **23**, 57-63.
88. Booth,G., Stalker,T.J., Lefter,A.M. and Scalia,R. (2002) Mechanisms of amelioration of glucose-induced endothelial dysfunction following inhibition of protein kinase C in vivo. *Diabetes* **51**, 1556-1564.
89. Boubred,F., Buffat,C., Feuerstein,J.M. et al. (2007) Effects of early postnatal hypernutrition on nephron number and long-term renal function and structure in rats. *Am.J Physiol Renal Physiol* **293**, F1944-F1949.
90. Boudier,H.A. (1999) Arteriolar and capillary remodelling in hypertension. *Drugs* **58 Spec No 1**, 37-40.
91. Bouloumie,A., Bauersachs,J., Linz,W. et al. (1997) Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension* **30**, 934-941.
92. Bourdeau,A., Dube,N. and Tremblay,M.L. (2005) Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Curr.Opin.Cell Biol.* **17**, 203-209.

93. Bouvet,C., Gilbert,L.A., Girardot,D., deBlois,D. and Moreau,P. (2005) Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension* **45**, 432-437.
94. Bowen,R.S., Moodley,J., Dutton,M.F. and Theron,A.J. (2001) Oxidative stress in pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* **80**, 719-725.
95. Brandes,R.P. (2003) Role of NADPH oxidases in the control of vascular gene expression. *Antioxid.Redox.Signal.* **5**, 803-811.
96. Brawley,L., Itoh,S., Torrens,C. et al. (2003) Dietary protein restriction in pregnancy induces hypertension and vascular defects in rat male offspring. *Pediatr.Res* **54**, 83-90.
97. Brenner,B.M. and Chertow,G.M. (1994) Congenital oligonephropathy and the etiology of adult hypertension and progressive renal injury. *Am.J Kidney Dis.* **23**, 171-175.
98. Brenner,B.M., Garcia,D.L. and Anderson,S. (1988) Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am.J.Hypertens.* **1**, 335-347.
99. Brenner,B.M. and Mackenzie,H.S. (1997) Nephron mass as a risk factor for progression of renal disease. *Kidney Int.Suppl* **63**, S124-S127.
100. Brigelius-Flohe,R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic.Biol.Med* **27**, 951-965.
101. Brigelius-Flohe,R., Banning,A., Kny,M. and Bol,G.F. (2004) Redox events in interleukin-1 signaling. *Arch.Biochem.Biophys.* **423**, 66-73.
102. Brion,M.J., Leary,S.D., Smith,G.D., McArdle,H.J. and Ness,A.R. (2008) Maternal anemia, iron intake in pregnancy, and offspring blood pressure in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Am.J Clin Nutr.* **88**, 1126-1133.
103. Brosens,I.A., Robertson,W.B. and Dixon,H.G. (1970) The role of the spiral arteries in the pathogenesis of pre-eclampsia. *J Pathol.* **101**, vi.
104. Brosnihan,K.B., Li,P., Ganten,D. and Ferrario,C.M. (1997) Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS. *Am.J Physiol* **273**, R1908-R1915.
105. Brownlee,M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813-820.
106. Brownlee,M. (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* **54**, 1615-1625.
107. Budzyn,K., Ravi,R.M., Miller,A.A. and Sobey,C.G. (2008) Mechanisms of augmented vasoconstriction induced by 5-hydroxytryptamine in aortic rings from spontaneously hypertensive rats. *Br.J.Pharmacol.* **155**, 210-216.

108. Buettner,G.R. and Jurkiewicz,B.A. (1996) Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat.Res* **145**, 532-541.
109. Burdge,G.C., Slater-Jefferies,J., Torrens,C., Phillips,E.S., Hanson,M.A. and Lillycrop,K.A. (2007) Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br.J Nutr.* **97**, 435-439.
110. Burkhardt,T., Matter,C.M., Lohmann,C. et al. (2009) Decreased umbilical artery compliance and igf-I plasma levels in infants with intrauterine growth restriction - implications for fetal programming of hypertension. *Placenta* **30**, 136-141.
111. Bursztyjn,M., Gross,M.L., Goltser-Dubner,T. et al. (2006) Adult hypertension in intrauterine growth-restricted offspring of hyperinsulinemic rats: evidence of subtle renal damage. *Hypertension* **48**, 717-723.
112. Byberg,L., McKeigue,P.M., Zethelius,B. and Lithell,H.O. (2000) Birth weight and the insulin resistance syndrome: association of low birth weight with truncal obesity and raised plasminogen activator inhibitor-1 but not with abdominal obesity or plasma lipid disturbances. *Diabetologia* **43**, 54-60.
113. Byun,J., Mueller,D.M., Fabjan,J.S. and Heinecke,J.W. (1999) Nitrogen dioxide radical generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system promotes lipid peroxidation of low density lipoprotein. *FEBS Lett.* **455**, 243-246.
114. Cai,H. (2005) Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc.Res.* **68**, 26-36.
115. Cai,H. and Harrison,D.G. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ.Res.* **87**, 840-844.
116. Cai,S., Khoo,J. and Channon,K.M. (2005) Augmented BH4 by gene transfer restores nitric oxide synthase function in hyperglycemic human endothelial cells. *Cardiovasc Res* **65**, 823-831.
117. Cambonie,G., Comte,B., Zyzdorczyk,C. 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-R1245.
118. Camhi,S.L., Alam,J., Otterbein,L., Sylvester,S.L. and Choi,A.M. (1995) Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* **13**, 387-398.
119. Campbell,D.M., Hall,M.H., Barker,D.J., Cross,J., Shiell,A.W. and Godfrey,K.M. (1996) Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later. *Br.J Obstet Gynaecol.* **103**, 273-280.

120. Campbell,P.J., Mandarino,L.J. and Gerich,J.E. (1988) Quantification of the relative impairment in actions of insulin on hepatic glucose production and peripheral glucose uptake in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* **37**, 15-21.
121. Cani,P.D., Neyrinck,A.M., Fava,F. et al. (2007) Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* **50**, 2374-2383.
122. Cardillo,C., Kilcoyne,C.M., Cannon,R.O., III, Quyyumi,A.A. and Panza,J.A. (1997) Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* **30**, 57-63.
123. Carini,M., Aldini,G. and Facino,R.M. (2004) Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins. *Mass Spectrom.Rev* **23**, 281-305.
124. Carlsson,L.M., Jonsson,J., Edlund,T. and Marklund,S.L. (1995) Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **92**, 6264-6268.
125. Carraway,M.S., Ghio,A.J., Carter,J.D. and Piantadosi,C.A. (2000) Expression of heme oxygenase-1 in the lung in chronic hypoxia. *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **278**, L806-L812.
126. Carter,A.M., Kingston,M.J., Han,K.K., Mazzuca,D.M., Nygard,K. and Han,V.K. (2005) Altered expression of IGFs and IGF-binding proteins during intrauterine growth restriction in guinea pigs. *J Endocrinol.* **184**, 179-189.
127. Carter,W.O., Narayanan,P.K. and Robinson,J.P. (1994) Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc.Biol.* **55**, 253-258.
128. Catapano,A.L. (1997) Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology* **48**, 39-44.
129. Cater J and Gill M (1984) Low birth weight, a medical psychological and social study. In *The follow-up study: medical aspects* (John Wiley, ed.), pp. 191-205, Chichester.
130. Celsi,G., Kistner,A., Aizman,R. et al. (1998) Prenatal dexamethasone causes oligonephronia, sodium retention, and higher blood pressure in the offspring. *Pediatr.Res* **44**, 317-322.
131. Cerda,S. and Weitzman,S.A. (1997) Influence of oxygen radical injury on DNA methylation. *Mutat.Res* **386**, 141-152.
132. Ceriello,A. (1998) The emerging role of post-prandial hyperglycaemic spikes in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabet.Med* **15**, 188-193.

133. Ceriello,A. and Motz,E. (2004) Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **24**, 816-823.
134. Chance,B., Sies,H. and Boveris,A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* **59**, 527-605.
135. Chapman,N., Mohamudally,A., Cerutti,A. et al. (1997) Retinal vascular network architecture in low-birth-weight men. *J.Hypertens.* **15**, 1449-1453.
136. Chen,C.M., Wang,L.F., Chou,H.C., Lang,Y.D. and Lai,Y.P. (2007) Up-regulation of connective tissue growth factor in hyperoxia-induced lung fibrosis. *Pediatr.Res.* **62**, 128-133.
137. Chen,J. and Smith,L.E. (2007) Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis.* **10**, 133-140.
138. Chen,J.H., Martin-Gronert,M.S., Tarry-Adkins,J. and Ozanne,S.E. (2009) Maternal protein restriction affects postnatal growth and the expression of key proteins involved in lifespan regulation in mice. *PLoS.One.* **4**, e4950.
139. Chen,K., Kirber,M.T., Xiao,H., Yang,Y. and Keaney,J.F., Jr. (2008) Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J Cell Biol.* **181**, 1129-1139.
140. Chen,P.Y. and Sanders,P.W. (1991) L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *J Clin Invest* **88**, 1559-1567.
141. Chen,Y.F., Naftilan,A.J. and Oparil,S. (1992) Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension* **19**, 456-463.
142. Chenais,B., Yapo,A., Lepoivre,M. and Tenu,J.P. (1991) High-performance liquid chromatographic analysis of the unusual pathway of oxidation of L-arginine to citrulline and nitric oxide in mammalian cells. *J.Chromatogr.* **539**, 433-441.
143. Chobanian,A.V., Bakris,G.L., Black,H.R. et al. (2003) Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* **42**, 1206-1252.
144. Choi,A.M. and Alam,J. (1996) Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* **15**, 9-19.
145. Chu,F.F., Esworthy,R.S., Ho,Y.S., Bermeister,M., Swiderek,K. and Elliott,R.W. (1997) Expression and chromosomal mapping of mouse Gpx2 gene encoding the gastrointestinal form of glutathione peroxidase, GPX-GI. *Biomed.Environ.Sci* **10**, 156-162.

146. Chung,M.H., Kim,H.S., Ohtsuka,E., Kasai,H., Yamamoto,F. and Nishimura,S. (1991) An endonuclease activity in human polymorphonuclear neutrophils that removes 8-hydroxyguanine residues from DNA+. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **178**, 1472-1478.
147. Clark,P.M., Hindmarsh,P.C., Shiell,A.W., Law,C.M., Honour,J.W. and Barker,D.J. (1996) Size at birth and adrenocortical function in childhood. *Clin Endocrinol.(Oxf)* **45**, 721-726.
148. Clarke,H.E., Coates,M.E., Eva,J.K. et al. (1977) Dietary standards for laboratory animals: report of the Laboratory Animals Centre Diets Advisory Committee. *Lab Anim* **11**, 1-28.
149. Collins,A.R., Cadet,J., Moller,L., Poulsen,H.E. and Vina,J. (2004) Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch.Biochem.Biophys.* **423**, 57-65.
150. Cong,L.N., Chen,H., Li,Y. et al. (1997) Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *Mol.Endocrinol.* **11**, 1881-1890.
151. Conrad,M., Moreno,S.G., Sinowatz,F. et al. (2005) The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol.Cell Biol.* **25**, 7637-7644.
152. Consoli,A., Nurjhan,N., Capani,F. and Gerich,J. (1989) Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM. *Diabetes* **38**, 550-557.
153. Cooper,C.E., Patel,R.P., Brookes,P.S. and rley-Usmar,V.M. (2002) Nanotransducers in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species. *Trends Biochem.Sci* **27**, 489-492.
154. Cooper,M.E. (2004) Importance of advanced glycation end products in diabetes-associated cardiovascular and renal disease. *Am.J.Hypertens.* **17**, 31S-38S.
155. Cooper,W.O., Hernandez-Diaz,S., Arbogast,P.G. et al. (2006) Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. *N.Engl.J Med* **354**, 2443-2451.
156. Cosentino,F., Barker,J.E., Brand,M.P. et al. (2001) Reactive oxygen species mediate endothelium-dependent relaxations in tetrahydrobiopterin-deficient mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **21**, 496-502.
157. Cosentino,F., Eto,M., De,P.P. et al. (2003) High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* **107**, 1017-1023.
158. Cosentino,F. and Katusic,Z.S. (1995) Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation* **91**, 139-144.

159. Cosentino,F., Patton,S., d'Uscio,L.V. et al. (1998) Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest* **101**, 1530-1537.
160. Cracowski,J.L. (2006) Isoprostanes as a tool to investigate oxidative stress in scleroderma spectrum disorders--advantages and limitations. *Rheumatology.(Oxford)* **45**, 922-923.
161. Cracowski,J.L., Baguet,J.P., Ormezzano,O. et al. (2003) Lipid peroxidation is not increased in patients with untreated mild-to-moderate hypertension. *Hypertension* **41**, 286-288.
162. Cracowski,J.L., Durand,T. and Bessard,G. (2002) Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol.Sci* **23**, 360-366.
163. Crane,F.L. and Bottger,M. (2001) Plasma membrane redox systems. *Protoplasma* **217**, 1-2.
164. Crapo,J.D., Oury,T., Rabouille,C., Slot,J.W. and Chang,L.Y. (1992) Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **89**, 10405-10409.
165. Creager,M.A., Gallagher,S.J., Girerd,X.J., Coleman,S.M., Dzau,V.J. and Cooke,J.P. (1992) L-arginine improves endothélium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* **90**, 1248-1253.
166. Crowley,P. (2000) Prophylactic corticosteroids for preterm birth. *Cochrane.Database.Syst.Rev* CD000065.
167. Cuevas,P., Garcia-Calvo,M., Carceller,F. et al. (1996) Correction of hypertension by normalization of endothelial levels of fibroblast growth factor and nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **93**, 11996-12001.
168. Dabelea,D., Knowler,W.C. and Pettitt,D.J. (2000) Effect of diabetes in pregnancy on offspring: follow-up research in the Pima Indians. *J Matern.Fetal Med* **9**, 83-88.
169. Dalziel,S.R., Walker,N.K., Parag,V. et al. (2005) Cardiovascular risk factors after antenatal exposure to betamethasone: 30-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet* **365**, 1856-1862.
170. Dandona,P., Thusu,K., Cook,S. et al. (1996) Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* **347**, 444-445.
171. Dang,P.M., Stensballe,A., Boussetta,T. et al. (2006) A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest* **116**, 2033-2043.

172. Dave-Sharma,S., Wilson,R.C., Harbison,M.D. et al. (1998) Examination of genotype and phenotype relationships in 14 patients with apparent mineralocorticoid excess. *J Clin Endocrinol.Metab* **83**, 2244-2254.
173. De Champlain,J., Wu,R., Girouard,H. et al. (2004) Oxidative stress in hypertension. *Clin.Exp.Hypertens.* **26**, 593-601.
174. De Zegher F., Devlieger,H. and Eeckels,R. (1999) Fetal growth: boys before girls. *Horm.Res* **51**, 258-259.
175. Dean,F., Yu,C., Lingas,R.I. and Matthews,S.G. (2001) Prenatal glucocorticoid modifies hypothalamo-pituitary-adrenal regulation in prepubertal guinea pigs. *Neuroendocrinology* **73**, 194-202.
176. Dean,R.T., Fu,S., Stocker,R. and Davies,M.J. (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem.J* **324 (Pt 1)**, 1-18.
177. DeChiara,T.M., Efstratiadis,A. and Robertson,E.J. (1990) A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* **345**, 78-80.
178. DeFronzo,R.A., Tobin,J.D. and Andres,R. (1979) Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am.J Physiol* **237**, E214-E223.
179. Deibert,D.C. and DeFronzo,R.A. (1980) Epinephrine-induced insulin resistance in man. *J Clin Invest* **65**, 717-721.
180. DeLeve,L.D. and Kaplowitz,N. (1991) Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol.Ther.* **52**, 287-305.
181. Dennery,P.A., McDonagh,A.F., Spitz,D.R., Rodgers,P.A. and Stevenson,D.K. (1995) Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Radic.Biol.Med* **19**, 395-404.
182. Derks,J.B., Giussani,D.A., Jenkins,S.L. et al. (1997) A comparative study of cardiovascular, endocrine and behavioural effects of betamethasone and dexamethasone administration to fetal sheep. *J.Physiol* **499 (Pt 1)**, 217-226.
183. Desai,M., Crowther,N.J., Ozanne,S.E., Lucas,A. and Hales,C.N. (1995) Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem.Soc.Trans.* **23**, 331-335.
184. Deshpande,N.N., Sorescu,D., Seshiah,P. et al. (2002) Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. *Antioxid.Redox.Signal.* **4**, 845-854.
185. Dessens,A.B., Haas,H.S. and Koppe,J.G. (2000) Twenty-year follow-up of antenatal corticosteroid treatment. *Pediatrics* **105**, E77.

186. Dewey,K.G., Heinig,M.J., Nommsen,L.A., Peerson,J.M. and Lonnerdal,B. (1993) Breast-fed infants are leaner than formula-fed infants at 1 y of age: the DARLING study. *Am.J Clin Nutr.* **57**, 140-145.
187. Diamond,J. (2003) The double puzzle of diabetes. *Nature* **423**, 599-602.
188. Diaz-Llera,S., Gonzalez-Hernandez,Y., Prieto-Gonzalez,E.A. and Azoy,A. (2002) Genotoxic effect of ozone in human peripheral blood leukocytes. *Mutat.Res* **517**, 13-20.
189. Dickinson,H., Walker,D.W., Wintour,E.M. and Moritz,K. (2007) Maternal dexamethasone treatment at midgestation reduces nephron number and alters renal gene expression in the fetal spiny mouse. *Am.J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **292**, R453-R461.
190. Diez,J., Laviades,C., Mayor,G., Gil,M.J. and Monreal,I. (1995) Increased serum concentrations of procollagen peptides in essential hypertension. Relation to cardiac alterations. *Circulation* **91**, 1450-1456.
191. Diez,J., Panizo,A., Gil,M.J., Monreal,I., Hernandez,M. and Pardo,M.J. (1996) Serum markers of collagen type I metabolism in spontaneously hypertensive rats: relation to myocardial fibrosis. *Circulation* **93**, 1026-1032.
192. Dobrian,A.D., Schriver,S.D., Khraibi,A.A. and Prewitt,R.L. (2004) Pioglitazone prevents hypertension and reduces oxidative stress in diet-induced obesity. *Hypertension* **43**, 48-56.
193. Dodic,M., May,C.N., Wintour,E.M. and Coghlan,J.P. (1998) An early prenatal exposure to excess glucocorticoid leads to hypertensive offspring in sheep. *Clin Sci (Lond)* **94**, 149-155.
194. Dorfman,A., Dembinska,O., Chemtob,S. and Lachapelle,P. (2008) Early manifestations of postnatal hyperoxia on the retinal structure and function of the neonatal rat. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci* **49**, 458-466.
195. Dortimer,A.C., Shenoy,P.N., Shiroff,R.A. et al. (1978) Diffuse coronary artery disease in diabetic patients: fact or fiction? *Circulation* **57**, 133-136.
196. Doyle,L.W., Faber,B., Callanan,C. and Morley,R. (2003) Blood pressure in late adolescence and very low birth weight. *Pediatrics* **111**, 252-257.
197. Droge,W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47-95.
198. Du,X., Matsumura,T., Edelstein,D. et al. (2003) Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J.Clin.Invest* **112**, 1049-1057.

199. Durand,T., Cracowski,J.L. and Berdeaux,O. (2005) [Isoprostanes, biomarkers of lipid peroxidation in humans. Part 1. Nomenclature and synthesis]. *Pathol.Biol.(Paris)* **53**, 349-355.
200. Dusting,G.J., Moncada,S. and Vane,J.R. (1982) Prostacyclin: its biosynthesis, actions, and clinical potential. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot.Res* **10**, 59-106.
201. Dzau,V.J. and Safar,M.E. (1988) Large conduit arteries in hypertension: role of the vascular renin-angiotensin system. *Circulation* **77**, 947-954.
202. Edwards,C.R., Benediktsson,R., Lindsay,R.S. and Seckl,J.R. (1993) Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet* **341**, 355-357.
203. Edwards,L.J. and McMillen,I.C. (2001) Maternal undernutrition increases arterial blood pressure in the sheep fetus during late gestation. *J.Physiol* **533**, 561-570.
204. Edwards,L.J. and McMillen,I.C. (2002) Periconceptual nutrition programs development of the cardiovascular system in the fetal sheep. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **283**, R669-R679.
205. Egeland,G.M., Skjaerven,R. and Irgens,L.M. (2000) Birth characteristics of women who develop gestational diabetes: population based study. *BMJ* **321**, 546-547.
206. El Midaoui,A. and de Champlain,J. (2002) Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid. *Hypertension* **39**, 303-307.
207. El Midaoui,A., Elimadi,A., Wu,L.Y., Haddad,P.S. and de Champlain,J. (2003) Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *American Journal of Hypertension* **16**, 173-179.
208. El,J.A., Valente,A.J., Lechleiter,J.D. et al. (2008) Novel redox-dependent regulation of NOX5 by the tyrosine kinase c-Abl. *Free Radic.Biol.Med* **44**, 868-881.
209. Elchuri,S., Oberley,T.D., Qi,W. et al. (2005) CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* **24**, 367-380.
210. Ellison,K.E., Ingelfinger,J.R., Pivor,M. and Dzau,V.J. (1989) Androgen regulation of rat renal angiotensinogen messenger RNA expression. *J Clin Invest* **83**, 1941-1945.
211. Ellmark,S.H., Dusting,G.J., Fui,M.N., Guzzo-Pernell,N. and Drummond,G.R. (2005) The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res* **65**, 495-504.

212. Eriksen,E.F., Charles,P., Melsen,F., Mosekilde,L., Risteli,L. and Risteli,J. (1993) Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry. *J.Bone Miner.Res.* **8**, 127-132.
213. Eriksson,J.G., Forsen,T., Tuomilehto,J., Jaddoe,V.W., Osmond,C. and Barker,D.J. (2002) Effects of size at birth and childhood growth on the insulin resistance syndrome in elderly individuals. *Diabetologia* **45**, 342-348.
214. Eriksson,J.G., Forsen,T.J., Kajantie,E., Osmond,C. and Barker,D.J. (2007) Childhood growth and hypertension in later life. *Hypertension* **49**, 1415-1421.
215. Esterbauer,H., Schaur,R.J. and Zollner,H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic.Biol.Med* **11**, 81-128.
216. Evans,J.L., Goldfine,I.D., Maddux,B.A. and Grodsky,G.M. (2003) Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* **52**, 1-8.
217. Evans,J.L., Maddux,B.A. and Goldfine,I.D. (2005) The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid.Redox.Signal.* **7**, 1040-1052.
218. Feeney,L. and Berman,E.R. (1976) Oxygen toxicity: membrane damage by free radicals. *Invest Ophthalmol.* **15**, 789-792.
219. Feldberg,W. and Lewis,G.P. (1964) The action of peptides on the adrenal medulla. release of adrenaline by bradykinin and angiotensin. *J Physiol* **171**, 98-108.
220. Fernandez-Twinn,D.S. and Ozanne,S.E. (2006) Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. *Physiol Behav.* **88**, 234-243.
221. Ferrari,P. (2009) The role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension. *Biochim.Biophys.Acta.*
222. Ferrario,C.M., Gildenberg,P.L. and McCubbin,J.W. (1972) Cardiovascular effects of angiotensin mediated by the central nervous system. *Circ.Res* **30**, 257-262.
223. Fields,L.E., Burt,V.L., Cutler,J.A., Hughes,J., Roccella,E.J. and Sorlie,P. (2004) The burden of adult hypertension in the United States 1999 to 2000: a rising tide. *Hypertension* **44**, 398-404.
224. Filomeni,G., Rotilio,G. and Ciriolo,M.R. (2002) Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem.Pharmacol.* **64**, 1057-1064.
225. Flamant,M., Placier,S., Dubroca,C. et al. (2007) Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. *Hypertension* **50**, 212-218.

226. Folkow,B. (1990) "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension* **16**, 89-101.
227. Foresti,R., Sarathchandra,P., Clark,J.E., Green,C.J. and Motterlini,R. (1999) Péroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem.J* **339** (Pt 3), 729-736.
228. Forman,H.J., Fukuto,J.M. and Torres,M. (2004) Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am.J Physiol Cell Physiol* **287**, C246-C256.
229. Forsen,T., Eriksson,J., Tuomilehto,J., Reunanen,A., Osmond,C. and Barker,D. (2000) The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Ann.Intern.Med.* **133**, 176-182.
230. Forsen,T., Nissinen,A., Tuomilehto,J., Notkola,I.L., Eriksson,J. and Vinni,S. (1998) Growth in childhood and blood pressure in Finnish children. *J.Hum.Hypertens.* **12**, 397-402.
231. Forsmark-Andree,P., Dallner,G. and Ernster,L. (1995) Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid peroxidation in beef heart submitochondrial particles. *Free Radic.Biol.Med* **19**, 749-757.
232. Forstermann,U. (2006) Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol.Chem.* **387**, 1521-1533.
233. Forstermann,U. (2008) Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat.Clin Pract.Cardiovasc Med* **5**, 338-349.
234. Forstermann,U., Closs,E.I., Pollock,J.S. et al. (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* **23**, 1121-1131.
235. Forstermann,U. and Munzel,T. (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* **113**, 1708-1714.
236. Forstermann,U., Schmidt,H.H., Pollock,J.S. et al. (1991) Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem.Pharmacol.* **42**, 1849-1857.
237. Forsyth,J.S., Willatts,P., Agostoni,C., Bissenden,J., Casaer,P. and Boehm,G. (2003) Long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infant formula and blood pressure in later childhood: follow up of a randomised controlled trial. *BMJ* **326**, 953.
238. Foster,L.H. and Sumar,S. (1997) Selenium in health and disease: a review. *Crit Rev.Food Sci Nutr.* **37**, 211-228.

239. Franco,M.C., Akamine,E.H., parecida de,O.M. et al. (2003) Vitamins C and E improve endothelial dysfunction in intrauterine-undernourished rats by decreasing vascular superoxide anion concentration. *J Cardiovasc Pharmacol.* **42**, 211-217.
240. Franco,M.C., Dantas,A.P., Akamine,E.H. et al. (2002) Enhanced oxidative stress as a potential mechanism underlying the programming of hypertension in utero. *J.Cardiovasc Pharmacol.* **40**, 501-509.
241. Frank,L. (1987) Oxygen toxicity in neonatal rats: the effect of endotoxin treatment on survival during and post-O₂ exposure. *Pediatr.Res* **21**, 109-115.
242. Frank,L., Bucher,J.R. and Roberts,R.J. (1978) Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species. *J Appl.Physiol* **45**, 699-704.
243. Frank,L., Iqbal,J., Hass,M. and Massaro,D. (1989) New "rest period" protocol for inducing tolerance to high O₂ exposure in adult rats. *Am.J Physiol* **257**, L226-L231.
244. Frank,L. and Sosenko,I.R. (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**, 292-296.
245. Frei BB and Ames BN (1998) Relative importance of vitamin E in antiperoxidative defences in human blood and low-density lipoprotein (LDL). In *Vitamin E in health and diseases* (Marcel Dekker, ed.), pp. 131-141, New York
246. Fridovich,I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu.Rev Biochem.* **64**, 97-112.
247. Froguel,P., Zouali,H., Vionnet,N. et al. (1993) Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N.Engl.J.Med.* **328**, 697-702.
248. Fujii,S., Zhang,L., Igarashi,J. and Kosaka,H. (2003) L-arginine reverses p47phox and gp91phox expression induced by high salt in Dahl rats. *Hypertension* **42**, 1014-1020.
249. Fukui,T., Ishizaka,N., Rajagopalan,S. et al. (1997) p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ.Res* **80**, 45-51.
250. Funke-Kaiser,H., Lemmer,J., Langsdorff,C.V. et al. (2003) Endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) is a downstream target of the homeobox transcription factor Nkx2-5. *FASEB J* **17**, 1487-1489.
251. Galis,Z.S. and Khatri,J.J. (2002) Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ.Res* **90**, 251-262.

252. Gardner MJ, Winter PD Barker DJP. Atlas of Mortality from Selected Diseases in England and Wales. Chichester:John Wiley , 1968-1978. 1984.
253. Gardner,D.S., Pearce,S., Dandrea,J. et al. (2004) Peri-implantation undernutrition programs blunted angiotensin II evoked baroreflex responses in young adult sheep. *Hypertension* **43**, 1290-1296.
254. Gardner,H.W. and Hamberg,M. (1993) Oxygenation of (3Z)-nonenal to (2E)-4-hydroxy-2-nonenal in the broad bean (*Vicia faba* L.). *J Biol.Chem.* **268**, 6971-6977.
255. Garvey,W.T., Maianu,L., Zhu,J.H., Brechtel-Hook,G., Wallace,P. and Baron,A.D. (1998) Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J Clin Invest* **101**, 2377-2386.
256. Gate,L., Paul,J., Ba,G.N., Tew,K.D. and Tapiero,H. (1999) Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed.Pharmacother.* **53**, 169-180.
257. Gauster,M., Hiden,U., Blaschitz,A. et al. (2007) Dysregulation of placental endothelial lipase and lipoprotein lipase in intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Clin Endocrinol.Metab* **92**, 2256-2263.
258. Gavazzi,G., Banfi,B., Deffert,C. et al. (2006) Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett.* **580**, 497-504.
259. Gavazzi,G., Deffert,C., Trocme,C., Schappi,M., Herrmann,F.R. and Krause,K.H. (2007) NOX1 deficiency protects from aortic dissection in response to angiotensin II. *Hypertension* **50**, 189-196.
260. Geiszt,M. (2006) NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res* **71**, 289-299.
261. Geleijnse,J.M., Hofman,A., Witteman,J.C., Hazebroek,A.A., Valkenburg,H.A. and Grobbee,D.E. (1997) Long-term effects of neonatal sodium restriction on blood pressure. *Hypertension* **29**, 913-917.
262. Gennser,G., Rymark,P. and Isberg,P.E. (1988) Low birth weight and risk of high blood pressure in adulthood. *Br.Med.J.(Clin.Res Ed)* **296**, 1498-1500.
263. Georgeson,G.D., Szony,B.J., Streitman,K. et al. (2002) Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur.J Obstet Gynecol Reprod.Biol.* **103**, 136-139.
264. Giacco,F. and Brownlee,M. (2010) Oxidative stress and diabetic complications. *Circ.Res* **107**, 1058-1070.

265. Gier,B., Krippeit-Drews,P., Sheiko,T. et al. (2009) Suppression of KATP channel activity protects murine pancreatic beta cells against oxidative stress. *J Clin Invest* **119**, 3246-3256.
266. Gil,F.Z., Lucas,S.R., Gomes,G.N., Cavanal,M.F. and Coimbra,T.M. (2005) Effects of intrauterine food restriction and long-term dietary supplementation with L-arginine on age-related changes in renal function and structure of rats. *Pediatr.Res* **57**, 724-731.
267. Gillman,M.W., Rifas-Shiman,S.L., Camargo,C.A., Jr. et al. (2001) Risk of overweight among adolescents who were breastfed as infants. *JAMA* **285**, 2461-2467.
268. Gladyshev,V.N., Liu,A., Novoselov,S.V. et al. (2001) Identification and characterization of a new mammalian glutaredoxin (thioltransferase), Grx2. *J Biol.Chem.* **276**, 30374-30380.
269. Glover mj, Greenlund KJ, Ayala C and Croft JB (2005) Racial/ethnic disparities in prevalence, treatment, and control of hypertension: United States, 1999-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **54**, 7-9.
270. Godfrey,K.M., Forrester,T., Barker,D.J. et al. (1994) Maternal nutritional status in pregnancy and blood pressure in childhood. *Br.J Obstet Gynaecol.* **101**, 398-403.
271. Goldblatt,H., Lynch,J., Hanzal,R.F. and Summerville,W.W. (1934) Studies on experimental hypertension : I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp.Med* **59**, 347-379.
272. Goldstein,S. and Czapski,G. (1995) The reaction of NO. with O₂.- and HO₂.: a pulse radiolysis study. *Free Radic.Biol.Med* **19**, 505-510.
273. Gopalakrishna,R. and Jaken,S. (2000) Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic.Biol.Med* **28**, 1349-1361.
274. Gordon,F.J. and Mark,A.L. (1983) Impaired baroreflex control of vascular resistance in prehypertensive Dahl S rats. *Am.J Physiol* **245**, H210-H217.
275. Gorlach,A., Brandes,R.P., Nguyen,K., Amidi,M., Dehghani,F. and Busse,R. (2000) A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ.Res* **87**, 26-32.
276. Grankvist,K., Marklund,S.L. and Taljedal,I.B. (1981) CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem.J* **199**, 393-398.
277. Greene,A.S., Tonellato,P.J., Zhang,Z., Lombard,J.H. and Cowley,A.W., Jr. (1992) Effect of microvascular rarefaction on tissue oxygen delivery in hypertension. *Am.J Physiol* **262**, H1486-H1493.

278. Greene,D.A., Sima,A.A., Stevens,M.J., Feldman,E.L. and Lattimer,S.A. (1992) Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. *Diabetes Care* **15**, 1902-1925.
279. Griendling,K.K. (2004) Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart* **90**, 491-493.
280. Griendling,K.K., Sorescu,D., Lassegue,B. and Ushio-Fukai,M. (2000) Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **20**, 2175-2183.
281. Griendling,K.K., Sorescu,D. and Ushio-Fukai,M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ.Res.* **86**, 494-501.
282. Grigg,J., Barber,A. and Silverman,M. (1993) Bronchoalveolar lavage fluid glutathione in intubated premature infants. *Arch.Dis.Child* **69**, 49-51.
283. Grigore,D., Ojeda,N.B., Robertson,E.B. et al. (2007) Placental insufficiency results in temporal alterations in the renin angiotensin system in male hypertensive growth restricted offspring. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **293**, R804-R811.
284. Grossman,E. (2008) Does increased oxidative stress cause hypertension? *Diabetes Care* **31 Suppl 2**, S185-S189.
285. Grundy,S.M. (2004) Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol.Metab* **89**, 2595-2600.
286. Grunwald,J.E., Brucker,A.J., Schwartz,S.S. et al. (1990) Diabetic glycemic control and retinal blood flow. *Diabetes* **39**, 602-607.
287. Guma,A., Zierath,J.R., Wallberg-Henriksson,H. and Klip,A. (1995) Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle. *Am.J Physiol* **268**, E613-E622.
288. Guo,F. and Jen,K.L. (1995) High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav.* **57**, 681-686.
289. Gupta,P., Narang,M., Banerjee,B.D. and Basu,S. (2004) Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: a case control study. *BMC.Pediatr.* **4**, 14.
290. Gurgul,E., Lortz,S., Tiedge,M., Jorns,A. and Lenzen,S. (2004) Mitochondrial catalase overexpression protects insulin-producing cells against toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines. *Diabetes* **53**, 2271-2280.
291. Guron,G. and Friberg,P. (2000) An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. *J Hypertens.* **18**, 123-137.

292. Guthikonda,S., Sinkey,C., Barenz,T. and Haynes,W.G. (2003) Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers. *Circulation* **107**, 416-421.
293. Haase,H. and Maret,W. (2005) Protein tyrosine phosphatases as targets of the combined insulinomimetic effects of zinc and oxidants. *Biometals* **18**, 333-338.
294. Hales,C.N. and Barker,D.J. (2001) The thrifty phenotype hypothesis. *Br.Med.Bull.* **60**, 5-20.
295. Hales,C.N., Barker,D.J., Clark,P.M. et al. (1991) Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* **303**, 1019-1022.
296. Hales,C.N., Desai,M., Ozanne,S.E. and Crowther,N.J. (1996) Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem.Soc.Trans.* **24**, 341-350.
297. Hallan,S., Euser,A.M., Irgens,L.M., Finken,M.J., Holmen,J. and Dekker,F.W. (2008) Effect of intrauterine growth restriction on kidney function at young adult age: the Nord Trondelag Health (HUNT 2) Study. *Am.J Kidney Dis.* **51**, 10-20.
298. Halliwell,B. (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic.Res* **31**, 261-272.
299. Halliwell,B. and Gutteridge,J.M. (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* **307**, 108-112.
300. Halliwell,B. and Whiteman,M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br.J Pharmacol.* **142**, 231-255.
301. Harrington,K.F., Campbell,S., Bewley,S. and Bower,S. (1991) Doppler velocimetry studies of the uterine artery in the early prediction of pre-eclampsia and intra-uterine growth retardation. *Eur.J Obstet Gynecol Reprod.Biol.* **42 Suppl**, S14-S20.
302. Harrison,R. (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic.Biol.Med* **33**, 774-797.
303. Hartil,K., Vuguin,P.M., Kruse,M. et al. (2009) Maternal substrate utilization programs the development of the metabolic syndrome in male mice exposed to high fat in utero. *Pediatr.Res* **66**, 368-373.
304. Hattersley,A.T., Beards,F., Ballantyne,E., Appleton,M., Harvey,R. and Ellard,S. (1998) Mutations in the glucokinase gene of the fetus result in reduced birth weight. *Nat.Genet.* **19**, 268-270.
305. Hattersley,A.T., Turner,R.C., Permutt,M.A. et al. (1992) Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet* **339**, 1307-1310.

306. Hatton,D.C., Harrison-Hohner,J., Coste,S., Reller,M. and McCarron,D. (2003) Gestational calcium supplementation and blood pressure in the offspring. *Am.J.Hypertens.* **16**, 801-805.
307. Hayakawa,H., Hirata,Y., Suzuki,E. et al. (1994) Long-term administration of L-arginine improves nitric oxide release from kidney in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* **23**, 752-756.
308. Hecker,M. and Ullrich,V. (1989) On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A2 biosynthesis. *J Biol.Chem.* **264**, 141-150.
309. Heilig,C.W., Concepcion,L.A., Riser,B.L., Freytag,S.O., Zhu,M. and Cortes,P. (1995) Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *J.Clin.Invest* **96**, 1802-1814.
310. Heitzer,T., Krohn,K., Albers,S. and Meinertz,T. (2000) Tetrahydrobiopterin improves endothélium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* **43**, 1435-1438.
311. Heller,R., Unbehaun,A., Schellenberg,B., Mayer,B., Werner-Felmayer,G. and Werner,E.R. (2001) L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J Biol.Chem.* **276**, 40-47.
312. Heltemes,A., Gingery,A., Soldner,E.L. et al. (2010) Chronic placental ischemia alters amniotic fluid milieu and results in impaired glucose tolerance, insulin resistance and hyperleptinemia in young rats. *Exp.Biol.Med (Maywood.)* **235**, 892-899.
313. Hemmings,D.G., Williams,S.J. and Davidge,S.T. (2005) Increased myogenic tone in 7-month-old adult male but not female offspring from rat dams exposed to hypoxia during pregnancy. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* **289**, H674-H682.
314. Hempel,F.G. (1979) Oxygen tensions measured in cat cerebral cortex under hyperbaric conditions. *J Appl.Physiol* **46**, 53-60.
315. Henriksen,T. and Clausen,T. (2002) The fetal origins hypothesis: placental insufficiency and inheritance versus maternal malnutrition in well-nourished populations. *Acta Obstet Gynecol Scand.* **81**, 112-114.
316. Hensley,K., Benaksas,E.J., Bolli,R. et al. (2004) New perspectives on vitamin E: gamma-tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radic.Biol.Med* **36**, 1-15.
317. Higashi,Y., Oshima,T., Ono,N. et al. (1995) Intravenous administration of L-arginine inhibits angiotensin-converting enzyme in humans. *J Clin Endocrinol.Metab* **80**, 2198-2202.

318. Higashi,Y., Sasaki,S., Nakagawa,K. et al. (2002) Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals. *Am.J Hypertens.* **15**, 326-332.
319. Higashi,Y., Sasaki,S., Nakagawa,K., Matsuura,H., Oshima,T. and Chayama,K. (2002) Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N.Engl.J Med* **346**, 1954-1962.
320. Higman,D.J., Strachan,A.M., Buttery,L. et al. (1996) Smoking impairs the activity of endothelial nitric oxide synthase in saphenous vein. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **16**, 546-552.
321. Hink,U., Li,H., Mollnau,H. et al. (2001) Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ.Res* **88**, E14-E22.
322. Hiraoka,T., Kudo,T. and Kishimoto,Y. (1991) Catecholamines in experimentally growth-retarded rat fetus. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol.* **17**, 341-348.
323. Ho,Y.S., Gargano,M., Cao,J., Bronson,R.T., Heimler,I. and Hutz,R.J. (1998) Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *J Biol.Chem.* **273**, 7765-7769.
324. Ho,Y.S., Magnenat,J.L., Bronson,R.T. et al. (1997) Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol.Chem.* **272**, 16644-16651.
325. Ho,Y.S., Xiong,Y., Ma,W., Spector,A. and Ho,D.S. (2004) Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol.Chem.* **279**, 32804-32812.
326. Hochscheid,R., Schuchmann,U., Kotte,E., Kranz,S., Heinrichs,S. and Muller,B. (2005) NO₂-induced acute and chronic lung injury cause imbalance of glutathione metabolism in type II pneumocytes. *Med Sci Monit.* **11**, BR273-BR279.
327. Hofman,A., Hazebroek,A. and Valkenburg,H.A. (1983) A randomized trial of sodium intake and blood pressure in newborn infants. *JAMA* **250**, 370-373.
328. Holmgren,A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol.Chem.* **264**, 13963-13966.
329. Holmgren,A., Johansson,C., Berndt,C., Lonn,M.E., Hudemann,C. and Lillig,C.H. (2005) Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem.Soc.Trans.* **33**, 1375-1377.
330. Hong,H.J., Hsiao,G., Cheng,T.H. and Yen,M.H. (2001) Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **38**, 1044-1048.

331. Horke,S., Witte,I., Wilgenbus,P., Kruger,M., Strand,D. and Forstermann,U. (2007) Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation* **115**, 2055-2064.
332. Horowitz,M. (2007) Heat acclimation and cross-tolerance against novel stressors: genomic-physiological linkage. *Prog.Brain Res* **162**, 373-392.
333. Hoshida,S., Kuzuya,T., Yamashita,N. et al. (1994) gamma-Glutamylcysteine ethyl ester for myocardial protection in dogs during ischemia and reperfusion. *J Am.Coll.Cardiol.* **24**, 1391-1397.
334. Hotta,M., Tashiro,F., Ikegami,H. et al. (1998) Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *J Exp.Med* **188**, 1445-1451.
335. Houben,J.M., Moonen,H.J., van Schooten,F.J. and Hageman,G.J. (2008) Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic.Biol.Med* **44**, 235-246.
336. Hovi,P., Andersson,S., Eriksson,J.G. et al. (2007) Glucose regulation in young adults with very low birth weight. *N.Engl.J Med* **356**, 2053-2063.
337. Hoy,W.E., Rees,M., Kile,E., Mathews,J.D. and Wang,Z. (1999) A new dimension to the Barker hypothesis: low birthweight and susceptibility to renal disease. *Kidney Int.* **56**, 1072-1077.
338. Hu,L. and Manning,R.D., Jr. (1995) Role of nitric oxide in regulation of long-term pressure-natriuresis relationship in Dahl rats. *Am.J Physiol* **268**, H2375-H2383.
339. Huang,A. and Koller,A. (1997) Endothelin and prostaglandin H2 enhance arteriolar myogenic tone in hypertension. *Hypertension* **30**, 1210-1215.
340. Huang,A., Vita,J.A., Venema,R.C. and Keaney,J.F., Jr. (2000) Ascorbic acid enhances endothelial nitric-oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin. *J Biol.Chem.* **275**, 17399-17406.
341. Huang,P.L., Huang,Z., Mashimo,H. et al. (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* **377**, 239-242.
342. Huemer,M., Vonblon,K., Fodinger,M. et al. (2006) Total homocysteine, folate, and cobalamin, and their relation to genetic polymorphisms, lifestyle and body mass index in healthy children and adolescents. *Pediatr.Res* **60**, 764-769.
343. Hunt,N.H. and Stocker,R. (1990) Oxidative stress and the redox status of malaria-infected erythrocytes. *Blood Cells* **16**, 499-526.

344. Huot,J., Houle,F., Rousseau,S., Deschesnes,R.G., Shah,G.M. and Landry,J. (1998) SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J Cell Biol.* **143**, 1361-1373.
345. Huxley,R.R., Shiell,A.W. and Law,C.M. (2000) The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *J.Hypertens.* **18**, 815-831.
346. Hypponen,E., Leon,D.A., Kenward,M.G. and Lithell,H. (2001) Prenatal growth and risk of occlusive and haemorrhagic stroke in Swedish men and women born 1915-29: historical cohort study. *BMJ* **323**, 1033-1034.
347. Ibrahim,J., Berk,B.C. and Hughes,A.D. (2006) Comparison of simultaneous measurements of blood pressure by tail-cuff and carotid arterial methods in conscious spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Clin Exp.Hypertens.* **28**, 57-72.
348. Ignarro,L.J., Cirino,G., Casini,A. and Napoli,C. (1999) Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* **34**, 879-886.
349. Ijzerman,R.G., Stehouwer,C.D., de Geus,E.J., van Weissenbruch,M.M., Delemarre-van de Waal HA and Boomsma,D.I. (2003) Low birth weight is associated with increased sympathetic activity: dependence on genetic factors. *Circulation* **108**, 566-571.
350. Imai,H. and Nakagawa,Y. (2003) Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic.Biol.Med* **34**, 145-169.
351. Imai,H., Suzuki,K., Ishizaka,K. et al. (2001) Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol.Reprod.* **64**, 674-683.
352. Inoguchi,T., Li,P., Umeda,F. et al. (2000) High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* **49**, 1939-1945.
353. Ishizaka,N., de,L.H., Laursen,J.B. et al. (1997) Angiotensin II-induced hypertension increases heme oxygenase-1 expression in rat aorta. *Circulation* **96**, 1923-1929.
354. Jackson,A.A. (1991) The glycine story. *Eur.J Clin Nutr.* **45**, 59-65.
355. Jacob,M.P. (2003) Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed.Pharmacother.* **57**, 195-202.

356. Jacobson,A., Yan,C., Gao,Q. et al. (2007) Aging enhances pressure-induced arterial superoxide formation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **293**, H1344-H1350.
357. Jansson,T. and Lambert,G.W. (1999) Effect of intrauterine growth restriction on blood pressure, glucose tolerance and sympathetic nervous system activity in the rat at 3-4 months of age. *J.Hypertens.* **17**, 1239-1248.
358. Jarvenpaa,J., Vuoristo,J.T., Savolainen,E.R., Ukkola,O., Vaskivuo,T. and Ryyanen,M. (2007) Altered expression of angiogenesis-related placental genes in pre-eclampsia associated with intrauterine growth restriction. *Gynecol Endocrinol.* **23**, 351-355.
359. Jayaraman,S., Gantz,D.L. and Gursky,O. (2007) Effects of oxidation on the structure and stability of human low-density lipoprotein. *Biochemistry* **46**, 5790-5797.
360. Jeremy,J.Y., Yim,A.P., Wan,S. and Angelini,G.D. (2002) Oxidative stress, nitric oxide, and vascular disease. *J Card Surg* **17**, 324-327.
361. Jezek,P. and Plecita-Hlavata,L. (2009) Mitochondrial reticulum network dynamics in relation to oxidative stress, redox regulation, and hypoxia. *Int.J Biochem.Cell Biol.* **41**, 1790-1804.
362. Jiang,Q. and Ames,B.N. (2003) Gamma-tocopherol, but not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *FASEB J* **17**, 816-822.
363. Jones,A., Beda,A., Osmond,C., Godfrey,K.M., Simpson,D.M. and Phillips,D.I. (2008) Sex-specific programming of cardiovascular physiology in children. *Eur.Heart J* **29**, 2164-2170.
364. Jones,C.T. and Robinson,J.S. (1983) Studies on experimental growth retardation in sheep. Plasma catecholamines in fetuses with small placenta. *J Dev.Physiol* **5**, 77-87.
365. Jones,D.P. (2002) Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol.* **348**, 93-112.
366. Jones,D.P., Carlson,J.L., Mody,V.C., Cai,J., Lynn,M.J. and Sternberg,P. (2000) Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic.Biol.Med* **28**, 625-635.
367. Jones,P.A. (1999) The DNA methylation paradox. *Trends Genet.* **15**, 34-37.
368. Jung,O., Marklund,S.L., Xia,N., Busse,R. and Brandes,R.P. (2007) Inactivation of extracellular superoxide dismutase contributes to the development of high-volume hypertension. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **27**, 470-477.

369. Jung,O., Schreiber,J.G., Geiger,H., Pedrazzini,T., Busse,R. and Brandes,R.P. (2004) gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation* **109**, 1795-1801.
370. Kaati,G., Bygren,L.O. and Edvinsson,S. (2002) Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur.J Hum.Genet.* **10**, 682-688.
371. Kaiser,N., Sasson,S., Feener,E.P. et al. (1993) Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes* **42**, 80-89.
372. Kajantie,E., Barker,D.J., Osmond,C., Forsen,T. and Eriksson,J.G. (2008) Growth before 2 years of age and serum lipids 60 years later: the Helsinki Birth Cohort study. *Int.J Epidemiol.* **37**, 280-289.
373. Kakhlon,O. and Cabantchik,Z.I. (2002) The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic.Biol.Med* **33**, 1037-1046.
374. Kanaka-Gantenbein,C. (2010) Fetal origins of adult diabetes. *Ann N.Y.Acad Sci* **1205**, 99-105.
375. Kaneto,H., Katakami,N., Kawamori,D. et al. (2007) Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. *Antioxid.Redox.Signal.* **9**, 355-366.
376. Kaneto,H., Matsuoka,T.A., Nakatani,Y. et al. (2005) Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *J Mol.Med* **83**, 429-439.
377. Karowicz-Bilinska,A., Suzin,J. and Sieroszewski,P. (2002) Evaluation of oxidative stress indices during treatment in pregnant women with intrauterine growth retardation. *Med Sci Monit.* **8**, CR211-CR216.
378. Kass,D.A., Shapiro,E.P., Kawaguchi,M. et al. (2001) Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation* **104**, 1464-1470.
379. Katsuyama,M., Fan,C. and Yabe-Nishimura,C. (2002) NADPH oxidase is involved in prostaglandin F2alpha-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells: induction of NOX1 by PGF2alpha. *J Biol.Chem.* **277**, 13438-13442.
380. Kattner,E., Metze,B., Waiss,E. and Obladen,M. (1992) Accelerated lung maturation following maternal steroid treatment in infants born before 30 weeks gestation. *J Perinat.Med* **20**, 449-457.
381. Katusic,Z.S. (2001) Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* **281**, H981-H986.

382. Kawahito,S., Kitahata,H. and Oshita,S. (2009) Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World J Gastroenterol.* **15**, 4137-4142.
383. Kehrer,J.P. (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**, 43-50.
384. Kermarck wo, McKENDRICK AG, and McKinlay PL. Death-rates in Great Britain and Sweden. Some general regularities and their significance. *Lancet* , 698-703. 1934.
385. Khan,I.Y., Taylor,P.D., Dekou,V. et al. (2003) Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension* **41**, 168-175.
386. Khashu,M., Harrison,A., Lalari,V., Lavoie,J.C. and Chessex,P. (2009) Impact of shielding parenteral nutrition from light on routine monitoring of blood glucose and triglyceride levels in preterm neonates. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition* **94**, F111-F115.
387. Kimura,K., Tawara,S., Igarashi,K. and Takenaka,A. (2007) Effect of various radical generators on insulin-dependent regulation of hepatic gene expression. *Biosci Biotechnol.Biochem.* **71**, 16-22.
388. Kingdom,J.C., Hayes,M., McQueen,J., Howatson,A.G. and Lindop,G.B. (1999) Intrauterine growth restriction is associated with persistent juxtamedullary expression of renin in the fetal kidney. *Kidney Int.* **55**, 424-429.
389. Kinnula,V.L., Pietarinen,P., Aalto,K., Virtanen,I. and Raivio,K.O. (1995) Mitochondrial superoxide dismutase induction does not protect epithelial cells during oxidant exposure in vitro. *Am.J Physiol* **268**, L71-L77.
390. Kinoshita,H., Milstien,S., Wambi,C. and Katusic,Z.S. (1997) Inhibition of tetrahydrobiopterin biosynthesis impairs endothélium-dependent relaxations in canine basilar artery. *Am.J Physiol* **273**, H718-H724.
391. Kirsch,M., Korth,H.G., Sustmann,R. and de,G.H. (2002) The pathobiochemistry of nitrogen dioxide. *Biol.Chem.* **383**, 389-399.
392. Kita,Y., Shimizu,M., Sugihara,N. et al. (1991) Correlation between histopathological changes and mechanical dysfunction in diabetic rat hearts. *Diabetes Res.Clin.Pract.* **11**, 177-188.
393. Koceir EA. Aspect physiopathologique et bioénergétique du stress oxydant dans le diabète: rôle de la mitochondrie. 2008.
394. Koenen,S.V., Mecnas,C.A., Smith,G.S., Jenkins,S. and Nathanielsz,P.W. (2002) Effects of maternal betamethasone administration on fetal and maternal blood pressure and heart rate in the baboon at 0.7 of gestation. *Am.J Obstet Gynecol* **186**, 812-817.

395. Kohn,A.D., Summers,S.A., Birnbaum,M.J. and Roth,R.A. (1996) Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol.Chem.* **271**, 31372-31378.
396. Kohner,E.M., Patel,V. and Rassam,S.M. (1995) Role of blood flow and impaired autoregulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* **44**, 603-607.
397. Kojima,H., Nakatsubo,N., Kikuchi,K. et al. (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal.Chem.* **70**, 2446-2453.
398. Kojima,H., Nakatsubo,N., Kikuchi,K. et al. (1998) Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA. *Neuroreport* **9**, 3345-3348.
399. Kojima,H., Sakurai,K., Kikuchi,K. et al. (1998) Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)* **46**, 373-375.
400. Kondo,K., Mitchell,J.A., de,N.G. and Vane,J.R. (1989) Simultaneous measurement of endothélium-derived relaxing factor by bioassay and guanylate cyclase stimulation. *Br.J.Pharmacol.* **98**, 630-636.
401. Kono,T., Chisato,N., Ebisawa,Y. et al. (2004) Impaired nitric oxide production of the myenteric plexus in colitis detected by a new bioimaging system. *J Surg Res* **117**, 329-338.
402. Korner,P.I., Bobik,A., Angus,J.A., Adams,M.A. and Friberg,P. (1989) Resistance control in hypertension. *J Hypertens.Suppl* **7**, S125-S134.
403. Korshunov,S.S., Skulachev,V.P. and Starkov,A.A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* **416**, 15-18.
404. Krippeit-Drews,P., Kramer,C., Welker,S., Lang,F., Ammon,H.P. and Drews,G. (1999) Interference of H₂O₂ with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol* **514 (Pt 2)**, 471-481.
405. Krolewski,A.S., Warram,J.H. and Freire,M.B. (1996) Epidemiology of late diabetic complications. A basis for the development and evaluation of preventive programs. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* **25**, 217-242.
406. Krotz,F., Schiele,T.M., Klauss,V. and Sohn,H.Y. (2005) Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction. *J Vasc.Res* **42**, 312-324.
407. Kubisch,H.M., Wang,J., Bray,T.M. and Phillips,J.P. (1997) Targeted overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase protects pancreatic beta-cells against oxidative stress. *Diabetes* **46**, 1563-1566.

408. Kumagai,T., Kawamoto,Y., Nakamura,Y. et al. (2000) 4-hydroxy-2-nonenal, the end product of lipid peroxidation, is a specific inducer of cyclooxygenase-2 gene expression. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **273**, 437-441.
409. Kumaran,K., Fall,C.H., Martyn,C.N., Vijayakumar,M., Stein,C. and Shier,R. (2000) Blood pressure, arterial compliance, and left ventricular mass: no relation to small size at birth in south Indian adults. *Heart* **83**, 272-277.
410. Kuzkaya,N., Weissmann,N., Harrison,D.G. and Dikalov,S. (2003) Interactions of péroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol.Chem.* **278**, 22546-22554.
411. Lachapelle,P., Dembinska,O., Rojas,L.M., Benoit,J., Almazan,G. and Chemtob,S. (1999) Persistent functional and structural retinal anomalies in newborn rats exposed to hyperoxia. *Can.J Physiol Pharmacol.* **77**, 48-55.
412. Lambert,A.J. and Brand,M.D. (2009) Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods Mol.Biol.* **554**, 165-181.
413. Lambeth,J.D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat.Rev Immunol.* **4**, 181-189.
414. Lambeth,J.D., Kawahara,T. and Diebold,B. (2007) Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic.Biol.Med* **43**, 319-331.
415. Landmesser,U., Dikalov,S., Price,S.R. et al. (2003) Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J.Clin.Invest* **111**, 1201-1209.
416. Landmesser,U. and Harrison,D.G. (2001) Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron.Artery Dis.* **12**, 455-461.
417. Landmesser,U., Spiekermann,S., Dikalov,S. et al. (2002) Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* **106**, 3073-3078.
418. Langley,S.C., Browne,R.F. and Jackson,A.A. (1994) Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. *Comp Biochem.Physiol Physiol* **109**, 223-229.
419. Langley,S.C. and Jackson,A.A. (1994) Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)* **86**, 217-222.
420. Langley-Evans,S.C. (1997) Hypertension induced by foetal exposure to a maternal low-protein diet, in the rat, is prevented by pharmacological blockade of maternal glucocorticoid synthesis. *J Hypertens.* **15**, 537-544.

421. Langley-Evans,S.C. (2000) Critical differences between two low protein diet protocols in the programming of hypertension in the rat. *Int.J Food Sci Nutr.* **51**, 11-17.
422. Langley-Evans,S.C. and Jackson,A.A. (1995) Captopril normalises systolic blood pressure in rats with hypertension induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Comp Biochem.Physiol A Physiol* **110**, 223-228.
423. Langley-Evans,S.C., Phillips,G.J., Benediktsson,R. et al. (1996) Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta* **17**, 169-172.
424. Langley-Evans,S.C., Sherman,R.C., Welham,S.J., Nwagwu,M.O., Gardner,D.S. and Jackson,A.A. (1999) Intrauterine programming of hypertension: the role of the renin-angiotensin system. *Biochem.Soc.Trans.* **27**, 88-93.
425. Langley-Evans,S.C., Welham,S.J. and Jackson,A.A. (1999) Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci* **64**, 965-974.
426. Langley-Evans,S.C., Welham,S.J., Sherman,R.C. and Jackson,A.A. (1996) Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Lond)* **91**, 607-615.
427. Lassegue,B., Alexander,R.W., Nickenig,G., Clark,M., Murphy,T.J. and Griendling,K.K. (1995) Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol.Pharmacol.* **48**, 601-609.
428. Lassegue,B. and Clempus,R.E. (2003) Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am.J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **285**, R277-R297.
429. Laursen,J.B., Rajagopalan,S., Galis,Z., Tarpey,M., Freeman,B.A. and Harrison,D.G. (1997) Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* **95**, 588-593.
430. Lautier,D., Luscher,P. and Tyrrell,R.M. (1992) Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene. *Carcinogenesis* **13**, 227-232.
431. Lavoie,J.C., Belanger,S., Spalinger,M. and Chessex,P. (1997) Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: the major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics* **99**, E6.
432. Lavoie,J.C. and Chessex,P. (1994) The increase in vasomotor tone induced by a parenteral lipid emulsion is linked to an inhibition of prostacyclin production. *Free Radic.Biol.Med* **16**, 795-799.

433. Lavoie,J.C., Chessex,P., Gauthier,C. et al. (2005) Reduced bile flow associated with parenteral nutrition is independent of oxidant load and parenteral multivitamins. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* **41**, 108-114.
434. Law,C.M., Barker,D.J., Bull,A.R. and Osmond,C. (1991) Maternal and fetal influences on blood pressure. *Arch.Dis.Child* **66**, 1291-1295.
435. Law,C.M., de,S.M., Osmond,C. et al. (1993) Initiation of hypertension in utero and its amplification throughout life. *BMJ* **306**, 24-27.
436. Law,C.M. and Shiell,A.W. (1996) Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature. *J Hypertens.* **14**, 935-941.
437. Le Noble,F.A., Stassen,F.R., Hacking,W.J. and Struijker Boudier,H.A. (1998) Angiogenesis and hypertension. *J Hypertens.* **16**, 1563-1572.
438. le Noble,J.L., Tangelder,G.J., Slaaf,D.W., van,E.H., Reneman,R.S. and Struyker-Boudier,H.A. (1990) A functional morphometric study of the cremaster muscle microcirculation in young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* **8**, 741-748.
439. Lebovitz,R.M., Zhang,H., Vogel,H. et al. (1996) Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **93**, 9782-9787.
440. Lee,V.M., Quinn,P.A., Jennings,S.C. and Ng,L.L. (2003) Neutrophil activation and production of reactive oxygen species in pre-eclampsia. *J Hypertens.* **21**, 395-402.
441. Lehtinen,J.M., Uusitupa,M., Siitonen,O. and Pyorala,K. (1989) Prevalence of neuropathy in newly diagnosed NIDDM and nondiabetic control subjects. *Diabetes* **38**, 1307-1313.
442. Lehto,S., Ronnema,T., Pyorala,K. and Laakso,M. (1996) Predictors of stroke in middle-aged patients with non-insulin-dependent diabetes. *Stroke* **27**, 63-68.
443. Leitinger,N. (2008) The role of phospholipid oxidation products in inflammatory and autoimmune diseases: evidence from animal models and in humans. *Subcell.Biochem.* **49**, 325-350.
444. Lembo,G., Capaldo,B., Rendina,V. et al. (1994) Acute noradrenergic activation induces insulin resistance in human skeletal muscle. *Am.J Physiol* **266**, E242-E247.
445. Lenda,D.M., Sauls,B.A. and Boegehold,M.A. (2000) Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* **279**, H7-H14.

446. Lentz,S.R., Sobey,C.G., Piegors,D.J. et al. (1996) Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* **98**, 24-29.
447. Lenzen,S. (2008) Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem.Soc.Trans.* **36**, 343-347.
448. Lenzen,S., Drinkgern,J. and Tiedge,M. (1996) Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic.Biol.Med* **20**, 463-466.
449. Leon,D.A. (1998) Fetal growth and adult disease. *Eur.J Clin Nutr.* **52 Suppl 1**, S72-S78.
450. Leon,D.A., Johansson,M. and Rasmussen,F. (2000) Gestational age and growth rate of fetal mass are inversely associated with systolic blood pressure in young adults: an epidemiologic study of 165,136 Swedish men aged 18 years. *Am.J Epidemiol.* **152**, 597-604.
451. Leon,D.A., Lithell,H.O., Vagero,D. et al. (1998) Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15 000 Swedish men and women born 1915-29. *BMJ* **317**, 241-245.
452. Lerman,L.O., Nath,K.A., Rodriguez-Porcel,M. et al. (2001) Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. *Hypertension* **37**, 541-546.
453. Levine,R.L. (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic.Biol.Med* **32**, 790-796.
454. Levitt,N.S., Lambert,E.V., Woods,D., Hales,C.N., Andrew,R. and Seckl,J.R. (2000) Impaired glucose tolerance and elevated blood pressure in low birth weight, nonobese, young south african adults: early programming of cortisol axis. *J Clin Endocrinol.Metab* **85**, 4611-4618.
455. Levitt,N.S., Lindsay,R.S., Holmes,M.C. and Seckl,J.R. (1996) Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinology* **64**, 412-418.
456. Levy,E., Brunet,S., Alvarez,F. et al. (2007) Abnormal hepatobiliary and circulating lipid metabolism in the Long-Evans Cinnamon rat model of Wilson's disease. *Life Sci* **80**, 1472-1483.
457. Lewis,G.P. and Reit,E. (1965) The action of angiotensin and bradykinin on the superior cervical ganglion of the cat. *J Physiol* **179**, 538-553.
458. Lewis,R.M., Forhead,A.J., Petry,C.J., Ozanne,S.E. and Hales,C.N. (2002) Long-term programming of blood pressure by maternal dietary iron restriction in the rat. *Br.J.Nutr.* **88**, 283-290.

459. Li,A.E., Ito,H., Rovira,I.I. et al. (1999) A role for reactive oxygen species in endothelial cell anoikis. *Circ.Res* **85**, 304-310.
460. Li,H., Witte,K., August,M. et al. (2006) Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J Am.Coll.Cardiol.* **47**, 2536-2544.
461. Li,N., Ragheb,K., Lawler,G. et al. (2003) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol.Chem.* **278**, 8516-8525.
462. Li,S., Chen,S.C., Shlipak,M. et al. (2008) Low birth weight is associated with chronic kidney disease only in men. *Kidney Int.* **73**, 637-642.
463. Li,Y., Zhu,H., Kuppusamy,P., Roubaud,V., Zweier,J.L. and Trush,M.A. (1998) Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol.Chem.* **273**, 2015-2023.
464. Ligi,I., Grandvuillemin,I., Andres,V., gnat-George,F. and Simeoni,U. (2010) Low birth weight infants and the developmental programming of hypertension: a focus on vascular factors. *Semin.Perinatol* **34**, 188-192.
465. Linder,N., Rapola,J. and Raivio,K.O. (1999) Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab Invest* **79**, 967-974.
466. Lindsay,R.S., Dabelea,D., Roumain,J., Hanson,R.L., Bennett,P.H. and Knowler,W.C. (2000) Type 2 diabetes and low birth weight: the role of paternal inheritance in the association of low birth weight and diabetes. *Diabetes* **49**, 445-449.
467. Lindsay,R.S., Lindsay,R.M., Edwards,C.R. and Seckl,J.R. (1996) Inhibition of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring. *Hypertension* **27**, 1200-1204.
468. Lip,G.Y., Edmunds,E., Nuttall,S.L., Landray,M.J., Blann,A.D. and Beevers,D.G. (2002) Oxidative stress in malignant and non-malignant phase hypertension. *J Hum.Hypertens.* **16**, 333-336.
469. Lithell,H.O., McKeigue,P.M., Berglund,L., Mohsen,R., Lithell,U.B. and Leon,D.A. (1996) Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years. *BMJ* **312**, 406-410.
470. Liu,L., Li,A. and Matthews,S.G. (2001) Maternal glucocorticoid treatment programs HPA regulation in adult offspring: sex-specific effects. *Am.J Physiol Endocrinol.Metab* **280**, E729-E739.
471. Locke,R. (2002) Preventing obesity: the breast milk-leptin connection. *Acta Paediatr.* **91**, 891-894.

472. Lodovici,M., Bigagli,E., Bardini,G. and Rotella,C.M. (2009) Lipoperoxidation and antioxidant capacity in patients with poorly controlled type 2 diabetes. *Toxicol.Ind.Health* **25**, 337-341.
473. Lopez,B., Gonzalez,A., Querejeta,R. and Diez,J. (2005) The use of collagen-derived serum peptides for the clinical assessment of hypertensive heart disease. *J.Hypertens.* **23**, 1445-1451.
474. Lopez,E., Boucherat,O., Franco-Montoya,M.L., Bourbon,J.R., Delacourt,C. and Jarreau,P.H. (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.
475. Lopez-Figueroa,M.O., Caamano,C., Marin,R. et al. (2001) Characterization of basal nitric oxide production in living cells. *Biochim.Biophys.Acta* **1540**, 253-264.
476. Lounsbury,K.M., Hu,Q. and Ziegelstein,R.C. (2000) Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radic.Biol.Med* **28**, 1362-1369.
477. Lowell,B.B. and Shulman,G.I. (2005) Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* **307**, 384-387.
478. Lucas,A. (1991) Programming by early nutrition in man. *Ciba Found.Symp.* **156**, 38-50.
479. Lundberg,M., Johansson,C., Chandra,J. et al. (2001) Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoforms. *J Biol.Chem.* **276**, 26269-26275.
480. Luthman,M. and Holmgren,A. (1982) Glutaredoxin from calf thymus. Purification to homogeneity. *J Biol.Chem.* **257**, 6686-6690.
481. MacDonald,P.E. and Wheeler,M.B. (2003) Voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets. *Diabetologia* **46**, 1046-1062.
482. MacKenzie,A. and Martin,W. (1998) Loss of endothélium-derived nitric oxide in rabbit aorta by oxidant stress: restoration by superoxide dismutase mimetics. *Br.J Pharmacol.* **124**, 719-728.
483. Mackenzie,H.S. and Brenner,B.M. (1995) Fewer nephrons at birth: a missing link in the etiology of essential hypertension? *Am.J.Kidney Dis.* **26**, 91-98.
484. Mackenzie,H.S., Lawler,E.V. and Brenner,B.M. (1996) Congenital oligonephropathy: The fetal flaw in essential hypertension? *Kidney Int.Suppl* **55**, S30-S34.

485. MacLennan,N.K., James,S.J., Melnyk,S. et al. (2004) Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. *Physiol Genomics* **18**, 43-50.
486. Maechler,P. and Wollheim,C.B. (2001) Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature* **414**, 807-812.
487. Maines,M.D. (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu.Rev Pharmacol.Toxicol.* **37**, 517-554.
488. Maiorino,M., Thomas,J.P., Girotti,A.W. and Ursini,F. (1991) Reactivity of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with membrane and lipoprotein lipid hydroperoxides. *Free Radic.Res Commun.* **12-13 Pt 1**, 131-135.
489. Malaisse,W.J., Malaisse-Lagae,F., Sener,A. and Pipeleers,D.G. (1982) Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **79**, 927-930.
490. Malinski,T. and Taha,Z. (1992) Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* **358**, 676-678.
491. Manning,J. and Vehaskari,V.M. (2001) Low birth weight-associated adult hypertension in the rat. *Pediatr.Nephrol.* **16**, 417-422.
492. Marchesi,C., Ebrahimian,T., Angulo,O., Paradis,P. and Schiffrin,E.L. (2009) Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. *Hypertension* **54**, 1384-1392.
493. Maria do Carmo Franco, Beatriz Felice Ponzio Guiomar Nascimento Gomes Frida Zaladek Gil Rita Tostes Maria Helena Catelli Carvalho Zuleica Bruno Fortes. Micronutrient prenatal supplementation prevents the development of hypertension and vascular endothelial damage induced by intrauterine malnutrition. *Life Sciences* **85**, 327-333. 2009.
494. Marklund,S.L. (1982) Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **79**, 7634-7638.
495. Martin,C.C., Laforest,L., Akimenko,M.A. and Ekker,M. (1999) A role for DNA methylation in gastrulation and somite patterning. *Dev.Biol.* **206**, 189-205.
496. Martyn,C.N., Barker,D.J., Jespersen,S., Greenwald,S., Osmond,C. and Berry,C. (1995) Growth in utero, adult blood pressure, and arterial compliance. *Br.Heart J* **73**, 116-121.
497. Masella,R., Di,B.R., Vari,R., Filesi,C. and Giovannini,C. (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr.Biochem.* **16**, 577-586.

498. Matsuno,K., Yamada,H., Iwata,K. et al. (2005) Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation* **112**, 2677-2685.
499. Matthews,D.R., Hosker,J.P., Rudenski,A.S., Naylor,B.A., Treacher,D.F. and Turner,R.C. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412-419.
500. Matthews,S.G., Owen,D., Kalabis,G. et al. (2004) Fetal glucocorticoid exposure and hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) function after birth. *Endocr.Res* **30**, 827-836.
501. May,J.M., Cobb,C.E., Mendiratta,S., Hill,K.E. and Burk,R.F. (1998) Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J Biol.Chem.* **273**, 23039-23045.
502. Mayer,B., John,M. and Bohme,E. (1990) Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett.* **277**, 215-219.
503. McCance,R.A. and Widdowson,E.M. (1974) The determinants of growth and form. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci* **185**, 1-17.
504. McCord,J.M. and Fridovich,I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol.Chem.* **244**, 6049-6055.
505. McDonald,K.K., Zharikov,S., Block,E.R. and Kilberg,M.S. (1997) A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol.Chem.* **272**, 31213-31216.
506. McMillen,I.C. and Robinson,J.S. (2005) Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev.* **85**, 571-633.
507. McNulty,M., Mahmud,A., Spiers,P. and Feely,J. (2006) Collagen type-I degradation is related to arterial stiffness in hypertensive and normotensive subjects. *J Hum.Hypertens.* **20**, 867-873.
508. McTernan,C.L., Draper,N., Nicholson,H. et al. (2001) Reduced placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 mRNA levels in human pregnancies complicated by intrauterine growth restriction: an analysis of possible mechanisms. *J Clin Endocrinol.Metab* **86**, 4979-4983.
509. Merlet-Benichou,C., Gilbert,T., Muffat-Joly,M., Lelievre-Pegorier,M. and Leroy,B. (1994) Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. *Pediatr.Nephrol.* **8**, 175-180.

510. Meyer,J.W., Holland,J.A., Ziegler,L.M., Chang,M.M., Beebe,G. and Schmitt,M.E. (1999) Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in human endothelial cells :a potential atherogenic source of reactive oxygen species. *Endothélium* **7**, 11-22.
511. Michel,F., Bonnefont-Rousselot,D., Mas,E., Draï,J. and Therond,P. (2008) [Biomarkers of lipid peroxidation: analytical aspects]. *Ann Biol.Clin (Paris)* **66**, 605-620.
512. Miller,D.M. and Aust,S.D. (1989) Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation. *Arch.Biochem.Biophys.* **271**, 113-119.
513. Miller,D.M., Buettner,G.R. and Aust,S.D. (1990) Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic.Biol.Med* **8**, 95-108.
514. Minuz,P., Patrignani,P., Gaino,S. et al. (2004) Determinants of platelet activation in human essential hypertension. *Hypertension* **43**, 64-70.
515. Mitchell,P., Liew,G., Rochtchina,E. et al. (2008) Evidence of arteriolar narrowing in low-birth-weight children. *Circulation* **118**, 518-524.
516. Mizejewski,G.J. (2003) Levels of alpha-fetoprotein during pregnancy and early infancy in normal and disease states. *Obstet Gynecol Surv.* **58**, 804-826.
517. Mizutani,K., Ikeda,K., Kawai,Y. and Yamori,Y. (1999) Biomechanical properties and chemical composition of the aorta in genetic hypertensive rats. *J.Hypertens.* **17**, 481-487.
518. Mohazzab,K.M., Kaminski,P.M. and Wolin,M.S. (1994) NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothélium. *Am.J Physiol* **266**, H2568-H2572.
519. Mohazzab,K.M. and Wolin,M.S. (1994) Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. *Am.J Physiol* **267**, L815-L822.
520. Moncada,S., Palmer,R.M. and Higgs,E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Rev.* **43**, 109-142.
521. Monteiro,P.O., Victora,C.G., Barros,F.C. and Monteiro,L.M. (2003) Birth size, early childhood growth, and adolescent obesity in a Brazilian birth cohort. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* **27**, 1274-1282.
522. Moreno,M.U., San,J.G., Orbe,J. et al. (2003) Preliminary characterisation of the promoter of the human p22(phox) gene: identification of a new polymorphism associated with hypertension. *FEBS Lett.* **542**, 27-31.
523. Mori,T.A., Bao,D.Q., Burke,V., Puddey,I.B. and Beilin,L.J. (1999) Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans. *Hypertension* **34**, 253-260.

524. Mori,Y., Ohyanagi,M., Koida,S., Ueda,A., Ishiko,K. and Iwasaki,T. (2006) Effects of endothélium-derived hyperpolarizing factor and nitric oxide on endothelial function in femoral resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens.Res* **29**, 187-195.
525. Morrow,J.D., Hill,K.E., Burk,R.F., Nammour,T.M., Badr,K.F. and Roberts,L.J. (1990) A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **87**, 9383-9387.
526. Morrow,J.D. and Roberts,L.J. (1997) The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog.Lipid Res* **36**, 1-21.
527. Moss,T.J., Sloboda,D.M., Gurrin,L.C., Harding,R., Challis,J.R. and Newnham,J.P. (2001) Programming effects in sheep of prenatal growth restriction and glucocorticoid exposure. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **281**, R960-R970.
528. Mueller,C.F., Laude,K., McNally,J.S. and Harrison,D.G. (2005) ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **25**, 274-278.
529. Mungrue,I.N., Husain,M. and Stewart,D.J. (2002) The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. *Heart Fail.Rev* **7**, 407-422.
530. Munzel,T., Afanas'ev,I.B., Kleschyov,A.L. and Harrison,D.G. (2002) Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **22**, 1761-1768.
531. Murad,F. (1986) Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* **78**, 1-5.
532. Murphy,E., Bers,D. and Rizzuto,R. (2009) Mitochondria: from basic biology to cardiovascular disease. *J Mol.Cell Cardiol.* **46**, 765-766.
533. Murphy,M.J., Metcalf,B.S., Voss,L.D. et al. (2004) Girls at five are intrinsically more insulin resistant than boys: The Programming Hypotheses Revisited--The EarlyBird Study (EarlyBird 6). *Pediatrics* **113**, 82-86.
534. Murray,C.J. and Lopez,A.D. (1996) Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* **274**, 740-743.
535. Muzaffar,S., Jeremy,J.Y., Angelini,G.D., Stuart-Smith,K. and Shukla,N. (2003) Role of the endothélium and nitric oxide synthases in modulating superoxide formation induced by endotoxin and cytokines in porcine pulmonary arteries. *Thorax* **58**, 598-604.
536. Myatt,L. (2006) Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol* **572**, 25-30.

537. Nagai,R., Araki,T., Hayashi,C.M., Hayase,F. and Horiuchi,S. (2003) Identification of N epsilon-(carboxyethyl)lysine, one of the methylglyoxal-derived AGE structures, in glucose-modified protein: mechanism for protein modification by reactive aldehydes. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* **788**, 75-84.
538. Nakazaki,M., Kakei,M., Koriyama,N. and Tanaka,H. (1995) Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in free radical-mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *Diabetes* **44**, 878-883.
539. Ndisang,J.F., Lane,N. and Jadhav,A. (2008) Crosstalk between the heme oxygenase system, aldosterone, and phospholipase C in hypertension. *J Hypertens.* **26**, 1188-1199.
540. Neel,J.V. (1962) Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am.J.Hum.Genet.* **14**, 353-362.
541. Nehiri,T., Duong Van Huyen,J.P., Viltard,M. et al. (2008) Exposure to maternal diabetes induces salt-sensitive hypertension and impairs renal function in adult rat offspring. *Diabetes* **57**, 2167-2175.
542. Nesterenko,T.H. and Aly,H. (2009) Fetal and neonatal programming: evidence and clinical implications. *Am.J Perinatol* **26**, 191-198.
543. Neuzil,J., Darlow,B.A., Inder,T.E., Sluis,K.B., Winterbourn,C.C. and Stocker,R. (1995) Oxidation of parenteral lipid emulsion by ambient and phototherapy lights: potential toxicity of routine parenteral feeding. *J Pediatr.* **126**, 785-790.
544. Neuzil,J. and Stocker,R. (1994) Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol.Chem.* **269**, 16712-16719.
545. Ng,C.J., Bourquard,N., Grijalva,V. et al. (2006) Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J Biol.Chem.* **281**, 29491-29500.
546. Nishikawa,T., Kukidome,D., Sonoda,K. et al. (2007) Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract.* **77 Suppl 1**, S161-S164.
547. Nishiyama,A., Fukui,T., Fujisawa,Y. et al. (2001) Systemic and Regional Hemodynamic Responses to Tempol in Angiotensin II-Infused Hypertensive Rats. *Hypertension* **37**, 77-83.
548. Nishiyama,A., Yao,L., Nagai,Y. et al. (2004) Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension* **43**, 841-848.

549. Nomura,K., Imai,H., Koumura,T. and Nakagawa,Y. (2001) Involvement of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as an antiapoptotic factor. *Biol.Signals Recept.* **10**, 81-92.
550. Noon,J.P., Walker,B.R., Webb,D.J. et al. (1997) Impaired microvascular dilatation and capillary rarefaction in young adults with a predisposition to high blood pressure. *J Clin Invest* **99**, 1873-1879.
551. Norman,M. (2008) Low birth weight and the developing vascular tree: a systematic review. *Acta Paediatr.* **97**, 1165-1172.
552. Nyirenda,M.J., Lindsay,R.S., Kenyon,C.J., Burchell,A. and Seckl,J.R. (1998) Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest* **101**, 2174-2181.
553. Nyirenda,M.J., Welberg,L.A. and Seckl,J.R. (2001) Programming hyperglycaemia in the rat through prenatal exposure to glucocorticoids-fetal effect or maternal influence? *J.Endocrinol.* **170**, 653-660.
554. O'Sullivan,M.J., Kearney,P.J. and Crowley,M.J. (1996) The influence of some perinatal variables on neonatal blood pressure. *Acta Paediatr.* **85**, 849-853.
555. Oberley,L.W. (1988) Free radicals and diabetes. *Free Radic.Biol.Med* **5**, 113-124.
556. Oemar,B.S., Tschudi,M.R., Godoy,N., Brovkovich,V., Malinski,T. and Luscher,T.F. (1998) Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* **97**, 2494-2498.
557. Ogata,M. (1991) Acatlasemia. *Hum.Genet.* **86**, 331-340.
558. Ogihara,T., Asano,T., Ando,K. et al. (2002) Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. *Hypertension* **40**, 872-879.
559. Ojeda,M.L., Vazquez,B., Nogales,F., Murillo,M.L. and Carreras,O. (2009) Ethanol consumption by Wistar rat dams affects selenium bioavailability and antioxidant balance in their progeny. *Int.J Environ.Res Public Health* **6**, 2139-2149.
560. Ojeda,N.B., Grigore,D., Robertson,E.B. and Alexander,B.T. (2007) Estrogen protects against increased blood pressure in postpubertal female growth restricted offspring. *Hypertension* **50**, 679-685.
561. Ojeda,N.B., Grigore,D., Yanes,L.L. et al. (2007) Testosterone contributes to marked elevations in mean arterial pressure in adult male intrauterine growth restricted offspring. *Am.J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **292**, R758-R763.
562. Ong,K.K. (2007) Catch-up growth in small for gestational age babies: good or bad? *Curr.Opin.Endocrinol.Diabetes Obes.* **14**, 30-34.

563. Ong,K.K., Ahmed,M.L., Emmett,P.M., Preece,M.A. and Dunger,D.B. (2000) Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *BMJ* **320**, 967-971.
564. Onuma,S. and Nakanishi,K. (2004) Superoxide dismutase mimetic tempol decreases blood pressure by increasing renal medullary blood flow in hyperinsulinemic-hypertensive rats. *Metabolism* **53**, 1305-1308.
565. Oppe TE. Artificial feeds for the young infant.Report of the Working Party on the Composition of Foods for Infants and Young Children, Committee on Medical Aspects of Food Policy. HMSO . 1980.
566. Oren,A., Vos,L.E., Uiterwaal,C.S., Gorissen,W.H., Grobbee,D.E. and Bots,M.L. (2004) Birth weight and carotid intima-media thickness: new perspectives from the atherosclerosis risk in young adults (ARYA) study. *Ann.Epidemiol.* **14**, 8-16.
567. Oron-Herman,M., Kamari,Y., Grossman,E. et al. (2008) Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models. *Am.J Hypertens.* **21**, 1018-1022.
568. Ortiz,L.A., Quan,A., Weinberg,A. and Baum,M. (2001) Effect of prenatal dexamethasone on rat renal development. *Kidney Int.* **59**, 1663-1669.
569. Osmond,C., Barker,D.J., Winter,P.D., Fall,C.H. and Simmonds,S.J. (1993) Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ* **307**, 1519-1524.
570. Otterbein,L., Sylvester,S.L. and Choi,A.M. (1995) Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* **13**, 595-601.
571. Otterbein,L.E. and Choi,A.M. (2000) Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **279**, L1029-L1037.
572. Ozaki,T., Nishina,H., Hanson,M.A. and Poston,L. (2001) Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol* **530**, 141-152.
573. Ozanne,S.E. and Constancia,M. (2007) Mechanisms of disease: the developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nat.Clin Pract.Endocrinol.Metab* **3**, 539-546.
574. Ozanne,S.E., Jensen,C.B., Tingey,K.J., Storgaard,H., Madsbad,S. and Vaag,A.A. (2005) Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. *Diabetologia* **48**, 547-552.
575. Pacher,P., Nivorozhkin,A. and Szabo,C. (2006) Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol.Rev* **58**, 87-114.

576. Pacholczyk,M., Ferenc,T. and Kowalski,J. (2008) [The metabolic syndrome. Part II: its mechanisms of development and its complications]. *Postepy Hig.Med Dosw.(Online.)* **62**, 543-558.
577. Pacht,E.R., Timerman,A.P., Lykens,M.G. and Merola,A.J. (1991) Deficiency of alveolar fluid glutathione in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Chest* **100**, 1397-1403.
578. Pagano,P.J., Ito,Y., Tornheim,K., Gallop,P.M., Tauber,A.I. and Cohen,R.A. (1995) An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am.J Physiol* **268**, H2274-H2280.
579. Painter,R.C., Roseboom,T.J., van Montfrans,G.A. et al. (2005) Microalbuminuria in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *J Am.Soc.Nephrol.* **16**, 189-194.
580. Palmer,R.M., Rees,D.D., Ashton,D.S. and Moncada,S. (1988) L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothélium-dependent relaxation. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **153**, 1251-1256.
581. Paravicini,T.M., Chrissobolis,S., Drummond,G.R. and Sobey,C.G. (2004) Increased NADPH-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo. *Stroke* **35**, 584-589.
582. Park,J.B., Touyz,R.M., Chen,X. and Schiffrin,E.L. (2002) Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am.J Hypertens.* **15**, 78-84.
583. Park,K.S., Kim,J.H., Kim,M.S. et al. (2001) Effects of insulin and antioxidant on plasma 8-hydroxyguanine and tissue 8-hydroxydeoxyguanosine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* **50**, 2837-2841.
584. Parkington,H.C., Coleman,H.A. and Tare,M. (2004) Prostacyclin and endothélium-dependent hyperpolarization. *Pharmacol.Res* **49**, 509-514.
585. Parola,M., Robino,G. and Dianzani,M.U. (1999) 4-hydroxy-2,3-alkenals as molecular mediators of oxidative stress in the pathogenesis of liver fibrosis (review). *Int.J Mol.Med* **4**, 425-432.
586. Pasqualotto,B.A., Hope,B.T. and Vincent,S.R. (1991) Citrulline in the rat brain: immunohistochemistry and coexistence with NADPH-diaphorase. *Neurosci.Lett.* **128**, 155-160.
587. Payne,J.A., Alexander,B.T. and Khalil,R.A. (2003) Reduced endothelial vascular relaxation in growth-restricted offspring of pregnant rats with reduced uterine perfusion. *Hypertension* **42**, 768-774.

588. Pedchenko,V.K., Chetyrkin,S.V., Chuang,P. et al. (2005) Mechanism of perturbation of integrin-mediated cell-matrix interactions by reactive carbonyl compounds and its implication for pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes* **54**, 2952-2960.
589. Peers,A., Campbell,D.J., Wintour,E.M. and Dodic,M. (2001) The peripheral renin-angiotensin system is not involved in the hypertension of sheep exposed to prenatal dexamethasone. *Clin Exp.Pharmacol.Physiol* **28**, 306-311.
590. Peled-Kamar,M., Lotem,J., Wirguin,I., Weiner,L., Hermalin,A. and Groner,Y. (1997) Oxidative stress mediates impairment of muscle function in transgenic mice with elevated level of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **94**, 3883-3887.
591. Perez-Escamilla,R., Cohen,R.J., Brown,K.H., Rivera,L.L., Canahuati,J. and Dewey,K.G. (1995) Maternal anthropometric status and lactation performance in a low-income Honduran population: evidence for the role of infants. *Am.J Clin Nutr.* **61**, 528-534.
592. Petersen,S.V., Oury,T.D., Valnickova,Z. et al. (2003) The dual nature of human extracellular superoxide dismutase: one sequence and two structures. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **100**, 13875-13880.
593. Peterside,I.E., Selak,M.A. and Simmons,R.A. (2003) Impaired oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria in growth-retarded rats. *Am.J Physiol Endocrinol.Metab* **285**, E1258-E1266.
594. Petry,C.J., Dorling,M.W., Pawlak,D.B., Ozanne,S.E. and Hales,C.N. (2001) Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. *Int.J Exp.Diabetes Res* **2**, 139-143.
595. Petry,C.J., Dorling,M.W., Wang,C.L., Pawlak,D.B. and Ozanne,S.E. (2000) Catecholamine levels and receptor expression in low protein rat offspring. *Diabet.Med* **17**, 848-853.
596. Petry,C.J., Ozanne,S.E., Wang,C.L. and Hales,C.N. (1997) Early protein restriction and obesity independently induce hypertension in 1-year-old rats. *Clin Sci (Lond)* **93**, 147-152.
597. Pettitt,D.J., Bennett,P.H., Saad,M.F., Charles,M.A., Nelson,R.G. and Knowler,W.C. (1991) Abnormal glucose tolerance during pregnancy in Pima Indian women. Long-term effects on offspring. *Diabetes* **40 Suppl 2**, 126-130.
598. Pfeifer,H., Conrad,M., Roethlein,D. et al. (2001) Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J* **15**, 1236-1238.

599. Pham,T.D., MacLennan,N.K., Chiu,C.T., Laksana,G.S., Hsu,J.L. and Lane,R.H. (2003) Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **285**, R962-R970.
600. Phillips,D.I. and Barker,D.J. (1997) Association between low birthweight and high resting pulse in adult life: is the sympathetic nervous system involved in programming the insulin resistance syndrome? *Diabet.Med* **14**, 673-677.
601. Phillips,D.I., Barker,D.J., Fall,C.H. et al. (1998) Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome? *J Clin Endocrinol.Metab* **83**, 757-760.
602. Phillips,D.I., Barker,D.J., Hales,C.N., Hirst,S. and Osmond,C. (1994) Thinness at birth and insulin resistance in adult life. *Diabetologia* **37**, 150-154.
603. Phillips,D.I., Jones,A. and Goulden,P.A. (2006) Birth weight, stress, and the metabolic syndrome in adult life. *Ann.N.Y.Acad.Sci* **1083**, 28-36.
604. Piech,A., Dessy,C., Havaux,X., Feron,O. and Balligand,J.L. (2003) Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. *Cardiovasc Res* **57**, 456-467.
605. Pieper,G.M. (1997) Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor, tetrahydrobiopterin. *J.Cardiovasc Pharmacol.* **29**, 8-15.
606. Pieper,G.M. and Peltier,B.A. (1995) Amelioration by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in diabetic endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol.* **25**, 397-403.
607. Pietarinen-Runtti,P., Raivio,K.O., Saksela,M., Asikainen,T.M. and Kinnula,V.L. (1998) Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial epithelial cells cultured under hyperoxic conditions. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* **19**, 286-292.
608. Pilkis,S.J. and Granner,D.K. (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu.Rev Physiol* **54**, 885-909.
609. Pilon,M., Wu,R., Huot-Marchand,J.E., deBlois,D., Champlain,J. and Couture,R. (2009) Effect of chronic inhibition of nitric oxide on hypertension, insulin resistance, and cardiovascular remodeling in glucose-fed rats. *J.Cardiovasc Pharmacol.* **53**, 405-413.
610. Pladys,P., Lahaie,I., Cambonie,G. et al. (2004) Role of brain and peripheral angiotensin II in hypertension and altered arterial baroreflex programmed during fetal life in rat. *Pediatr.Res* **55**, 1042-1049.

611. Pladys,P., Sennlaub,F., Brault,S. et al. (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**, R1580-R1588.
612. Plagemann,A., Heidrich,I., Gotz,F., Rohde,W. and Dorner,G. (1992) Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Exp.Clin Endocrinol.* **99**, 154-158.
613. Podjarny,E., Bernheim,J., Katz,B., Green,J., Mekler,J. and Bursztyn,M. (1998) Chronic exogenous hyperinsulinemia in pregnancy: a rat model of pregnancy-induced hypertension. *J Am.Soc.Nephrol.* **9**, 9-13.
614. Poli,G. (2000) Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol.Aspects Med* **21**, 49-98.
615. Portaluppi,F., Boari,B. and Manfredini,R. (2004) Oxidative stress in essential hypertension. *Curr.Pharm.Des* **10**, 1695-1698.
616. Poss,K.D. and Tonegawa,S. (1997) Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **94**, 10925-10930.
617. Potenza,M.V. and Mechanick,J.I. (2009) The metabolic syndrome: definition, global impact, and pathophysiology. *Nutr.Clin Pract.* **24**, 560-577.
618. Quan,A., Chakravarty,S., Chen,J.K. et al. (2004) Androgens augment proximal tubule transport. *Am.J Physiol Renal Physiol* **287**, F452-F459.
619. Racasan,S., Braam,B., Koomans,H.A. and Joles,J.A. (2005) Programming blood pressure in adult SHR by shifting perinatal balance of NO and reactive oxygen species toward NO: the inverted Barker phenomenon. *Am.J.Physiol Renal Physiol* **288**, F626-F636.
620. Rajagopalan,S., Kurz,S., Munzel,T. et al. (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* **97**, 1916-1923.
621. Rajagopalan,S., Meng,X.P., Ramasamy,S., Harrison,D.G. and Galis,Z.S. (1996) Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* **98**, 2572-2579.
622. Rajapakse,N.W., De,M.C., Das,S. and Mattson,D.L. (2008) Exogenous L-arginine ameliorates angiotensin II-induced hypertension and renal damage in rats. *Hypertension* **52**, 1084-1090.
623. Rajapakse,N.W. and Mattson,D.L. (2009) Role of L-arginine in nitric oxide production in health and hypertension. *Clin Exp.Pharmacol.Physiol* **36**, 249-255.

624. Randle,P.J. (1993) Glucokinase and candidate genes for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* **36**, 269-275.
625. Rao,G.N. and Berk,B.C. (1992) Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ.Res.* **70**, 593-599.
626. Rathaus,M. and Bernheim,J. (2002) Oxygen species in the microvascular environment: regulation of vascular tone and the development of hypertension. *Nephrol.Dial.Transplant.* **17**, 216-221.
627. Ravelli,A.C., van der Meulen,J.H., Michels,R.P. et al. (1998) Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* **351**, 173-177.
628. Reaven GM (1988) Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**, 1595-1607.
629. Reddy,V.P., Zhu,X., Perry,G. and Smith,M.A. (2009) Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers.Dis.* **16**, 763-774.
630. Redon,J., Oliva,M.R., Tormos,C. et al. (2003) Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension* **41**, 1096-1101.
631. Rees,W.D., Hay,S.M., Brown,D.S., Antipatis,C. and Palmer,R.M. (2000) Maternal protein deficiency causes hypermethylation of DNA in the livers of rat fetuses. *J Nutr.* **130**, 1821-1826.
632. Remuzzi,A., Viberti,G., Ruggenti,P., Battaglia,C., Pagni,R. and Remuzzi,G. (1990) Glomerular response to hyperglycemia in human diabetic nephropathy. *Am.J.Physiol* **259**, F545-F552.
633. Rey,F.E. and Pagano,P.J. (2002) The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **22**, 1962-1971.
634. Reynolds,R.M., Walker,B.R., Syddall,H.E. et al. (2001) Altered control of cortisol secretion in adult men with low birth weight and cardiovascular risk factors. *J Clin Endocrinol.Metab* **86**, 245-250.
635. Rich-Edwards,J.W., Kleinman,K., Michels,K.B. et al. (2005) Longitudinal study of birth weight and adult body mass index in predicting risk of coronary heart disease and stroke in women. *BMJ* **330**, 1115.
636. Riggs AD, Martiensen RA and Russo VE (1996) Introduction. In *Epigenetics Mechanisms of Gene Regulation* (Russo VE, Martiensen RA and Riggs AD, eds.), pp. 1-4, Cold Spring Harbor Lab Press, Plainview,NY
637. Rimm,E.B., Stampfer,M.J., Ascherio,A., Giovannucci,E., Colditz,G.A. and Willett,W.C. (1993) Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N.Engl.J Med* **328**, 1450-1456.

638. Roberts,L.J. and Morrow,J.D. (2000) Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic.Biol.Med* **28**, 505-513.
639. Robertson,R.P. (2004) Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol.Chem.* **279**, 42351-42354.
640. Robertson,R.P., Harmon,J., Tran,P.O., Tanaka,Y. and Takahashi,H. (2003) Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* **52**, 581-587.
641. Rodriguez,M.M., Gomez,A.H., Abitbol,C.L., Chandar,J.J., Duara,S. and Zilleruelo,G.E. (2004) Histomorphometric analysis of postnatal glomerulogenesis in extremely preterm infants. *Pediatr.Dev.Pathol.* **7**, 17-25.
642. Roghair,R.D., Lamb,F.S., Miller,F.J., Jr., Scholz,T.D. and Segar,J.L. (2005) Early gestation dexamethasone programs enhanced postnatal ovine coronary artery vascular reactivity. *Am.J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **288**, R46-R53.
643. Roghair,R.D., Segar,J.L., Sharma,R.V. et al. (2005) Newborn lamb coronary artery reactivity is programmed by early gestation dexamethasone before the onset of systemic hypertension. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **289**, R1169-R1176.
644. Rolland,P.H., Friggi,A., Barlatier,A. et al. (1995) Hyperhomocysteinemia-induced vascular damage in the minipig. Captopril-hydrochlorothiazide combination prevents elastic alterations. *Circulation* **91**, 1161-1174.
645. Rolo,A.P. and Palmeira,C.M. (2006) Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **212**, 167-178.
646. Roseboom,T.J., van der Meulen,J.H., Ravelli,A.C., Osmond,C., Barker,D.J. and Bleker,O.P. (2001) Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol.Cell Endocrinol.* **185**, 93-98.
647. Roseboom,T.J., van der Meulen,J.H., Ravelli,A.C. et al. (1999) Blood pressure in adults after prenatal exposure to famine. *J Hypertens.* **17**, 325-330.
648. Roseboom,T.J., van der Meulen,J.H., van Montfrans,G.A. et al. (2001) Maternal nutrition during gestation and blood pressure in later life. *J Hypertens.* **19**, 29-34.
649. Rosella,G., Zajac,J.D., Kaczmarczyk,S.J., Andrikopoulos,S. and Proietto,J. (1993) Impaired suppression of gluconeogenesis induced by overexpression of a noninsulin-responsive phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol.Endocrinol.* **7**, 1456-1462.
650. Rossitch E Jr, Alexander,E., III, Black,P.M. and Cooke,J.P. (1991) L-arginine normalizes endothelial function in cerebral vessels from hypercholesterolemic rabbits. *J Clin Invest* **87**, 1295-1299.

651. Rothe,G. and Valet,G. (1990) Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescin. *J Leukoc.Biol.* **47**, 440-448.
652. Rotruck,J.T., Pope,A.L., Ganther,H.E., Swanson,A.B., Hafeman,D.G. and Hoekstra,W.G. (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* **179**, 588-590.
653. Roveri,A., Casasco,A., Maiorino,M., Dalan,P., Calligaro,A. and Ursini,F. (1992) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J Biol.Chem.* **267**, 6142-6146.
654. Roveri,A., Maiorino,M. and Ursini,F. (1994) Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **233**, 202-212.
655. Rozenberg,O., Shih,D.M. and Aviram,M. (2005) Paraoxonase 1 (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice. *Atherosclerosis* **181**, 9-18.
656. Rudich,A., Tirosh,A., Potashnik,R., Hemi,R., Kanety,H. and Bashan,N. (1998) Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **47**, 1562-1569.
657. Ruef,J., Rao,G.N., Li,F. et al. (1998) Induction of rat aortic smooth muscle cell growth by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Circulation* **97**, 1071-1078.
658. Rush,J.W., Denniss,S.G. and Graham,D.A. (2005) Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. *Can.J Appl.Physiol* **30**, 442-474.
659. Sadrzadeh,S.M. and Eaton,J.W. (1988) Hemoglobin-mediated oxidant damage to the central nervous system requires endogenous ascorbate. *J Clin Invest* **82**, 1510-1515.
660. Safar,M.E., Simon,A.C. and Levenson,J.A. (1984) Structural changes of large arteries in sustained essential hypertension. *Hypertension* **6**, III117-III121.
661. Sakamoto,H., Imai,H. and Nakagawa,Y. (2000) Involvement of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the modulation of prostaglandin D2 synthesis. *J Biol.Chem.* **275**, 40028-40035.
662. Sakuma,S., Fujimoto,Y., Sakamoto,Y. et al. (1997) Peroxynitrite induces the conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in rabbit liver. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **230**, 476-479.

663. Salt, I.P., Morrow, V.A., Brandie, F.M., Connell, J.M. and Petrie, J.R. (2003) High glucose inhibits insulin-stimulated nitric oxide production without reducing endothelial nitric-oxide synthase Ser1177 phosphorylation in human aortic endothelial cells. *J Biol.Chem.* **278**, 18791-18797.
664. Saltzman, H.A. and Fridovich, I. (1973) Editorial: Oxygen toxicity. Introduction to a protective enzyme: superoxide dismutase. *Circulation* **48**, 921-923.
665. Sampson, M.J., Winterbone, M.S., Hughes, J.C., Dozio, N. and Hughes, D.A. (2006) Monocyte telomere shortening and oxidative DNA damage in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **29**, 283-289.
666. Samuelsson, A.M., Matthews, P.A., Argenton, M. et al. (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**, 383-392.
667. San, M.A., Du, P., Dikalova, A. et al. (2007) Reactive oxygen species-selective regulation of aortic inflammatory gene expression in Type 2 diabetes. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* **292**, H2073-H2082.
668. Sarma, H.N., Manikkam, M., Herkimer, C. et al. (2005) Fetal programming: excess prenatal testosterone reduces postnatal luteinizing hormone, but not follicle-stimulating hormone responsiveness, to estradiol negative feedback in the female. *Endocrinology* **146**, 4281-4291.
669. Satoh, M., Haruna, Y., Fujimoto, S., Sasaki, T. and Kashihara, N. (2010) Telmisartan improves endothelial dysfunction and renal autoregulation in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens.Res* **33**, 135-142.
670. Savino, F., Costamagna, M., Prino, A., Oggero, R. and Silvestro, L. (2002) Leptin levels in breast-fed and formula-fed infants. *Acta Paediatr.* **91**, 897-902.
671. Sayre, L.M., Lin, D., Yuan, Q., Zhu, X. and Tang, X. (2006) Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one. *Drug Metab Rev.* **38**, 651-675.
672. Schafer, F.Q. and Buettner, G.R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic.Biol.Med* **30**, 1191-1212.
673. Schieffer, B., Luchtefeld, M., Braun, S., Hilfiker, A., Hilfiker-Kleiner, D. and Drexler, H. (2000) Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction. *Circ.Res* **87**, 1195-1201.
674. Schlatmann, T.J. and Becker, A.E. (1977) Pathogenesis of dissecting aneurysm of aorta. Comparative histopathologic study of significance of medial changes. *Am.J.Cardiol.* **39**, 21-26.

675. Schmidt,I.M., Chellakooty,M., Boisen,K.A. et al. (2005) Impaired kidney growth in low-birth-weight children: distinct effects of maturity and weight for gestational age. *Kidney Int.* **68**, 731-740.
676. Schnackenberg,C.G., Welch,W.J. and Wilcox,C.S. (1998) Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* **32**, 59-64.
677. Schreck,R., Albermann,K. and Baeuerle,P.A. (1992) Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic.Res Commun.* **17**, 221-237.
678. Schreuder,M.F., van Wijk,J.A. and Delemarre-van de Waal HA (2006) Intrauterine growth restriction increases blood pressure and central pulse pressure measured with telemetry in aging rats. *J Hypertens.* **24**, 1337-1343.
679. Seckl,J.R. (2001) Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms. *Mol.Cell Endocrinol.* **185**, 61-71.
680. Selak,M.A., Storey,B.T., Peterside,I. and Simmons,R.A. (2003) Impaired oxidative phosphorylation in skeletal muscle of intrauterine growth-retarded rats. *Am.J Physiol Endocrinol.Metab* **285**, E130-E137.
681. Senior,R.M., Griffin,G.L., Fliszar,C.J., Shapiro,S.D., Goldberg,G.I. and Welgus,H.G. (1991) Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol.Chem.* **266**, 7870-7875.
682. Shajania A.M. Folic acid and vitamin B12 deficiency in pregnancy and in the neonatal period. *Clin Perinatol* **11**, 433-459. 1984.
683. Shams,M., Kilby,M.D., Somerset,D.A. et al. (1998) 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. *Hum.Reprod.* **13**, 799-804.
684. Shen,S.J., Wang,C.Y., Nelson,K.K., Jansen,M. and Ilan,J. (1986) Expression of insulin-like growth factor II in human placentas from normal and diabetic pregnancies. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **83**, 9179-9182.
685. Shepherd,P.R., Crowther,N.J., Desai,M., Hales,C.N. and Ozanne,S.E. (1997) Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *Br.J Nutr.* **78**, 121-129.
686. Sherman,R.C. and Langley-Evans,S.C. (2000) Antihypertensive treatment in early postnatal life modulates prenatal dietary influences upon blood pressure in the rat. *Clin Sci (Lond)* **98**, 269-275.
687. Shiell,A.W., Campbell,D.M., Hall,M.H. and Barker,D.J. (2000) Diet in late pregnancy and glucose-insulin metabolism of the offspring 40 years later. *BJOG.* **107**, 890-895.

688. Shinozaki,K., Kashiwagi,A., Nishio,Y. et al. (1999) Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothélium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂- imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes* **48**, 2437-2445.
689. Shinozaki,K., Nishio,Y., Okamura,T. et al. (2000) Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. *Circ.Res* **87**, 566-573.
690. Shoelson,S.E., Lee,J. and Goldfine,A.B. (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* **116**, 1793-1801.
691. Shull,S., Heintz,N.H., Periasamy,M. et al. (1991) Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol.Chem.* **266**, 24398-24403.
692. Shulman,G.I. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J.Clin.Invest* **106**, 171-176.
693. Sies,H. (1991) Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin.Wochenschr.* **69**, 965-968.
694. Sies,H. and Cadenas,E. (1985) Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci* **311**, 617-631.
695. Siewert-Delle,A. and Ljungman,S. (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**, 946-953.
696. Silveira,P.P., Portella,A.K., Goldani,M.Z. and Barbieri,M.A. (2007) Developmental origins of health and disease (DOHaD). *J.Pediatr.(Rio J.)* **83**, 494-504.
697. Silver,F.H., Christiansen,D.L. and Buntin,C.M. (1989) Mechanical properties of the aorta: a review. *Crit Rev.Biomed.Eng* **17**, 323-358.
698. Simmons,R.A., Templeton,L.J. and Gertz,S.J. (2001) Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* **50**, 2279-2286.
699. Simpson A, Mortimer JG, Silva PA, Spears G and William S (1981) Hypertension in the young and old. In (Onesti G and Kim KE, eds.), pp. 153-163, Grune and Stratton, New York.
700. Singh,R.R., Denton,K.M., Bertram,J.F. et al. (2009) Development of cardiovascular disease due to renal insufficiency in male sheep following fetal unilateral nephrectomy. *J Hypertens.* **27**, 386-396.
701. Singhal,A., Cole,T.J., Fewtrell,M., Deanfield,J. and Lucas,A. (2004) Is slower early growth beneficial for long-term cardiovascular health? *Circulation* **109**, 1108-1113.

702. Singhal,A., Cole,T.J. and Lucas,A. (2001) Early nutrition in preterm infants and later blood pressure: two cohorts after randomised trials. *Lancet* **357**, 413-419.
703. Skott,P., Vaag,A., Hother-Nielsen,O. et al. (1991) Effects of hyperglycaemia on kidney function, atrial natriuretic factor and plasma renin in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand.J.Clin.Lab Invest* **51**, 715-727.
704. Sloboda,D.M., Moss,T.J., Gurrin,L.C., Newnham,J.P. and Challis,J.R. (2002) The effect of prenatal betamethasone administration on postnatal ovine hypothalamic-pituitary-adrenal function. *J Endocrinol.* **172**, 71-81.
705. Sohn,H.Y., Krotz,F., Gloe,T. et al. (2003) Differential regulation of xanthine and NAD(P)H oxidase by hypoxia in human umbilical vein endothelial cells. Role of nitric oxide and adenosine. *Cardiovasc Res* **58**, 638-646.
706. Sosenko,I.R. and Frank,L. (1991) Nutritional influences on lung development and protection against chronic lung disease. *Semin.Perinatol* **15**, 462-468.
707. Soto,N., Bazaes,R.A., Pena,V. et al. (2003) Insulin sensitivity and secretion are related to catch-up growth in small-for-gestational-age infants at age 1 year: results from a prospective cohort. *J.Clin Endocrinol.Metab* **88**, 3645-3650.
708. Spiekermann,S., Landmesser,U., Dikalov,S. et al. (2003) Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothélium-dependent vasodilation. *Circulation* **107**, 1383-1389.
709. Spyrou,G., Enmark,E., Miranda-Vizuete,A. and Gustafsson,J. (1997) Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J Biol.Chem.* **272**, 2936-2941.
710. Srinivasan,M., Aalinkeel,R., Song,F. and Patel,M.S. (2003) Programming of islet functions in the progeny of hyperinsulinemic/obese rats. *Diabetes* **52**, 984-990.
711. Stadtman,E.R. (2006) Protein oxidation and aging. *Free Radic.Res* **40**, 1250-1258.
712. Staels,B., Koenig,W., Habib,A. et al. (1998) Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* **393**, 790-793.
713. Stampfer,M.J., Hennekens,C.H., Manson,J.E., Colditz,G.A., Rosner,B. and Willett,W.C. (1993) Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N.Engl.J Med* **328**, 1444-1449.
714. Staszewska-Barczak,J. and Vane,J.R. (1967) The release of catecholamines from the adrenal medulla by peptides. *Br.J Pharmacol.Chemother.* **30**, 655-667.
715. Stein,C.E., Fall,C.H., Kumaran,K., Osmond,C., Cox,V. and Barker,D.J. (1996) Fetal growth and coronary heart disease in south India. *Lancet* **348**, 1269-1273.

716. Stettler,N., Kumanyika,S.K., Katz,S.H., Zemel,B.S. and Stallings,V.A. (2003) Rapid weight gain during infancy and obesity in young adulthood in a cohort of African Americans. *Am.J.Clin Nutr.* **77**, 1374-1378.
717. Stettler,N., Stallings,V.A., Troxel,A.B. et al. (2005) Weight gain in the first week of life and overweight in adulthood: a cohort study of European American subjects fed infant formula. *Circulation* **111**, 1897-1903.
718. Stettler,N., Zemel,B.S., Kumanyika,S. and Stallings,V.A. (2002) Infant weight gain and childhood overweight status in a multicenter, cohort study. *Pediatrics* **109**, 194-199.
719. Stich,V. and Berlan,M. (2004) Physiological regulation of NEFA availability: lipolysis pathway. *Proc.Nutr.Soc.* **63**, 369-374.
720. Stocker,C.J., Arch,J.R. and Cawthorne,M.A. (2005) Fetal origins of insulin resistance and obesity. *Proc.Nutr.Soc.* **64**, 143-151.
721. Stocker,R. and Keaney,J.F., Jr. (2004) Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* **84**, 1381-1478.
722. Stocker,R. and Perrella,M.A. (2006) Heme oxygenase-1: a novel drug target for atherosclerotic diseases? *Circulation* **114**, 2178-2189.
723. Stolk,J., Rossie,W. and Dijkman,J.H. (1994) Apocynin improves the efficacy of secretory leukocyte protease inhibitor in experimental emphysema. *Am.J Respir.Crit Care Med* **150**, 1628-1631.
724. Street,M.E., Seghini,P., Fieni,S. et al. (2006) Changes in interleukin-6 and IGF system and their relationships in placenta and cord blood in newborns with fetal growth restriction compared with controls. *Eur.J Endocrinol.* **155**, 567-574.
725. Stroes,E., Kastelein,J., Cosentino,F. et al. (1997) Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J.Clin.Invest* **99**, 41-46.
726. Stuehr,D., Pou,S. and Rosen,G.M. (2001) Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J.Biol.Chem.* **276**, 14533-14536.
727. Stuehr,D.J. and Griffith,O.W. (1992) Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol.Relat Areas Mol.Biol.* **65**, 287-346.
728. Suh,Y.A., Arnold,R.S., Lassegue,B. et al. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **401**, 79-82.
729. Sun,X.J. and Liu,F. (2009) Phosphorylation of IRS proteins Yin-Yang regulation of insulin signaling. *Vitam.Horm.* **80**, 351-387.
730. Sun,Y., Liu,S., Ferguson,S. et al. (2002) Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. *J Biol.Chem.* **277**, 23301-23307.

731. Suzuki,H., Swei,A., Zweifach,B.W. and Schmid-Schonbein,G.W. (1995) In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension* **25**, 1083-1089.
732. Sydow,K. and Munzel,T. (2003) ADMA and oxidative stress. *Atheroscler.Suppl* **4**, 41-51.
733. Symonds,M.E., Sebert,S.P., Hyatt,M.A. and Budge,H. (2009) Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nat.Rev Endocrinol.* **5**, 604-610.
734. Tabacova,S., Little,R., Tsong,Y., Vega,A. and Kimmel,C.A. (2003) Adverse pregnancy outcomes associated with maternal enalapril antihypertensive treatment. *Pharmacoepidemiol.Drug Saf* **12**, 633-646.
735. Takimoto,H., Mito,N., Umegaki,K. et al. (2007) Relationship between dietary folate intakes, maternal plasma total homocysteine and B-vitamins during pregnancy and fetal growth in Japan. *Eur.J Nutr.* **46**, 300-306.
736. Talior,I., Yarkoni,M., Bashan,N. and Eldar-Finkelman,H. (2003) Increased glucose uptake promotes oxidative stress and PKC-delta activation in adipocytes of obese, insulin-resistant mice. *Am.J Physiol Endocrinol.Metab* **285**, E295-E302.
737. Tan,A.L., Forbes,J.M. and Cooper,M.E. (2007) AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Semin.Nephrol.* **27**, 130-143.
738. Tan,K.C., Chow,W.S., Ai,V.H., Metz,C., Bucala,R. and Lam,K.S. (2002) Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **25**, 1055-1059.
739. Tanito,M., Nakamura,H., Kwon,Y.W. et al. (2004) Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats. *Antioxid.Redox.Signal.* **6**, 89-97.
740. Tannirandorn,Y., Fisk,N.M., Shah,V., Dillon,M.J., Nicolini,U. and Rodeck,C.H. (1990) Plasma renin activity in fetal disease. *J Perinat.Med* **18**, 229-231.
741. Tanti,J.F., Grillo,S., Gremeaux,T., Coffey,P.J., Van,O.E. and Le Marchand-Brustel,Y. (1997) Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology* **138**, 2005-2010.
742. Tarpey,M.M. (2002) Sepiapterin treatment in atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **22**, 1519-1521.
743. Tarry-Adkins,J.L., Chen,J.H., Smith,N.S., Jones,R.H., Cherif,H. and Ozanne,S.E. (2009) Poor maternal nutrition followed by accelerated postnatal growth leads to telomere shortening and increased markers of cell senescence in rat islets. *FASEB J* **23**, 1521-1528.

744. Tauzin,L., Risso,F., Buffat,C., Serra,G. and Simeoni,U. (2005) Vascular mechanisms in the developmental programming of cardio-vascular disease. *Pediatr.Med.Chir* **27**, 18-23.
745. Taylor,S.J., Whincup,P.H., Cook,D.G., Papacosta,O. and Walker,M. (1997) Size at birth and blood pressure: cross sectional study in 8-11 year old children. *BMJ* **314**, 475-480.
746. Tenhunen,R., Marver,H.S. and Schmid,R. (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **61**, 748-755.
747. Thomsen,L.L., Ching,L.M. and Baguley,B.C. (1990) Evidence for the production of nitric oxide by activated macrophages treated with the antitumor agents flavone-8-acetic acid and xanthenone-4-acetic acid. *Cancer Res.* **50**, 6966-6970.
748. Thureen,P.J. (2007) The neonatologist's dilemma: catch-up growth or beneficial undernutrition in very low birth weight infants-what are optimal growth rates? *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* **45 Suppl 3**, S152-S154.
749. Tiefenbacher,C.P., Chilian,W.M., Mitchell,M. and DeFily,D.V. (1996) Restoration of endothelium-dependent vasodilation after reperfusion injury by tetrahydrobiopterin. *Circulation* **94**, 1423-1429.
750. Torrens,C., Brawley,L., Anthony,F.W. et al. (2006) Folate supplementation during pregnancy improves offspring cardiovascular dysfunction induced by protein restriction. *Hypertension* **47**, 982-987.
751. Torzewski,M., Ochsenschirt,V., Kleschyov,A.L. et al. (2007) Deficiency of glutathione peroxidase-1 accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **27**, 850-857.
752. Touyz,R.M. (2000) Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr.Hypertens.Rep* **2**, 98-105.
753. Touyz,R.M. (2003) Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension. *Expert.Rev.Cardiovasc Ther.* **1**, 91-106.
754. Touyz,R.M. (2004) Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz.J Med Biol.Res* **37**, 1263-1273.
755. Touyz,R.M., Chen,X., Tabet,F. et al. (2002) Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ.Res.* **90**, 1205-1213.
756. Touyz,R.M. and Schiffrin,E.L. (1999) Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **34**, 976-982.

757. Touyz,R.M. and Schiffrin,E.L. (2000) Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol.Rev.* **52**, 639-672.
758. Touyz,R.M., Tabet,F. and Schiffrin,E.L. (2003) Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp.Pharmacol.Physiol* **30**, 860-866.
759. Touyz,R.M., Wu,X.H., He,G., Salomon,S. and Schiffrin,E.L. (2002) Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased C-terminal Src kinase activity in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **39**, 479-485.
760. Touyz,R.M., Yao,G., Quinn,M.T., Pagano,P.J. and Schiffrin,E.L. (2005) p47phox associates with the cytoskeleton through cortactin in human vascular smooth muscle cells: role in NAD(P)H oxidase regulation by angiotensin II. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **25**, 512-518.
761. Touyz,R.M., Yao,G. and Schiffrin,E.L. (2003) c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **23**, 981-987.
762. Touyz,R.M., Yao,G., Viel,E., Amiri,F. and Schiffrin,E.L. (2004) Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens.* **22**, 1141-1149.
763. Trollet,M.R., Rudd,M.A. and Loscalzo,J. (2001) Oxidative stress and renal dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Kidney Blood Press Res* **24**, 116-123.
764. Tsan,M.F., White,J.E., Treanor,C. and Shaffer,J.B. (1990) Molecular basis for tumor necrosis factor-induced increase in pulmonary superoxide dismutase activities. *Am.J Physiol* **259**, L506-L512.
765. Turrens,J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**, 335-344.
766. Tuttle,K.R., Bruton,J.L., Perusek,M.C., Lancaster,J.L., Kopp,D.T. and DeFronzo,R.A. (1991) Effect of strict glycemic control on renal hemodynamic response to amino acids and renal enlargement in insulin-dependent diabetes mellitus. *N.Engl J.Med* **324**, 1626-1632.
767. Tward,A., Xia,Y.R., Wang,X.P. et al. (2002) Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* **106**, 484-490.
768. Uchida,K. (2003) 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog.Lipid Res* **42**, 318-343.

769. Ulick,S., Levine,L.S., Gunczler,P. et al. (1979) A syndrome of apparent mineralocorticoid excess associated with defects in the peripheral metabolism of cortisol. *J Clin Endocrinol.Metab* **49**, 757-764.
770. Ullrich,V. and Kissner,R. (2006) Redox signaling: bioinorganic chemistry at its best. *J Inorg.Biochem.* **100**, 2079-2086.
771. Uno,H., Eisele,S., Sakai,A. et al. (1994) Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm.Behav.* **28**, 336-348.
772. Urakami-Harasawa,L., Shimokawa,H., Nakashima,M., Egashira,K. and Takeshita,A. (1997) Importance of endothélium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest* **100**, 2793-2799.
773. Ursini,F., Maiorino,M. and Gregolin,C. (1985) The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim.Biophys.Acta* **839**, 62-70.
774. Ursini,F., Maiorino,M., Valente,M., Ferri,L. and Gregolin,C. (1982) Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim.Biophys.Acta* **710**, 197-211.
775. Ushio-Fukai,M. (2006) Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res* **71**, 226-235.
776. Ushio-Fukai,M., Griendling,K.K., Becker,P.L., Hilenski,L., Halleran,S. and Alexander,R.W. (2001) Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **21**, 489-495.
777. Valenzuela,A. (1991) The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci* **48**, 301-309.
778. Valera,A., Pujol,A., Pelegrin,M. and Bosch,F. (1994) Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* **91**, 9151-9154.
779. Valinluck,V., Tsai,H.H., Rogstad,D.K., Burdzy,A., Bird,A. and Sowers,L.C. (2004) Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* **32**, 4100-4108.
780. Valle,M.M., Graciano,M.F., Lopes de Oliveira,E.R. et al. (2010) Alterations of NADPH Oxidase Activity in Rat Pancreatic Islets Induced by a High-Fat Diet. *Pancreas*.
781. Van Etten,R.W., de Koning,E.J., Verhaar,M.C., Gaillard,C.A. and Rabelink,T.J. (2002) Impaired NO-dependent vasodilation in patients with Type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus is restored by acute administration of folate. *Diabetologia* **45**, 1004-1010.

782. Van,D.V., I (2002) Genetic effects of methylation diets. *Annu.Rev.Nutr.* **22**, 255-282.
783. Vasquez-Vivar,J., Kalyanaraman,B., Martasek,P. et al. (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 9220-9225.
784. Vaziri,N.D., Ni,Z. and Oveisi,F. (1998) Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **31**, 1248-1254.
785. Vehaskari,V.M. (2007) Developmental origins of adult hypertension: new insights into the role of the kidney. *Pediatr.Nephrol.* **22**, 490-495.
786. Vehaskari,V.M., Aviles,D.H. and Manning,J. (2001) Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int.* **59**, 238-245.
787. Vento,M., Aguar,M., Escobar,J. et al. (2009) Antenatal steroids and antioxidant enzyme activity in preterm infants: influence of gender and timing. *Antioxid.Redox.Signal.* **11**, 2945-2955.
788. Verhaar,M.C., Stroes,E. and Rabelink,T.J. (2002) Folates and cardiovascular disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **22**, 6-13.
789. Verhaar,M.C., Wever,R.M., Kastelein,J.J., van,D.T., Koomans,H.A. and Rabelink,T.J. (1998) 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation* **97**, 237-241.
790. Vickers,M.H. (2007) Developmental programming and adult obesity: the role of leptin. *Curr.Opin.Endocrinol.Diabetes Obes.* **14**, 17-22.
791. Viger,R.S., Silversides,D.W. and Tremblay,J.J. (2005) New insights into the regulation of mammalian sex determination and male sex differentiation. *Vitam.Horm.* **70**, 387-413.
792. Vikse,B.E., Irgens,L.M., Leivestad,T., Hallan,S. and Iversen,B.M. (2008) Low birth weight increases risk for end-stage renal disease. *J Am.Soc.Nephrol.* **19**, 151-157.
793. Viridis,A., Iglarz,M., Neves,M.F. et al. (2003) Effect of hyperhomocystinemia and hypertension on endothelial function in methylenetetrahydrofolate reductase-deficient mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **23**, 1352-1357.
794. Viridis,A., Neves,M.F., Amiri,F., Viel,E., Touyz,R.M. and Schiffrin,E.L. (2002) Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension* **40**, 504-510.

795. Vohr,B.R. and Boney,C.M. (2008) Gestational diabetes: the forerunner for the development of maternal and childhood obesity and metabolic syndrome? *J Matern.Fetal Neonatal Med* **21**, 149-157.
796. Vuguin,P., Raab,E., Liu,B., Barzilai,N. and Simmons,R. (2004) Hepatic insulin resistance precedes the development of diabetes in a model of intrauterine growth retardation. *Diabetes* **53**, 2617-2622.
797. Vulliamy,T.J. (2009) Premature aging. *Cell Mol.Life Sci* **66**, 3091-3094.
798. Wadsworth,M.E., Cripps,H.A., Midwinter,R.E. and Colley,J.R. (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**, 1534-1538.
799. Wallace,D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**, 1482-1488.
800. Walsh,S.W., Wang,Y. and Jesse,R. (1993) Peroxide induces vasoconstriction in the human placenta by stimulating thromboxane. *Am.J Obstet Gynecol* **169**, 1007-1012.
801. Walther,F.J., Jobe,A.H. and Ikegami,M. (1998) Repetitive prenatal glucocorticoid therapy reduces oxidative stress in the lungs of preterm lambs. *J Appl.Physiol* **85**, 273-278.
802. Wang,D., Yu,X., Cohen,R.A. and Brecher,P. (2000) Distinct effects of N-acetylcysteine and nitric oxide on angiotensin II-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation and intracellular Ca(2+) levels. *J Biol.Chem.* **275**, 12223-12230.
803. Wang,X., Desai,K., Chang,T. and Wu,L. (2005) Vascular methylglyoxal metabolism and the development of hypertension. *J.Hypertens.* **23**, 1565-1573.
804. Waring,W.S., Thomson,A.J., Adwani,S.H. et al. (2003) Cardiovascular effects of acute oxygen administration in healthy adults. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **42**, 245-250.
805. Warnes,K.E., Coulter,C.L., Robinson,J.S. and McMillen,I.C. (2003) The effect of intrafetal infusion of metyrapone on arterial blood pressure and on the arterial blood pressure response to angiotensin II in the sheep fetus during late gestation. *J.Physiol* **552**, 621-633.
806. Warnholtz,A., Nickenig,G., Schulz,E. et al. (1999) Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* **99**, 2027-2033.
807. Wascher,T.C., Posch,K., Wallner,S., Hermetter,A., Kostner,G.M. and Graier,W.F. (1997) Vascular effects of L-arginine: anything beyond a substrate for the NO-synthase? *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **234**, 35-38.

808. Wassmann,S., Wassmann,K. and Nickenig,G. (2004) Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* **44**, 381-386.
809. Waterland,R.A. and Garza,C. (1999) Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am.J.Clin Nutr.* **69**, 179-197.
810. Watts,G.F. and Playford,D.A. (1998) Dyslipoproteinaemia and hyperoxidative stress in the pathogenesis of endothelial dysfunction in non-insulin dependent diabetes mellitus: an hypothesis. *Atherosclerosis* **141**, 17-30.
811. Watts,S.W., Rondelli,C., Thakali,K. et al. (2007) Morphological and biochemical characterization of remodeling in aorta and vena cava of DOCA-salt hypertensive rats. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* **292**, H2438-H2448.
812. Weaver,I.C., Cervoni,N., Champagne,F.A. et al. (2004) Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat.Neurosci.* **7**, 847-854.
813. Weaver,L.T. (2006) Rapid growth in infancy: balancing the interests of the child. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* **43**, 428-432.
814. Weber,K.T., Sun,Y., Guarda,E. et al. (1995) Myocardial fibrosis in hypertensive heart disease: an overview of potential regulatory mechanisms. *Eur.Heart J.* **16 Suppl C**, 24-28.
815. Weisiger,R.A. and Fridovich,I. (1973) Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol.Chem.* **248**, 4793-4796.
816. Weitz,G., Deckert,P., Heindl,S., Struck,J., Perras,B. and Dodt,C. (2003) Evidence for lower sympathetic nerve activity in young adults with low birth weight. *J Hypertens.* **21**, 943-950.
817. Welberg,L.A. and Seckl,J.R. (2001) Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol.* **13**, 113-128.
818. Wennmalm,A., Lanne,B. and Petersson,A.S. (1990) Detection of endothelial-derived relaxing factor in human plasma in the basal state and following ischemia using electron paramagnetic resonance spectrometry. *Anal.Biochem.* **187**, 359-363.
819. Wenzel,P. and Munzel,T. (2009) From menace to marvel: high-density lipoprotein prevents endothelial nitric oxide synthase uncoupling in diabetes mellitus by angiotensin II type 1 receptor downregulation. *Hypertension* **53**, 587-589.
820. Werner,E.R., Gorren,A.C., Heller,R., Werner-Felmayer,G. and Mayer,B. (2003) Tetrahydrobiopterin and nitric oxide: mechanistic and pharmacological aspects. *Exp.Biol.Med (Maywood.)* **228**, 1291-1302.

821. White,C.W., Ghezzi,P., McMahon,S., Dinarello,C.A. and Repine,J.E. (1989) Cytokines increase rat lung antioxidant enzymes during exposure to hyperoxia. *J Appl.Physiol* **66**, 1003-1007.
822. Whorwood,C.B., Firth,K.M., Budge,H. and Symonds,M.E. (2001) Maternal undernutrition during early to midgestation programs tissue-specific alterations in the expression of the glucocorticoid receptor, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms, and type 1 angiotensin ii receptor in neonatal sheep. *Endocrinology* **142**, 2854-2864.
823. Wilcox,C.S. (2002) Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. *Curr.Hypertens.Rep* **4**, 160-166.
824. Wilkinson,I.B., Franklin,S.S. and Cockcroft,J.R. (2004) Nitric oxide and the regulation of large artery stiffness: from physiology to pharmacology. *Hypertension* **44**, 112-116.
825. Williams,S., St,G., I and Silva,P.A. (1992) Intrauterine growth retardation and blood pressure at age seven and eighteen. *J Clin Epidemiol.* **45**, 1257-1263.
826. Wills,J., Watson,J.M., Hales,C.N. and Phillips,D.I. (1996) The relation of fetal growth to insulin secretion in young men. *Diabet.Med.* **13**, 773-774.
827. Wilson,A.C., Forsyth,J.S., Greene,S.A., Irvine,L., Hau,C. and Howie,P.W. (1998) Relation of infant diet to childhood health: seven year follow up of cohort of children in Dundee infant feeding study. *BMJ* **316**, 21-25.
828. Wilson,M.R. and Hughes,S.J. (1997) The effect of maternal protein deficiency during pregnancy and lactation on glucose tolerance and pancreatic islet function in adult rat offspring. *J Endocrinol.* **154**, 177-185.
829. Winick,M. and Noble,A. (1965) Quantitative changes in DNA, RNA, and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Dev.Biol.* **12**, 451-466.
830. Winick,M. and Noble,A. (1966) Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J.Nutr.* **89**, 300-306.
831. Wintour,E.M., Johnson,K., Koukoulas,I., Moritz,K., Tersteeg,M. and Dodic,M. (2003) Programming the cardiovascular system, kidney and the brain--a review. *Placenta* **24 Suppl A**, S65-S71.
832. Wintour,E.M., Moritz,K.M., Johnson,K., Ricardo,S., Samuel,C.S. and Dodic,M. (2003) Reduced nephron number in adult sheep, hypertensive as a result of prenatal glucocorticoid treatment. *J Physiol* **549**, 929-935.
833. Witting,P.K., Mohr,D. and Stocker,R. (1999) Assessment of prooxidant activity of vitamin E in human low-density lipoprotein and plasma. *Methods Enzymol.* **299**, 362-375.

834. Woelk,G., Emanuel,I., Weiss,N.S. and Psaty,B.M. (1998) Birthweight and blood pressure among children in Harare, Zimbabwe. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed* **79**, F119-F122.
835. Wolffenbuttel,B.H., Boulanger,C.M., Crijns,F.R. et al. (1998) Breakers of advanced glycation end products restore large artery properties in experimental diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 4630-4634.
836. Woo,K.S., Chook,P., Lolin,Y.I., Sanderson,J.E., Metreweli,C. and Celermajer,D.S. (1999) Folic acid improves arterial endothelial function in adults with hyperhomocystinemia. *J Am.Coll.Cardiol.* **34**, 2002-2006.
837. Woodall,S.M., Johnston,B.M., Breier,B.H. and Gluckman,P.D. (1996) Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr.Res* **40**, 438-443.
838. Woods,L.L., Ingelfinger,J.R., Nyengaard,J.R. and Rasch,R. (2001) Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr.Res* **49**, 460-467.
839. Woods,L.L., Ingelfinger,J.R. and Rasch,R. (2005) Modest maternal protein restriction fails to program adult hypertension in female rats. *Am.J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **289**, R1131-R1136.
840. Wu,L. and de,C.J. (1999) Effects of superoxide on signaling pathways in smooth muscle cells from rats. *Hypertension* **34**, 1247-1253.
841. Wu,L., Girouard,H. and de,C.J. (2000) Involvement of the cyclic GMP pathway in the superoxide-induced IP3 formation in vascular smooth muscle cells. *J Hypertens.* **18**, 1057-1064.
842. Wu,R., Millette,E., Wu,L. and de,C.J. (2001) Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J.Hypertens.* **19**, 741-748.
843. Xu,B., Moritz,J.T. and Epstein,P.N. (1999) Overexpression of catalase provides partial protection to transgenic mouse beta cells. *Free Radic.Biol.Med* **27**, 830-837.
844. Xu,P., Costa-Goncalves,A.C., Todiras,M. et al. (2008) Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension* **51**, 574-580.
845. Yam,J., Frank,L. and Roberts,R.J. (1978) Oxygen toxicity: comparison of lung biochemical responses in neonatal and adult rats. *Pediatr.Res* **12**, 115-119.
846. Yamamoto,Y. and Takahashi,K. (1993) Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides. *Arch.Biochem.Biophys.* **305**, 541-545.

847. Yamawaki,H., Haendeler,J. and Berk,B.C. (2003) Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis. *Circ.Res* **93**, 1029-1033.
848. Yang,H., Roberts,L.J., Shi,M.J. et al. (2004) Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ.Res* **95**, 1075-1081.
849. Yang,R. and Barouch,L.A. (2007) Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circ.Res* **101**, 545-559.
850. Yasmin, McEniery,C.M., Wallace,S. et al. (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**, 372.
851. Yasunari,K., Maeda,K., Nakamura,M. and Yoshikawa,J. (2002) Oxidative stress in leukocytes is a possible link between blood pressure, blood glucose, and C-reacting protein. *Hypertension* **39**, 777-780.
852. Yeh,L.H., Park,Y.J., Hansalia,R.J. et al. (1999) Shear-induced tyrosine phosphorylation in endothelial cells requires Rac1-dependent production of ROS. *Am.J Physiol* **276**, C838-C847.
853. Yoshida,J., Yamamoto,K., Mano,T. et al. (2004) AT1 receptor blocker added to ACE inhibitor provides benefits at advanced stage of hypertensive diastolic heart failure. *Hypertension* **43**, 686-691.
854. Zyzdorczyk,C., Comte,B., Cambonie,G. et al. (2008) Neonatal oxygen exposure in rats leads to cardiovascular and renal alterations in adulthood. *Hypertension* **52**, 889-895.
855. Zyzdorczyk,C., Gobeil,F., Jr., Cambonie,G. 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-R1068.
856. Zafari,A.M., Ushio-Fukai,M., Akers,M. et al. (1998) Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* **32**, 488-495.
857. Zalba,G., Beaumont,F.J., San,J.G. et al. (2000) Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **35**, 1055-1061.
858. Zalba,G., San,J.G., Beaumont,F.J., Fortunio,M.A., Fortunio,A. and Diez,J. (2001) Polymorphisms and promoter overactivity of the p22(phox) gene in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Circ.Res* **88**, 217-222.
859. Zalba,G., San,J.G., Moreno,M.U. et al. (2001) Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* **38**, 1395-1399.

860. Zeman,F.J. (1968) Effects of maternal protein restriction on the kidney of the newborn young of rats. *J.Nutr.* **94**, 111-116.
861. Zhang,Y., Griendling,K.K., Dikalova,A., Owens,G.K. and Taylor,W.R. (2005) Vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension is mediated by vascular smooth muscle cell-derived H₂O₂. *Hypertension* **46**, 732-737.
862. Zhavoronkova,E.N. and Vaniushin,B.F. (1987) [DNA methylation and interaction with glucocorticoid receptor complexes in the rat liver]. *Biokhimiia.* **52**, 870-877.
863. Zhou,M.S., Hernandez,S., I, Pagano,P.J., Jaimes,E.A. and Raij,L. (2006) Reduced NAD(P)H oxidase in low renin hypertension: link among angiotensin II, atherogenesis, and blood pressure. *Hypertension* **47**, 81-86.
864. Ziegler,D., Gries,F.A., Spuler,M. and Lessmann,F. (1992) The epidemiology of diabetic neuropathy. Diabetic Cardiovascular Autonomic Neuropathy Multicenter Study Group. *J.Diabetes Complications* **6**, 49-57.
865. Zimmerman,B.G., Liao,J.C. and Gisslen,J. (1971) Effect of phenoxybenzamine and combined administration of iproniazid and tropolone on catecholamine release elicited by renal sympathetic nerve stimulation. *J Pharmacol.Exp.Ther.* **176**, 603-610.
866. Zimmermann,H., Gardner,D.S., Jellyman,J.K., Fowden,A.L., Giussani,D.A. and Forhead,A.J. (2003) Effect of dexamethasone on pulmonary and renal angiotensin-converting enzyme concentration in fetal sheep during late gestation. *Am.J Obstet Gynecol* **189**, 1467-1471.
867. Zou,M.H., Shi,C. and Cohen,R.A. (2002) Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest* **109**, 817-826.