



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ-NANCY 1
1995

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 9 Mars 1995

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY 1

Mention Pharmacologie

par

Stéphane BOUTINET

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies en Pharmacologie

Sujet :

**Rôle du calcium intracellulaire dans la compli-
ance de l'artère carotide de rat ;
effets d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I.**

MEMBRES DU JURY



104 030032 2

- Président : Professeur J. Atkinson (Nancy)
- Juges : Docteur M.-A. Devynck, Directeur de Recherche CNRS (Paris) (rapporteur)
Docteur B. Lévy, Directeur de Recherche INSERM (Paris)
Docteur N. Morel, Première Assistante (Bruxelles, Belgique) (rapporteur)
Docteur C. Capdeville-Atkinson (Nancy) (directeur de thèse)
- Invités : Professeur B. Waeber (Lausanne, Suisse) (rapporteur)
Docteur A. Avolio, Senior Lecturer (Sydney, Australie) (rapporteur)

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY 1

Année Universitaire 1994/1995

Membres du personnel enseignant

DOYENC. VIGNERON

VICE DOYENG. CATAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BERNANOSE André	M. MIRJOLET Marcel
Mlle BESSON Suzanne	M. PIERFITTE Maurice
Mlle GIRARD Thérèse	M. RICHARD Georges
M. MEUNIER André	M. SOLEIL Jean

MAITRE DE CONFERENCES HONORAIRE

Mme BALDO Suzanne

PROFESSEURS

M. ATKINSON Jeffrey	Pharmacodynamie
M. BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, biotechnologies
Mlle BATT Anne Marie	Toxicologie
M. BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M. BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mlle GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M. HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M. JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M. KERGOSIEN Yannick	Mathématiques - Biophysique
M. LABRUDE Pierre	Physiologie
M. LALLOZ Lucien	Chimie Organique
M. LECTARD Pierre	Biologie végétale et Cryptogamie
M. LEMAY René	Droit et économie pharmaceutique
M. LOPPINET Vincent	Chimie thérapeutique
M. MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M. MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M. MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M. MORTIER François	Pharmacognosie
M. NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
Mme SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M. SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M. SIEST Gérard	Chimie biologique
M. VIGNERON Claude	Hématologie

PROFESSEURS ASSOCIES OU INVITES

M. BAVEYE
Mlle CHARGOIS Anne
M. BODMEIER Roland
M. ICHINO Kazuhiko
M. LADURON Pierre
M. SCHUVAEV
Mme STREIBLOVA Eva

MAITRES DE CONFERENCES

Mme ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M. BAUDOT Philippe	Toxicologie
Mme BENOIT Emmanuelle	Chimie analytique
M. BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
Mme CAPDEVILLE-ATKINSON Christine	Pharmacodynamie
M. CATAU Gérard	Pharmacodynamie
M. CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
Mme COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M. COULON Joël	Biochimie
M. DECOLIN Dominique	Chimie analytique
Mlle FAIVRE Béatrice	GBM - Hématologie
M. FERRARI Luc	Biochimie
Mme FRIANT-MICHEL Pascale	Biophysique et Mathématiques
Mme FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M. GHERMANI Nour-Eddine	Biophysique - Biomathématiques
Mlle HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
Mme HOFFMAN Marie Antoinette	Pharmacie clinique
M. HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mlle IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mlle LARTAUD Isabelle	Pharmacologie
Mme LEININGER MULLER Brigitte	Biochimie
M. LEROY Pierre	Chimie analytique
Mme LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M. MENU Patrick	Physiologie
M. MIGNOT Bernard	Physique
M. MONAL Jean Louis	Chimie thérapeutique
M. NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme PAULUS Francine	Informatique
Mme PERDIAKIS Christine	Chimie organique
Mme PICHON Virginie	Biophysique et Mathématiques
Mme POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M. VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES OU INVITES

M. BOIS Yves
Mme ARNAUD Françoise

PROFESSEUR AGREGE

M. COCHAUD Christophe Anglais

ASSISTANTS

Mme BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M. DANGIEN Bernard	Botanique
Mme MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme MOUREY Michèle	Cryptogamie
Mme PAVIS Annie	Parasitologie
M. TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie
Mme ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. DAHAOUI Slimane	Mathématiques - Informatique pharmaceutique
Mme MENDES-PELLERIN Christina	Biologie Cellulaire
Mlle UBRICH Nathalie	Mathématiques - Informatique pharmaceutique
M. VIARD Benoît	Biochimie

MONITEURS D'INITIATION A L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

Mlle EVRARD Anne	Biochimie clinique
M. HELDER Rémi	Physiologie - Hématologie
Mlle LEONARD Isabelle	Chimie analytique
Mlle MAGDALINIUK Sandrine	Biologie cellulaire
Mlle MAURICE Marie Hélène	Toxicologie

DOCTEURS HONORIS CAUSA

M. ANDERSON Norman G.	Illinois - USA
M. BETTOLO Marini	Rome - ITALIE
M. BLOCH Konrad E.	Massachusetts - USA
M. BOVET Daniel	Rome - ITALIE
M. DUTTON Geoffrey J.	Dundee - ECOSSE
M. GHUYSEN Jean Marie	Liège - BELGIQUE
M. HEIDELBERGER	New Jersey - USA
M. KOFOD Helmer	Copenhague - DANEMARK
M. PARRAS FARRAS Ramon	Barcelone - ESPAGNE

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. AZRIA	Pharmacologie
M. BARADEL	Conseils vétérinaires
Mme BLOCH	Gynécologie
M. CAMUZEUX	Hospitalisation à domicile
M. CHARPIGNON	Gestion, commercialisation
M. DANOUX	Comptabilité
M. DEMANGE	Pharmacie clinique
M. DOUCHE	Services de la Distribution pharmaceutique
Mme EVRARD	Services de la Distribution pharmaceutique
M. FRANCAIS	Services de la Distribution pharmaceutique
M. GABLE	Maintien à domicile
M. GIESENFELD	Pharmacie clinique
Mme GILGENKRANTZ	Génétiq
M. HACHET	Services de la Distribution pharmaceutique
M. JACQUOT	Assurance - qualité
M. JOUAULT	Services de la Distribution pharmaceutique
Mme LABAEYE	Audiologie
M. LAMOTTE	Physique (acoustique)
M. LE FLOCH	Gestion, Droit du travail, Droit commercial
M. LEVIN	Services de la Distribution pharmaceutique
M. LOUIS	Séméiologie
Mle MANGIN	Pharmacie clinique
M. MAUARY	Séméiologie
M. MAY	Maladies infectieuses
M. NICOLAY	Anatomie
M. PARDON	Services de la Distribution pharmaceutique
Mle PICAUT	Pharmacie clinique
M. RENAUX	Secourisme
M. RETOURNARD	Electronique
M. ROLLET	Secourisme
M. ROUYER	Législation, Podologie, Orthopédie
M. SIMON	Audiologie
M. TRECHOT	Pharmacovigilance - Effets indésirables des médicaments
M. TURKAWKA	Relations humaines, techniques de la communication
Mle WOLF	Services de la Distribution pharmaceutique

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à

Monsieur le Professeur Jeffrey Atkinson,

pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et avoir dirigé ce travail de recherche. Je tiens particulièrement à le remercier pour sa grande disponibilité, sa rigueur et sa gentillesse ainsi que pour m'avoir transmis son enthousiasme et sa passion pour la recherche. Durant toutes ces années, j'ai été sensible à la grande confiance qu'il m'a toujours témoignée.

Madame le Docteur Christine Capdeville-Atkinson,

pour m'avoir permis de conduire ce travail sous sa direction avec toute sa confiance. Je la remercie vivement pour son aide très précieuse.

Madame le Docteur Marie-Aude Devynck,

pour l'attention qu'elle a bien voulu me témoigner en acceptant de juger ce travail.

Madame le Docteur Nicole Morel,

pour avoir eu la gentillesse d'accepter d'être rapporteur et de participer au jury de cette thèse.

Monsieur le Professeur Bernard Waeber,

pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de participer au jury de cette thèse.

Monsieur le Docteur Alberto Avolio,

pour l'intérêt qu'il a manifesté à ce travail en acceptant de le juger.

Monsieur le Docteur Bernard Lévy,

que je suis honoré de compter parmi mes juges.

Je remercie tous les membres du laboratoire avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler, en particulier, **Philippe Giummelly**. Je lui suis très reconnaissant pour son support et son aide efficace qui m'ont accompagné tout au long de ce travail. Avec toute mon amitié.

A Lois,

A mes parents,

Pour l'aide et le soutien qu'ils m'ont toujours apportés. En témoignage de tout mon amour.

A mon frère,

A mes grands-parents,

Avec toute ma tendresse.

A tous mes amis.

SOMMAIRE

	page
LISTE DES ABREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	9
INTRODUCTION GENERALE	24
<u>CHAPITRE I : Données bibliographiques</u>	25
I. La paroi artérielle et ses propriétés visco-élastiques	26
1. Structure et éléments constitutifs de la paroi artérielle	26
<u>1.1. Elastine</u>	26
<u>1.2. Collagène</u>	29
<u>1.3. Protéoglycanes</u>	29
<u>1.4. Fibronectine</u>	30
<u>1.5. Cellules musculaires lisses</u>	30
1.5.1. Structure de la cellule musculaire lisse	30
1.5.2. Rôle du calcium dans la contraction	31
<u>1.6. Cellules endothéliales</u>	34
2. Organisation de la paroi artérielle	34
3. Le système artériel	36
4. Caractéristiques et paramètres définissant l'élasticité de la paroi artérielle	37
<u>4.1. Elasticité</u>	37
<u>4.2. Relation entre contrainte et déformation</u>	40
<u>4.3. Contrainte et déformation de la paroi artérielle</u>	41
<u>4.4. Effets de la pulsatilité sur la paroi artérielle</u>	43
5. Propriétés de la paroi artérielle	43
<u>5.1. Relaxation à la contrainte</u>	44
<u>5.2. Creep</u>	44
<u>5.3. Hystérésis</u>	46
<u>5.4. Compliance</u>	46
<u>5.5. Distensibilité</u>	47

6. Techniques d'évaluation des propriétés élastiques de la paroi d'un segment artériel	
<u>6.1. Mesure du diamètre</u>	47
6.1.1. Méthodes utilisant des capteurs de déformation	47
6.1.2. Méthodes optiques	49
6.1.3. Méthodes ultrasoniques	51
<u>6.2. Mesure du volume intraluminal</u>	54
<u>6.3. Mesure de la vitesse de propagation de l'onde de pouls</u>	56
7. Effets du vieillissement sur la paroi artérielle	59
<u>7.1. Effets structuraux</u>	59
7.1.1. Sur les dimensions artérielles	59
7.1.2. Sur la morphologie artérielle	61
<u>7.2. Effets fonctionnels</u>	62

II. Mesure du calcium cytoplasmique 67

1. Généralités sur les principes de fluorescence	67
2. Caractéristiques des indicateurs fluorescents du calcium	68
<u>2.1. Affinité et sensibilité</u>	68
<u>2.2. Incorporation non disruptive de l'indicateur dans les cellules</u>	68
<u>2.3. Vitesse de réponse</u>	69
3. Avantages et désavantages de la fluorescence pour la mesure du calcium	70
<u>3.1. Avantages</u>	70
<u>3.2. Désavantages</u>	70
4. Les indicateurs fluorescents	71
5. L'utilisation du fura-2	72
<u>5.1. Incorporation intracellulaire du fura-2</u>	74
<u>5.2. Calibration</u>	74
<u>5.3. Autofluorescence</u>	75

CHAPITRE II : Mise au point de la technique de mesure simultanée du calcium intracellulaire et de la compliance artérielle à pression pulsée sur l'artère carotide de rat *in vitro* 78

1. Introduction	79
2. Description des appareillages de mesure de l'élasticité carotidienne et du calcium intracellulaire, et études préliminaires	81
<u>2.1. Description des appareillages</u>	81
2.1.1. Système de pression pulsée et de mesure de la compliance artérielle	81

2.1.2. Système de mesure du calcium intracellulaire par fluorescence	82
<u>2.2. Expériences préliminaires</u>	86
2.2.1. Préparation du segment artériel	86
2.2.2. Vérification histologique de l'absence de l'endothélium	87
2.2.3. Détermination de l'absorbance de l'artère carotide	88
2.2.4. Etude préliminaire de la mesure de l'indice d'amortissement carotidien en fonction de la pression intraluminale	88
2.2.5. Détermination des paramètres d'incorporation du fura-2	89
<u>2.3. Résultats des études préliminaires permettant la détermination des paramètres de base</u>	89
2.3.1. Vérification histologique de l'absence de l'endothélium	89
2.3.2. Détermination de l'absorbance de l'artère carotide	89
2.3.3. Mesure de l'indice d'amortissement carotidien en fonction de la pression intraluminale	91
2.3.4. Durée de la charge du fura-2 AM	92
<u>2.4. Conclusions sur les paramètres d'étude</u>	94
3. Etude <i>in vitro</i> de la capacité de l'artère carotide à amortir un signal de pression pulsée	95
<u>3.1. Matériel et méthodes</u>	95
3.1.1. Cycles de pressurisation intraluminale	95
3.1.2. Comparaison de l'indice d'amortissement artériel avec d'autres paramètres	96
3.1.3. Détermination de $[Ca^{2+}]_i$ et relation pressurisation intraluminale- $[Ca^{2+}]_i$	98
3.1.4. Effets de l'activation des cellules musculaires lisses sur $[Ca^{2+}]_i$ et PPb/PPa	99
3.1.5. Effets de l'inactivation des cellules musculaires lisses sur $[Ca^{2+}]_i$ et PPb/PPa	99
3.1.6. Analyse statistique	100
<u>3.2. Résultats</u>	100
3.2.1. Cycles rapides de pressurisation intraluminale	100
3.2.2. Cycles lents de pressurisation intraluminale et reproductibilité de la mesure	101
3.2.3. Relation diamètre externe-PPb/PPa	104
3.2.4. Relation volume intraluminal-PPb/PPa	107
3.2.5. Relation pressurisation intraluminale et $[Ca^{2+}]_i$	108
3.2.6. Effets de l'activation des cellules musculaires lisses sur $[Ca^{2+}]_i$ et PPb/PPa	110
3.2.7. Effets de l'inactivation des cellules musculaires lisses sur $[Ca^{2+}]_i$ et PPb/PPa	112
4. Discussion	115

<u>CHAPITRE III : Rôle du calcium dans les effets de l'âge sur la capacité d'amortissement artériel</u>	121
1. Introduction	122
2. Matériel et méthodes	122
<u>2.1. Animaux</u>	122
<u>2.2. Prélèvement de l'artère carotide</u>	122
<u>2.3. Cycles rapides de pressurisation intraluminale</u>	123
<u>2.4. Cycles lents de pressurisation intraluminale</u>	123
<u>2.5. Charge du fura-2</u>	123
<u>2.6. Effets de la noradrénaline</u>	123
<u>2.7. Effets d'un ionophore et d'un chélateur du calcium</u>	123
<u>2.8. Calcium tissulaire total</u>	124
<u>2.9. Masse cardiaque</u>	124
<u>2.10. Analyse statistique</u>	124
3. Résultats	124
<u>3.1. Coefficient de rétractation</u>	124
<u>3.2. Effets de l'âge au cours de 5 cycles rapides de pressurisation intraluminale</u>	125
<u>3.3. Effets de l'âge sur un cycle lent de pressurisation intraluminale</u>	126
<u>3.4. Paramètres de fluorescence</u>	127
<u>3.5. Effets de la noradrénaline</u>	129
<u>3.6. Effets d'un ionophore et d'un chélateur du calcium</u>	130
<u>3.7. Calcium tissulaire total</u>	132
<u>3.8. Masse cardiaque</u>	132
4. Discussion	134
<u>4.1. Effets mécaniques vasculaires du vieillissement</u>	134
4.1.1. Coefficient de rétractation longitudinale	134
4.1.2. Cycles de pressurisation intraluminale	134
<u>4.2. Effets structuraux vasculaires du vieillissement</u>	135
4.2.1. Fibres élastiques	135
4.2.2. Collagène	136
4.2.3. Cellules musculaires lisses	137
<u>4.3. Rôle du calcium intracellulaire</u>	137
<u>4.4. Effets du vieillissement sur la masse cardiaque</u>	140

<u>CHAPITRE IV : Modifications de l'élasticité de l'artère carotide liées au calcium dans un modèle de surcharge calcique vasculaire chez le rat : effets du traitement chronique par un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, le périndopril</u>	142
1. Introduction	143
<u>1.1. Modèle de surcharge calcique vasculaire chez le rat</u>	143
1.1.1. Paramètres biologiques	143
1.1.2. Modifications structurales	144
1.1.3. Localisation de la surcharge calcique vasculaire	144
1.1.4. Modifications fonctionnelles	145
<u>1.2. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion</u>	145
2. Matériel et méthodes	147
<u>2.1. Animaux</u>	147
<u>2.2. Traitement</u>	148
2.2.1. Induction de la surcharge calcique	148
2.2.2. Inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I	148
<u>2.3. Mesures au cours du traitement</u>	148
<u>2.4. Protocoles expérimentaux</u>	149
2.4.1. Etude des propriétés visco-élastiques et du rôle du calcium intracellulaire	149
2.4.1.1. Prélèvement de l'artère carotide	149
2.4.1.2. Cycles rapides de pressurisation intraluminale	149
2.4.2.3. Cycles lents de pressurisation intraluminale	149
2.4.2.4. Stimulation par la noradrénaline	149
2.4.2.5. Effets d'un ionophore et d'un chélateur du calcium lors de la calibration de fluorescence	149
2.4.2. Etude histomorphométrique	150
2.4.2.1. Préparation des coupes histologiques	150
2.4.2.2. Analyse histomorphométrique	150
2.4.3. Détermination de l'hypertrophie cardiaque	151
2.4.4. Dosage du calcium tissulaire total	151
2.4.5. Dosage des protéines tissulaires solubles dans l'acide	151
2.4.6. Activité de l'enzyme de conversion	152
2.4.7. Dosage des catécholamines plasmatiques	152
<u>2.5. Analyse statistique</u>	153
3. Résultats	153
<u>3.1. Pression artérielle systolique et rythme cardiaque</u>	153
<u>3.2. Poids corporel et consommations de nourriture et de boisson</u>	155

<u>3.3. Etude des propriétés visco-élastiques et du rôle du calcium intracellulaire</u>	157
3.3.1. Coefficient de rétractation longitudinale	157
3.3.2. Cycles rapides de pressurisation intraluminale	157
3.3.3. Cycles lents de pressurisation intraluminale	158
3.3.4. Paramètres de fluorescence	160
3.3.5. Stimulation par la noradrénaline	162
3.3.6. Effets d'un ionophore et d'un chélateur du calcium	163
<u>3.4. Etude histomorphométrique</u>	165
<u>3.5. Hypertrophie cardiaque</u>	166
<u>3.6. Taux du calcium tissulaire total</u>	167
<u>3.7. Taux des protéines tissulaires solubles dans l'acide</u>	169
<u>3.8. Activité de l'enzyme de conversion plasmatique</u>	171
<u>3.9. Taux des catécholamines plasmatiques</u>	171
4. Discussion	172
<u>4.1. Paramètres généraux</u>	172
4.1.1. Effets du traitement vitamine D ₃ -nicotine	172
4.1.2. Effets du traitement IECA	173
<u>4.2. Elasticité de la paroi artérielle</u>	174
4.2.1. Effets du traitement vitamine D ₃ -nicotine sur l'indice d'amortissement artériel	174
4.2.2. Effets du traitement IECA	174
4.2.3. Facteurs influençant l'élasticité artérielle	175
4.2.3.1. Fibres élastiques et dimensions artérielles	175
4.2.3.2. Cellules endothéliales	176
4.2.3.3. Cellules musculaires lisses et réactivité vasculaire	176
 CONCLUSION GENERALE	 180
 REFERENCES	 182
 ANNEXE	 212

LISTE DES ABREVIATIONS

ADP	adénosine diphosphate
AEC	activité plasmatique de l'enzyme de conversion
AF	autofluorescence
AM	ester acétoxyméthyl
Ang II	angiotensine II
ATP	adénosine triphosphate
ATPase	enzyme transformant l'ATP en ADP
BSA	albumine sérique bovine
CML	cellule musculaire lisse
cps	coups par seconde
D_e	diamètre externe
D_i	diamètre interne
DHBA	3,4-dihydroxybenzylamine
DMSO	diméthylsulfoxyde
E	module élastique
E_{inc}	module élastique incrémental
E_p	module élastique de pression
EDTA	acide éthylènediamine tétraacétique
EGTA	acide éthylèneglycol tétraacétique
esm	écart standard à la moyenne
F	fluorescence
h	heure
HEPES	acide hydroxyéthylpipérazine éthanesulfonique
IECA	inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I
K_d	constante de dissociation
L/L ₀	coefficient de rétractation longitudinale
LE	lame élastique
m	moyenne
min	minute
NA	noradrénaline
NS	non significatif
P	probabilité
PAS	pression artérielle systolique
PIM	pression intraluminale moyenne
PPa	amplitude du signal de pression enregistré par le capteur "a"
PPb	amplitude du signal de pression enregistré par le capteur "b"

PPb/PPa	indice d'amortissement artériel
R, R _{340/380}	rapport des fluorescences mesurées aux deux longueurs d'onde d'excitation, 340 et 380 nm
R', R' _{340/380}	rapport des fluorescences mesurées aux deux longueurs d'onde d'excitation, 340 et 380 nm et corrigées par l'autofluorescence
R _e	rayon externe
R _i	rayon interne
R _{max} , R' _{max}	rapport maximal de fluorescence corrigé (R') ou non (R) par l'autofluorescence
R _{min} , R' _{min}	rapport maximal de fluorescence corrigé (R') ou non (R) par l'autofluorescence
ROC	canal calcique couplé à un récepteur (<i>receptor-operated channel</i>)
sec	seconde
T	contrainte pariétale circonférentielle
TEM	rat témoin non traité par la vitamine D ₃ plus nicotine
UV	ultraviolet
VD	ventricule droit
VDN	rat traité par l'association vitamine D ₃ -nicotine
VG	ventricule gauche
VOC	canal calcique modulé par le potentiel de membrane (<i>voltage-operated channel</i>)
[Ca ²⁺] _i	concentration intracellulaire de calcium
σ	force par unité de surface
ε	déformation longitudinale relative
β'	rapport des fluorescences à 380 nm mesurées en présence d'EGTA et en présence de CaCl ₂
ΔPPb/PPa%	variation relative de l'indice d'amortissement
ΔR'%	variation relative du rapport de fluorescence R' _{340/380}

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

page

Figures :

Chapitre I:

Figure 1.1.	27
Schéma de synthèse des fibres élastiques.	
Figure 1.2.	28
Représentation d'une fibre élastique avec le détail d'une région de pontages à partir de quatre (desmosine) ou deux résidus lysine de chaînes de tropoélastine.	
Figure 1.3.	28
Structure chimique de la desmosine formant un pontage entre quatre résidus de lysine.	
Figure 1.4.	31
Mécanisme de la contraction musculaire lisse.	
Figure 1.5.	32
Principaux mouvements de calcium au niveau de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique d'une cellule.	
Figure 1.6.	35
Schéma des différentes couches de la paroi artérielle et représentation schématique d'une unité fibrolamellaire.	
Figure 1.7.	36
Système vasculaire d'un chien.	
Figure 1.8.	38
Exemples de contrainte s'exerçant sur la paroi artérielle.	
Figure 1.9.	39
Schéma d'un segment artériel illustrant les trois directions pour la contrainte et la déformation.	

Figure 1.10.	40
Représentation schématique de la relation contrainte-déformation pour un corps parfaitement élastique et un corps visco-élastique.	
Figure 1.11.	42
Déformations induites par une contrainte statique ou sinusoïdale permettant la détermination du module élastique statique ou dynamique.	
Figure 1.12.	44
Exemple de modèles mécaniques possédant des propriétés élastiques.	
Figure 1.13.	45
Courbe représentative de la relaxation à la suite de l'application d'une contrainte.	
Figure 1.14.	45
Phénomène de <i>creep</i> .	
Figure 1.15.	46
Trois cycles consécutifs de pressurisation-dépressurisation de l'artère fémorale de chien <i>in vitro</i> .	
Figure 1.16.	48
Système permettant la mesure des variations de diamètre artériel grâce à une jauge métallique reliant les deux bras du capteur de déformation.	
Figure 1.17.	48
Schéma de mesure de diamètre par un capteur à déplacement linéaire.	
Figure 1.18.	50
Schéma du système optique de mesure du diamètre de l'artère soumise à une pression sinusoïdale.	
Figure 1.19.	51
Schéma de la chambre d'incubation illustrant le balayage lumineux laser d'un segment carotidien.	
Figure 1.20.	52
Schéma du système <i>in vitro</i> pour la mesure du diamètre artériel par méthode ultrasonique.	

Figure 1.21.	53
Schéma du système de mesure des dimensions de l'artère radiale humaine grâce à une sonde Doppler pulsée et à l'émission du signal radiofréquence caractéristique.	
Figure 1.22.	54
Tonométrie d'aplanation.	
Figure 1.23.	55
Schéma du système de mesure <i>in situ</i> du volume intraluminal de l'artère carotide isolée.	
Figure 1.24.	55
Variation de volume dans l'artère carotide isolée pendant un cycle de pressurisation.	
Figure 1.25.	56
Appareillage permettant de déterminer <i>in vitro</i> les relations pression-volume.	
Figure 1.26.	57
Mesure de la vitesse de propagation de l'onde de pression.	
Figure 1.27.	57
Détermination <i>in situ</i> de la vitesse de transmission de l'onde de pouls au niveau de l'artère carotide commune de chien.	
Figure 1.28.	58
Ondes de pression de l'aorte de chien avec surimposition de séries d'ondes artificielles.	
Figure 1.29.	60
Rétractation des segments artériels en fonction de l'artère et de l'âge.	
Figure 1.30.	61
Épaisseur pariétale relative en fonction de l'artère et de l'âge.	
Figure 1.31.	63
Évolution de la vitesse de transmission de l'onde de pression dans l'aorte humaine en fonction de l'âge.	
Figure 1.32.	64
Exemple d'onde enregistrée dans l'aorte ascendante résultant de la somme d'une onde incidente et d'une onde réfléchie.	

Figure 1.33.	65
Relation entre la forme de l'onde de pression et le spectre d'impédance d'entrée dans l'aorte ascendante et modifications apparaissant avec l'âge.	
Figure 1.34.	65
Evolution des pressions systolique et diastolique en fonction de l'âge chez l'Homme.	
Figure 1.35.	69
Incorporation d'une sonde fluorescente sous forme d'ester acétoxyméthyl à l'intérieur d'une cellule musculaire lisse.	
Figure 1.36.	73
Structure chimique du fura-2 et de sa forme ester acétoxyméthyl.	
Figure 1.37.	74
Spectres d'excitation d'une solution de fura-2 en présence de concentrations croissantes de calcium.	
Figure 1.38.	77
Composantes cellulaire et extracellulaire pouvant conduire à la rigidité artérielle au cours du vieillissement. Rôles pouvant être joués par le calcium.	
<u>Chapitre II :</u>	
Figure 2.1.	82
Schéma représentant le système d'évaluation de la capacité d'amortir un signal de pression pulsée de l'artère carotide de rat.	
Figure 2.2.	83
Schéma représentant le spectrofluorimètre (modèle Fluorolog F1T11, Spex) pour la mesure du calcium intracellulaire avec la sonde fluorescente, le fura-2.	
Figure 2.3.	87
Schéma représentant le support sur lequel le segment de l'artère carotide est fixé.	
Figure 2.4.	90
Absorbance de l'artère carotide non chargée ou chargée en fonction de la longueur d'onde.	

Figure 2.5.	91
Effets de 3 cycles de pressurisation-dépressurisation consécutifs sur la capacité d'amortissement carotidien.	
Figure 2.6.	92
Evolution de la capacité d'amortissement carotidien au cours de 3 cycles de pressurisation-dépressurisation consécutifs.	
Figure 2.7.	93
Evolution au cours du temps de la fluorescence pendant la période d'incorporation du fura-2 AM.	
Figure 2.8.	93
Evolution au cours du temps de la fluorescence pendant la période de "lavage" du segment, à la suite de la charge du fura-2 AM.	
Figure 2.9.	100
Indice de capacité d'amortissement artériel avant et à la suite de 5 cycles rapides de pressurisation intraluminale.	
Figure 2.10.	102
Enregistrements représentatifs des signaux de pression mesurés par les deux capteurs de pression durant un cycle lent de pressurisation intraluminale et valeurs moyennes de la capacité d'amortissement durant 3 cycles consécutifs de pressurisation intraluminale.	
Figure 2.11.	103
Profils des pulsations de pression enregistrées.	
Figure 2.12.	103
Stabilité de PPb/PPa durant chaque palier de pression au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale.	
Figure 2.13.	104
Variations du diamètre externe et de la compliance artérielle correspondante durant un cycle lent de pressurisation intraluminale.	
Figure 2.14.	105
Evolution de la variation relative du diamètre externe et de l'épaisseur de la paroi artérielle durant un cycle lent de pressurisation intraluminale.	

Figure 2.15.	106
Relation entre le module élastique de pression et la pression intraluminale moyenne au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale.	
Figure 2.16.	106
Relation entre la tension pariétale moyenne et la variation relative de la tension pariétale avec la pression intraluminale moyenne au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale.	
Figure 2.17.	107
Variations du volume intraluminale dans l'artère carotide et variations de la compliance correspondante durant un cycle lent de pressurisation intraluminale.	
Figure 2.18.	109
Spectres d'excitation de l'artère carotide avant l'incorporation du fura-2 AM, et après la charge et la période d'hydrolyse.	
Figure 2.19.	110
PPb/PPa au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale avant et après perfusion de la solution de charge contenant ou non le fura-2 AM. Effets d'un cycle lent de pressurisation intraluminale sur PPb/PPa et $[Ca^{2+}]_i$.	
Figure 2.20.	111
Signaux fluorescents à 340 et 380 nm et signaux de pression enregistrés par les deux capteurs de pression au cours du protocole de calibration de la fluorescence.	
Figure 2.21.	112
Enregistrement représentatif des effets de la superfusion de noradrénaline sur les signaux fluorescents.	
Figure 2.22.	113
Enregistrement typique des signaux de pression détectés par les deux capteurs de pression lors de la fixation au formol du segment carotidien.	
Figure 2.23.	114
Enregistrement typique des signaux de pression par les deux capteurs de pression au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale. Effets d'un cycle lent de pressurisation intraluminale sur PPb/PPa avant et après fixation au formol du segment carotidien, et dans le cas où le segment est remplacé par un cathéter rigide.	

Chapitre III :

Figure 3.1.	125
Coefficient de rétractation longitudinale de l'artère carotide.	
Figure 3.2.	125
Effets de l'âge au cours de 5 cycles rapides de pressurisation intraluminale sur l'indice d'amortissement artériel.	
Figure 3.3.	126
Effets d'un cycle lent de pressurisation intraluminale sur l'indice d'amortissement artériel.	
Figure 3.4.	127
Fluorescence du segment carotidien non chargé.	
Figure 3.5.	128
Rapport de charge du segment carotidien par le fura-2 (fluorescence mesurée après la charge du fura-2 sur autofluorescence mesurée avant la charge).	
Figure 3.6.	128
Pourcentage de l'autofluorescence dans les signaux de fluorescence obtenus après la charge du segment carotidien par le fura-2.	
Figure 3.7.	129
Effets de l'âge sur les paramètres de fluorescence.	
Figure 3.8.	130
Effets de la superfusion de noradrénaline sur l'indice d'amortissement artériel et sur le taux de Ca^{2+} intracellulaire.	
Figure 3.9.	131
Effets de l'ionomycine sur l'indice d'amortissement artériel et sur le taux de Ca^{2+} intracellulaire.	
Figure 3.10.	131
Variations de l'indice d'amortissement artériel en présence d'ionomycine et de calcium, puis d'EGTA ou de manganèse.	

Figure 3.11.	132
Concentrations de calcium tissulaire total au niveau de 3 artères et du myocarde.	
Figure 3.12.	133
Effets de l'âge sur les masses ventriculaires totale, gauche, et droite. Masses ventriculaires absolues et masses ventriculaires relatives rapportées au poids corporel.	
<u>Chapitre IV :</u>	
Figure 4.1.	147
Structure chimique du périndopril et de son métabolite actif, le périndoprilate.	
Figure 4.2.	154
Evolution de la pression artérielle systolique au cours de l'étude.	
Figure 4.3.	154
Evolution du rythme cardiaque au cours de l'étude.	
Figure 4.4.	155
Evolution de la consommation de nourriture au cours de l'étude.	
Figure 4.5.	156
Evolution de la consommation de boisson au cours de l'étude.	
Figure 4.6.	156
Evolution du poids corporel au cours de l'étude.	
Figure 4.7.	158
Effets de 4 cycles rapides de pressurisation intraluminale sur l'indice d'amortissement artériel.	
Figure 4.8.	159
Effets d'un cycle lent de pressurisation intraluminale sur l'indice d'amortissement artériel.	
Figure 4.9.	159
Effets du traitement VDN sur les profils des signaux de pression enregistrés par les capteurs de pression.	
Figure 4.10.	160
Intensités de fluorescence de l'artère carotide non chargée avec le fura-2 (autofluorescence).	

Figure 4.11.	161
Coefficient de charge du fura-2 estimé par le rapport de la fluorescence après charge sur celle de l'autofluorescence.	
Figure 4.12.	162
Paramètres de fluorescence lors de la calibration de fluorescence.	
Figure 4.13.	163
Effets de la stimulation par la noradrénaline.	
Figure 4.14.	164
Effets de l'ionomycine lors de la calibration de la fluorescence.	
Figure 4.15.	164
Effets de l'ionomycine, de l'EGTA et de la solution de Mn sur la capacité d'amortissement artériel.	
Figure 4.16.	166
Poids ventriculaire total, gauche et droit.	
Figure 4.17.	167
Poids relatifs des ventricules gauche, droit et des deux ventricules.	
Figure 4.18.	168
Concentrations de calcium tissulaire total dans différentes artères et autres organes.	
Figure 4.19.	170
Concentration des protéines tissulaires solubles dans l'acide dans différentes artères et autres organes.	
Figure 4.20.	170
Activité de l'enzyme de conversion.	
Figure 4.21.	172
Concentration plasmatique de noradrénaline et d'adrénaline.	

Figure 5.	180
Hypothèse du rôle artériel du calcium dans l'effet VDN chez le rat, et du principal rôle d'un IECA.	

Tableaux :

Chapitre I :

Tableau 1.1.	72
Propriétés fluorescentes des indicateurs du Ca^{2+} .	

Chapitre II :

Tableau 2.1.	108
Relations entre PPb/PPa et ΔD_e et la compliance calculée à partir du volume intraluminal évalué par le déplacement d'une bulle ou par les variations de diamètre externe.	

Tableau 2.2.	115
Critères de succès de l'utilisation du fura-2 comme indicateur de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les artères caudale et carotide de rat.	

Chapitre III :

Tableau 3.1.	138
Etudes sur les modifications de la réactivité artérielle avec l'âge.	

Tableau 3.2.	140
Evolution de la masse cardiaque chez le rat avec l'âge.	

Chapitre IV :

Tableau 4.1.	154
ANOVA à 2 facteurs de la pression artérielle systolique.	

Tableau 4.2.	157
ANOVA à 2 facteurs du poids corporel.	

Tableau 4.3.	165
Etude histomorphométrique de l'artère carotide.	
Tableau 4.4.	169
Valeurs F de l'ANOVA à 2 facteurs sur les concentrations de calcium tissulaire total.	
Tableau 4.5.	170
Valeurs F de l'ANOVA à 2 facteurs (VDN et IECA) sur les concentrations de protéines tissulaires solubles dans l'acide.	

Annexe :

Chapitre II.

Tableau 5.1.	213
Absorbance de l'artère carotide non chargée ou chargée avec le fura-2 en fonction de la longueur d'onde soit en position proche soit en position éloignée de la cellule réceptrice.	
Tableau 5.2.	213
Effets de 3 cycles de pressurisation (montée en pression, PIM)-dépressurisation (descente en pression, PIM) consécutifs sur la capacité d'amortissement carotidien (PPb/PPa).	
Tableau 5.3.	214
Evolution au cours du temps de la fluorescence aux longueurs d'onde d'excitation 340, 360 et 380 nm (longueur d'onde d'émission 510 nm) pendant la période d'incorporation du fura-2 AM.	
Tableau 5.4.	214
Evolution au cours du temps de la fluorescence aux longueurs d'onde d'excitation 340, 360 et 380 nm (longueur d'onde d'émission 510 nm) pendant la période de "lavage" du segment carotidien à la suite de la charge du fura-2 AM.	
Tableau 5.5.	214
Indice de capacité d'amortissement artériel (PPb/PPa) avant et à la suite de 5 cycles rapides de pressurisation intraluminale.	

Tableau 5.6.	215
Reproductibilité de la capacité d'amortissement artériel (PPb/PPa) durant 3 cycles consécutifs de pressurisation intraluminale.	
Tableau 5.7.	215
Stabilité de PPb/PPa durant chaque palier de pression PIM de 5 min chacun au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale.	
Tableau 5.8.	215
Variations du diamètre externe et de la compliance artérielle correspondante, durant un cycle lent de pressurisation intraluminale.	
Tableau 5.9.	215
Evolution de la variation relative du diamètre externe ($\Delta D_e\%$) et de l'épaisseur de la média durant un cycle lent de pressurisation intraluminale.	
Tableau 5.10.	216
Relation entre le module élastique de pression et la pression intraluminale moyenne au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale.	
Tableau 5.11.	216
Relation entre la tension pariétale moyenne et la variation relative de la tension pariétale à chaque pulsation de pression avec la pression intraluminale moyenne au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale.	
Tableau 5.12.	217
Variations du volume intraluminale dans l'artère carotide et variations de la compliance correspondante durant un cycle lent de pressurisation intraluminale.	
Tableau 5.13.	218
PPb/PPa au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale avant et après perfusion de la solution de charge contenant ou non le fura-2 AM.	
Tableau 5.14.	218
Effets d'un cycle lent de pressurisation intraluminale sur PPb/PPa et $[Ca^{2+}]_i$.	
Tableau 5.15.	218
Effets de 90 min de fixation au formol sur PPb/PPa du segment carotidien.	

Tableau 5.16.	219
Effets d'un cycle lent de pressurisation intraluminale sur PPb/PPa avant et après fixation au formol du segment carotidien, et dans le cas où ce dernier est remplacé par un cathéter rigide.	
<i>Chapitre III.</i>	
Tableau 6.1.	219
Effets de l'âge sur le coefficient de rétractation longitudinale (L/L_0) de l'artère carotide.	
Tableau 6.2.	219
Effets de l'âge sur l'indice d'amortissement artériel (PPb/PPa) au cours de 5 cycles rapides de pressurisation intraluminale .	
Tableau 6.3.	220
Influences de l'âge sur les effets d'un cycle lent de pressurisation intraluminale sur l'indice d'amortissement artériel (PPb/PPa).	
Tableau 6.4.	220
Effets de l'âge sur la fluorescence du segment carotidien non chargé (autofluorescence) aux trois longueurs d'onde d'excitation 340, 360 et 380 nm.	
Tableau 6.5.	220
Effets de l'âge sur le rapport de charge du segment carotidien par le fura-2 correspondant à la fluorescence après charge du fura-2 sur l'autofluorescence avant la charge.	
Tableau 6.6.	220
Effets de l'âge sur le pourcentage de l'autofluorescence dans les signaux de fluorescence obtenus après la charge du segment carotidien par le fura-2.	
Tableau 6.7.	221
Effets de l'âge sur les paramètres de fluorescence.	
Tableau 6.8.	221
Influences de l'âge sur les effets de la superfusion de noradrénaline sur l'indice d'amortissement artériel et sur le Ca^{2+} cytoplasmique.	
Tableau 6.9.	221
Effets de l'ionomycine sur l'indice d'amortissement artériel et sur le taux de Ca^{2+} cytoplasmique.	

Tableau 6.10.	222
Effets de l'âge sur l'indice d'amortissement artériel (PPb/PPa) en présence de calcium plus ionomycine, d'EGTA plus ionomycine ou de manganèse plus ionomycine.	
Tableau 6.11.	222
Effets de l'âge sur les concentrations de calcium tissulaire total au niveau de trois artères et du myocarde.	
Tableau 6.12.	222
Effets de l'âge sur le poids ventriculaire total, gauche et droit, et sur ces mêmes poids ventriculaires rapportés au poids corporel.	
<i>Chapitre IV.</i>	
Tableau 7.1.	223
Evolution de la pression artérielle systolique au cours de l'étude.	
Tableau 7.2.	223
Evolution du rythme cardiaque au cours de l'étude.	
Tableau 7.3.	223
Evolution de la consommation de nourriture au cours de l'étude.	
Tableau 7.4.	224
Evolution de la consommation de boisson au cours de l'étude.	
Tableau 7.5.	224
Evolution du poids corporel au cours de l'étude.	
Tableau 7.6.	225
Effets de 4 cycles rapides de pressurisation intraluminale sur l'indice d'amortissement artériel (PPb/PPa).	
Tableau 7.7.	225
Effets d'un cycle lent de pressurisation intraluminale sur l'indice d'amortissement artériel.	
Tableau 7.8.	225
Intensités de fluorescence de l'artère carotide non chargée avec le fura-2 (autofluorescence) à 340, 360, 380 nm.	

Tableau 7.9.	226
Coefficient de charge (fluorescence/autofluorescence) du fura-2.	
Tableau 7.10.	226
Paramètres de fluorescence lors de la calibration de fluorescence.	
Tableau 7.11.	226
Effets de la stimulation par la noradrénaline (10 μ M) sur l'indice d'amortissement artériel et sur le niveau de calcium cytoplasmique.	
Tableau 7.12.	227
Effets de l'ionomycine lors de la calibration de la fluorescence sur l'indice d'amortissement artériel et sur le niveau de calcium cytoplasmique.	
Tableau 7.13.	227
Effets de l'ionomycine, de l'EGTA et du Mn sur la capacité d'amortissement artériel (PPb/PPa).	
Tableau 7.14.	227
Masse ventriculaire totale, gauche et droite.	
Tableau 7.15.	227
Poids des ventricules gauche, droit et des deux ventricules, rapportés au poids corporel .	
Tableau 7.16.	228
Concentrations de calcium tissulaire total.	
Tableau 7.17.	228
Concentration des protéines tissulaires solubles dans l'acide.	
Tableau 7.18.	228
Activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I.	
Tableau 7.19.	228
Concentration plasmatique de noradrénaline et d'adrénaline.	

INTRODUCTION GENERALE

Les objectifs de notre travail expérimental sont :

- de déterminer le rôle potentiel du calcium cytosolique dans la compliance artérielle, pour cela,
- de développer une nouvelle méthode *in vitro* pour l'évaluation simultanée des capacités de l'artère carotide à amortir un signal de pression pulsée et des variations de calcium intracellulaire,
- d'en étudier les modifications liées au vieillissement et à une surcharge calcique vasculaire (modèle vitamine D₃ plus nicotine, VDN), la calcification des fibres élastiques pouvant être à l'origine des modifications fonctionnelles,
- et d'évaluer les effets d'un traitement chronique par un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I dans le modèle VDN.

Notre étude se divisera en quatre Chapitres :

- dans le Chapitre I, nous décrirons les données principales de la littérature sur les techniques *in vitro* de mesure de la compliance artérielle sur vaisseau entier et sur les techniques de mesure du calcium cytoplasmique,
- dans le Chapitre II, nous détaillerons notre méthode de mesures simultanées *in vitro* de l'élasticité artérielle et du niveau de calcium cytoplasmique sur l'artère carotide soumise à une pression intraluminale pulsée,
- dans le Chapitre III, nous étudierons les conséquences du vieillissement sur la compliance artérielle et sur la relation calcium intracellulaire-compliance artérielle,
- dans le Chapitre IV, nous présenterons les résultats de l'étude des conséquences d'une surcharge calcique vasculaire sur la compliance artérielle et sur la relation calcium intracellulaire-compliance artérielle, ainsi que les effets d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion, le périndopril.

CHAPITRE I

Données bibliographiques

Dans ce Chapitre, nous décrivons dans un premier temps la paroi artérielle et ses propriétés visco-élastiques avec les différents paramètres que nous serons amenés à mesurer ou calculer, ainsi que les techniques existantes pour l'évaluation de ces propriétés sur des segments artériels. Parmi les divers facteurs physiologiques (vieillesse) ou pathologiques (hypertension artérielle, athérosclérose, *etc.*) qui peuvent modifier les propriétés visco-élastiques artérielles, nous nous sommes concentrés sur les effets du vieillissement vasculaire et de ses conséquences structurales et fonctionnelles. Plusieurs études suggèrent que le calcium pourrait jouer un rôle important dans ces modifications survenant avec l'âge (Safar et coll., 1989 ; Van Merode et coll., 1990). Puis, dans un deuxième temps, nous décrivons la technique de fluorescence utilisée pour mesurer la concentration de calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$), en particulier l'utilisation de l'indicateur fluorescent, le fura-2.

I. La paroi artérielle et ses propriétés visco-élastiques

1. Structure et éléments constitutifs de la paroi artérielle

La paroi vasculaire est un matériau composite constitué d'une phase cellulaire (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses) et d'une matrice extracellulaire (quatre familles de macromolécules : élastine et collagène principalement, mais aussi glycoprotéines et protéoglycanes). L'organisation histologique complexe, c'est-à-dire la disposition et la proportion relative de chacun de ces éléments, détermine les propriétés de la paroi vasculaire.

De façon générale la paroi artérielle est constituée de trois tuniques concentriques autour de la lumière du vaisseau qui sont dans l'ordre : l'intima, la média et l'adventice. Les artères sont classées en différentes catégories dépendant principalement de l'organisation histologique de la média.

1.1. Elastine

Les fibres élastiques sont composées de deux éléments : un matériel amorphe, l'élastine, et un composant microfibrillaire de nature glycoprotéique (Jacob, 1993).

Ces microfibrilles sont particulièrement abondantes dans les tissus élastiques tels que l'aorte (également la peau, les ligaments) où elles participent aux propriétés élastiques des fibres élastiques (Mecham et Heuser, 1991). Elles jouent également un rôle important dans le processus de formation de la fibre élastique (Mecham et Heuser, 1991). Parmi les constituants de ces microfibrilles, la fibrilline a été décrite (Sakai et coll., 1986).

Les fibres élastiques sont principalement constituées d'élastine, une protéine insoluble très distensible, synthétisée à partir de sous-unités d'un précurseur soluble, la tropoélastine (Figure 1.1).

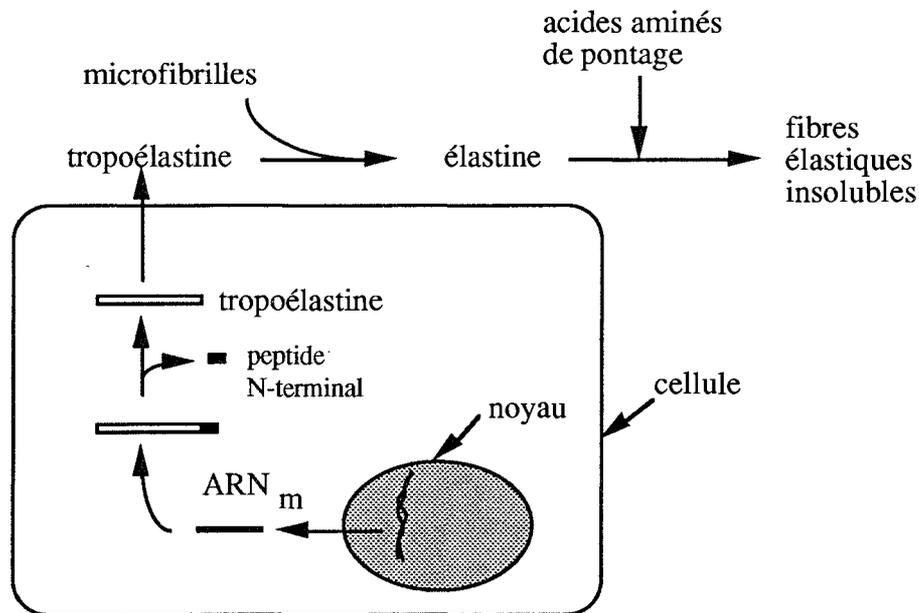


Figure 1.1. Schéma de synthèse des fibres élastiques. D'après Jacob (1993).

La tropoélastine peut être synthétisée par les cellules musculaires lisses et endothéliales. Elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire où les sous-unités de tropoélastine s'associent aux glycoprotéines de structure microfibrillaire. Il y a ensuite formation des acides aminés de pontage rendant les fibres élastiques, ainsi formées, insolubles.

L'élastine est riche en glycine (33%), proline (10-13%) et en acides aminés hydrophobes (44%) (Starcher et Galione, 1976). Contrairement au collagène, l'élastine contient très peu d'hydroxyproline, pas d'hydroxylysine et peu d'acides aminés polaires. Cette hydrophobicité, due à une proportion plus importante d'acides aminés hydrophobes, explique les propriétés élastiques et l'orientation stérique des fibres élastiques. La présence d'acides aminés de pontage constitue la caractéristique principale de la composition en acides aminés de l'élastine. La lysine (4%) participe essentiellement à la formation de pontages responsables de la structure finale et de l'orientation des fibres élastiques (Figure 1.2). Un résidu lysine est oxydé par l'action de la lysyl oxydase donnant un dérivé aldéhyde ; celui-ci peut se condenser avec une chaîne non modifiée d'une deuxième lysine pour former un pontage croisé, la lysinonorleucine. La mérodesmosine est également un acide aminé de pontage de l'élastine. Deux autres types de pontage croisé spécifiques de l'élastine, appelés desmosine (Figure 1.3) et isodesmosine sont dérivés de quatre chaînes de lysine (Figure 1.2) et possèdent un noyau pyridinique. Entre ces pontages, certaines régions de l'élastine montrent des séquences d'acides aminés régulières telles que Val-Pro-Gly-Val qui sont responsables de la forme en spirale β (Figure 1.2).

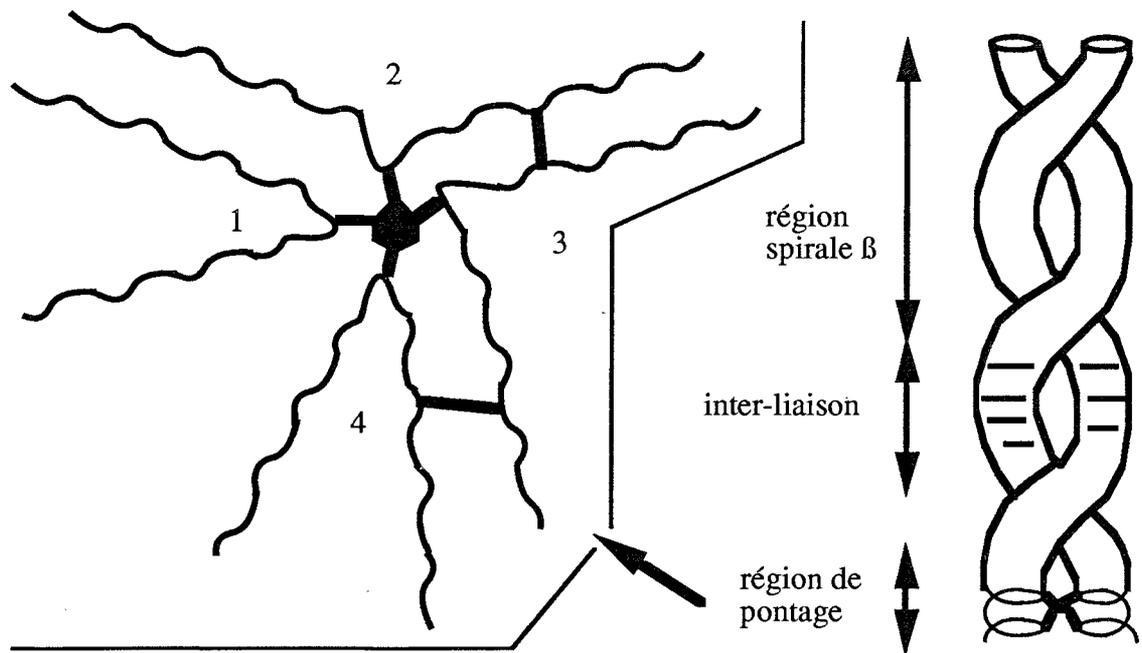


Figure 1.2. Représentation d'une fibre élastique avec le détail d'une région de pontages à partir de quatre (desmosine) ou deux résidus lysine de chaînes de tropoélastine. D'après Urry (1978).

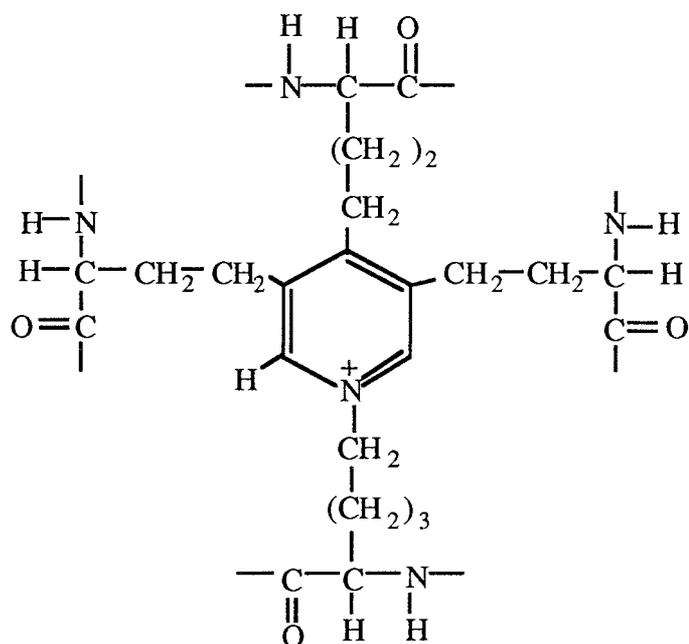


Figure 1.3. Structure chimique de la desmosine formant un pontage entre quatre résidus de lysine.

Le métabolisme de l'élastine apparaît être très lent (Davidson, 1990), et sa synthèse dépend des conditions hémodynamiques. Ainsi, un étirement statique de cellules musculaires lisses de l'aorte accroît la production d'élastine (Sutcliffe et Davidson, 1990). De même, des

greffes veineuses placées en position artérielle synthétisent plus d'élastine (Robert et Birembaut, 1987). Franzblau et coll. (1969) ont rapporté des taux plus élevés de desmosine, isodesmosine et lysinonorleucine au cours du vieillissement artériel.

La force élastomérique de l'élastine à l'état hydraté provient d'un mécanisme gouverné par l'entropie (Robert et Birembaut, 1987). L'élastine peut être étirée jusqu'à plusieurs fois sa longueur et ensuite revenir rapidement à ses taille et forme initiales quand la tension est supprimée.

L'élastine est la composante artérielle dont l'affinité pour le calcium est la plus forte (Yu et Blumenthal, 1967). De nombreuses études *in vitro* ont mis en évidence différents sites de fixation du calcium sur l'élastine : sur les groupements sulfhydryl (Schiffman et coll., 1969), carboxyl (Molinari-Tosatti et Gotte, 1971), amine (Molinari-Tosatti et coll., 1971) ou sur des sites neutres (Urry, 1971 ; Rucker et coll., 1974). Dès 1944, Blumenthal et coll. ont observé par une analyse histomorphométrique de la média de l'aorte une augmentation du taux de calcium conjointe à la détérioration des fibres élastiques avec l'âge. Dans le cas de l'athérosclérose, la calcification de la paroi artérielle est également visible avant la formation de plaques intimes (Wilens, 1937). Dans l'aorte de rat âgé de 30 mois, la quantité de calcium lié à l'élastine est accrue par rapport à celle du rat jeune (Michel et coll., 1994).

1.2. Collagène

Les fibres de collagène sont constituées de longues chaînes protéiques dont l'unité structurale de base est le tropocollagène qui consiste en une hélice à trois brins, elle-même dérivant du précurseur procollagène. Le collagène est riche en glycine (35%), alanine (11%), proline et hydroxyproline (21%) et, à la différence de l'élastine, contient de l'hydroxylysine. Le collagène est très peu distensible par rapport à l'élastine (Burton, 1954).

Il existe cinq types de collagène (I, II, III, IV et V) dans la paroi vasculaire. Les types I et III, les plus importants pour les propriétés visco-élastiques artérielles, se situent au niveau de la média (Robert et Birembaut, 1987). Ces fibres de collagène (1 à 20 µm de diamètre) forment des trousseaux tortueux dans la média et l'adventice. Avec l'âge, le collagène devient de moins en moins soluble par suite de l'augmentation du nombre de liaisons de pontage entre acides aminés (Vater et coll., 1979). De plus, la glycosylation du collagène contribue à majorer la rigidité de l'artère (Brownlee et coll., 1984).

1.3. Protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des unités formées de 95% de polysaccharides et 5% de protéines. Ces longs polyanions peuvent lier l'eau et les cations, et par conséquent forment la base du milieu extracellulaire, la substance fondamentale. Les protéoglycanes se retrouvent

également dans les fibres élastiques normales (Baccarani-Contrì et coll., 1990) et interviennent dans la fibrogénèse et la physiologie des fibres élastiques, les protéoglycanes hautement hydratés maintenant la solubilité de la tropoélastine. Ainsi, ils jouent un rôle important dans la détermination des propriétés visco-élastiques des autres composants (tels que les fibres élastiques et fibres de collagène, et les cellules musculaires lisses et endothéliales) qui sont soumis à la déformation mécanique.

1.4. Fibronectine

Les cellules interagissent avec les constituants de la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de la fibronectine, une protéine qui se lie de façon réversible à la surface externe de la membrane plasmique. Elle est constituée de deux chaînes polypeptidiques liées entre elles par des ponts disulfures. Elle joue un rôle majeur dans les processus d'adhésion, migration, croissance et différenciation cellulaire. Les cellules musculaires lisses possèdent un récepteur spécifique pour la fibronectine, et l'interaction de ce dernier avec son ligand pourrait participer à la modification phénotypique de ces cellules (Bardy et coll., 1994).

1.5. Cellules musculaires lisses

1.5.1. Structure de la cellule musculaire lisse

La cellule musculaire lisse est une cellule fusiforme (diamètre 5 à 50 μm ; longueur 0,4 mm) ; elle contient des myofilaments orientés en diagonale par rapport au grand axe de la cellule. Ces myofilaments sont formés par une succession de filaments de myosine et d'actine, responsables de l'activité contractile. Ces cellules sont principalement orientées circonférentiellement, et leur contraction se fait donc essentiellement dans cette direction (Herlihy, 1980). La membrane plasmique présente des invaginations superficielles (*caveolae*) qui permettent une communication avec le milieu extracellulaire et une association avec le réticulum sarcoplasmique et les mitochondries.

L'activation de l'appareil contractile requiert une élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Bolton, 1979). Le principal site de fixation du calcium est une protéine régulatrice, la calmoduline, avec laquelle il forme un complexe $(\text{Ca}^{2+})_4$ -calmoduline. Ce dernier active une enzyme, la kinase de la chaîne légère de la myosine (KCLM, Figure 1.4 ; Adelstein et coll., 1980). Cette activation entraîne une phosphorylation de la chaîne légère de la myosine permettant l'interaction entre les filaments de myosine et d'actine. Cette étape consomme de l'énergie ; celle-ci provient de l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP ; Kamm et Stull, 1985) permettant ainsi de convertir de l'énergie chimique en énergie mécanique. Lorsque le niveau de Ca^{2+} cytosolique devient inférieur à 10^{-7} M, il y a réversibilité du phénomène par action de phosphatases de la myosine qui déclenche la relaxation.

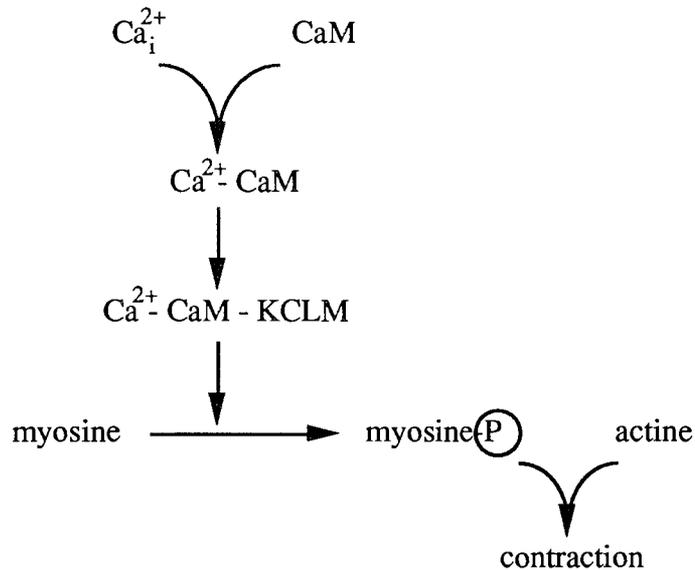


Figure 1.4. Mécanisme de la contraction musculaire lisse. KCLM = kinase de la chaîne légère de la myosine, CaM = calmoduline.

1.5.2. Rôle du calcium dans la contraction

L'accroissement de la $[Ca^{2+}]_i$ à la suite d'un stimulus excitateur, peut avoir plusieurs origines : influx au travers de la membrane plasmique du calcium extracellulaire par différents types de canaux ou par diffusion passive, et libération intracellulaire, principalement du réticulum endoplasmique (Figure 1.5).

1.5.2.1. Pénétration passive

Le calcium peut entrer passivement dans le cytoplasme suivant son gradient de concentration par des canaux de fuites (*leak channels*, Figure 1.5 : A). En effet, Williams et coll. (1985) ont estimé des concentrations calciques extracellulaire et cytoplasmique de 2 mM et 150 nM, respectivement, indiquant ainsi un gradient de concentration d'environ 10000 fois.

1.5.2.2. Canaux calciques

Deux types de canaux calciques ont été décelés dans la cellule musculaire lisse vasculaire (Bean et coll., 1986 ; Benham et coll., 1987). L'activation de l'un dépend du potentiel de membrane (canal VOC, *voltage-operated channel*, Figure 1.5 : B) et celle de l'autre est associée à l'activation d'un récepteur (canal ROC, *receptor-operated channel*, Figure 1.5 : C). L'ouverture des canaux VOC est due à une dépolarisation membranaire, et des courants de Ca^{2+} entrant deviennent apparents à des potentiels d'environ -40 mV avec un maximum vers 0 mV. Deux sous-groupes de canaux ont été décelés au niveau vasculaire : (1) le type L, dont le seuil de

sensibilité est élevée et la sélectivité faible pour le Ca^{2+} (Pacaud et coll., 1987), peut être bloqué par plusieurs composés organiques tels que les dihydropyridines, le vérapamil et le diltiazem, (2) le type T, de seuil de sensibilité faible, est relativement insensible aux dihydropyridines (Pacaud et coll., 1987).

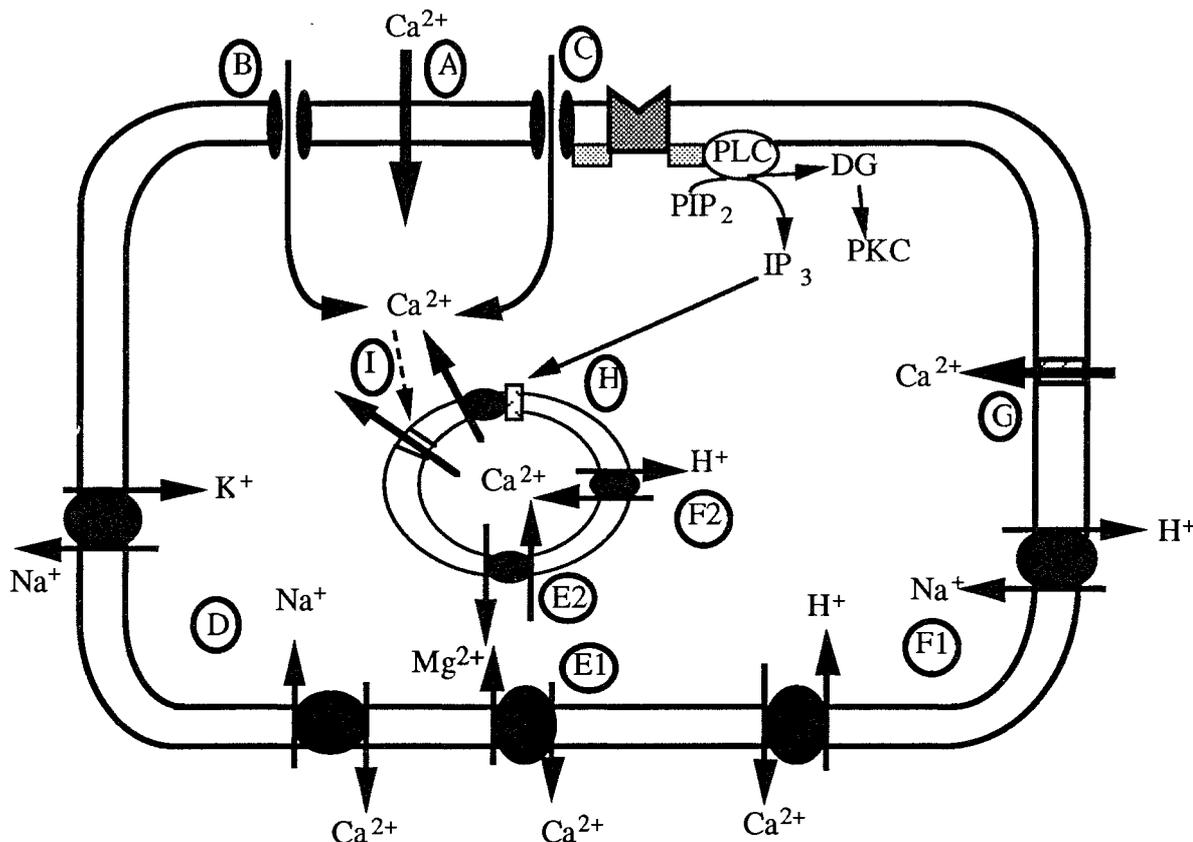


Figure 1.5. Principaux mouvements de calcium au niveau de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique d'une cellule. PLC = phospholipase C, DG = diacylglycérol, IP₃ = inositol triphosphate, PKC = protéine kinase C.

1.5.2.3. Échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Figure 1.5 : D)

Lorsque la membrane plasmique est dépolarisée, une entrée de Ca^{2+} se produit par cet échangeur (Blaustein et coll., 1986) qui possède une stoechiométrie de 3 Na^+ pour 1 Ca^{2+} (Rasgado-Flores et Blaustein, 1987). Une sortie de Ca^{2+} est observée soit quand la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est augmentée, soit en absence d'activation ou en phase de repolarisation de la membrane (Blaustein et coll., 1986). Cet échangeur a une faible affinité, mais une grande capacité de transport pour le Ca^{2+} . Ce système est également dépendant du gradient sodique maintenu par la pompe Na^+/K^+ -ATPase.

1.5.2.4. $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase membranaire (Figure 1.5 : E1)

Cette pompe a une grande affinité, mais une faible capacité de transport pour le Ca^{2+} . Elle participe à la diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ par extrusion de l'ion vers le milieu extracellulaire (Eggermont et coll., 1988). Lorsque la membrane est dans un état dépolarisé, cette extrusion de Ca^{2+} est augmentée (Furukawa et coll., 1989).

1.5.2.5. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -ATPase membranaire (Figure 1.5 : F1)

Cette pompe a une forte affinité mais une faible capacité de transport pour le Ca^{2+} , ne permettant l'extrusion que d'une faible quantité de Ca^{2+} (Carafoli, 1987). Cette pompe possède une stoechiométrie de 2 H^+ pour 1 Ca^{2+} .

1.5.2.6. Canaux de déformation (Figure 1.5 : G)

Ces canaux sont sensibles aux conditions mécaniques appliquées à la cellule musculaire lisse. Ainsi, l'élévation de la pression transmurale peut induire l'ouverture de ces canaux et permettre un influx de Ca^{2+} (Henrion et coll., 1992).

1.5.2.7. Réserves calciques intracellulaires

L'augmentation cytoplasmique de Ca^{2+} peut également provenir de la libération de Ca^{2+} à partir d'organelles intracellulaires tels que le réticulum sarcoplasmique ou la mitochondrie. En effet, en absence de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire, des agonistes tels que l'histamine et la noradrénaline peuvent provoquer une contraction associée à une élévation de Ca^{2+} cytoplasmique (Deth et Van Breemen, 1974). La mitochondrie, dont le rôle dans la régulation physiologique de la contraction est probablement réduit, semble n'intervenir que lorsque le Ca^{2+} intracellulaire a une concentration élevée afin de le séquestrer (Rasgado-Flores et Blaustein, 1987). Le réticulum sarcoplasmique constitue le principal site de stockage du Ca^{2+} intracellulaire. Le Ca^{2+} sarcoplasmique peut être libéré par ouverture d'un canal calcique consécutive à l'activation par l'inositol triphosphate (IP_3 ; Figure 1.5 : H) de récepteurs sarcoplasmiques spécifiques (Ehrlich et Watras, 1988 ; Chadwick et coll., 1990). L' IP_3 provient du clivage du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate membranaire (PIP_2) à la suite d'une activation réceptorielle au niveau de la membrane plasmique. D'autres mécanismes permettent également la libération de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique. Des canaux calciques différents de ceux activés par l' IP_3 peuvent être activés par la caféine et le Ca^{2+} lui-même (Figure 1.5 : I) (Saida et Van Breemen, 1983 ; Saida et coll., 1988). Le recaptage de Ca^{2+} peut s'effectuer grâce aux $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - (Figure 1.5 : E2) et $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -ATPases (Figure 1.5 : F2) de la membrane du réticulum sarcoplasmique qui pourraient être régulées par une protéine, le phospholambane.

1.6. Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales forment une couche monocellulaire qui tapisse la face luminale des vaisseaux. Au niveau artériel, ces cellules sont allongées, aplaties, disposées de façon uniforme et orientées dans la direction principale du flux sanguin. Le cytosquelette permet l'attachement de ces cellules aux couches sous-jacentes et est important pour le maintien de leur forme. Elles sont attachées entre elles par deux types de jonctions : serrées et communicantes, permettant respectivement la formation de zones étanches et la communication inter-cellulaire.

Les cellules endothéliales possèdent plusieurs propriétés importantes qui sont principalement : (1) une activité sécrétoire et métabolique, (2) une activité antithrombotique, et (3) une activité de barrière sélective empêchant le passage des constituants du sang vers la paroi artérielle. L'endothélium synthétise par exemple la prostacycline (vasorelaxante et antiagrégante plaquettaire). Il intervient dans le métabolisme des catécholamines, de la sérotonine, de peptides tels que la bradykinine, l'angiotensine, conduisant à un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire. Les cellules endothéliales synthétisent également des constituants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, l'élastine, la fibronectine (Birdwell et coll., 1978) et les protéoglycanes (Kinsella et Wight, 1986).

2. Organisation de la paroi artérielle

La paroi artérielle est constituée de trois tuniques concentriques séparées entre elles par des limitantes élastiques : l'intima, la média et l'adventice (Figure 1.6).

L'intima est constituée par une monocouche de cellules endothéliales qui reposent sur une membrane basale, séparée de la limitante élastique interne par un espace sous-endothélial.

La média est constituée d'unités fibrolamellaires qui sont des faisceaux musculo-élastiques (Clark et Glagov, 1985 ; Figure 1.6). Le nombre de ces unités fibrolamellaires varie avec la taille de l'artère. Les faisceaux musculo-élastiques sont organisés en couches bien définies dans le plan transversal d'une section. Ils sont constitués de lamelles élastiques disposées en feuillets fibrillaires cylindriques séparés par les cellules musculaires lisses parallèles entre elles. Le réseau de fibres de collagène est associé au tissu élastique sans y être directement connecté (Berry, 1987).

L'adventice est constituée de tissu conjonctif lâche avec des fibroblastes et des monocytes-macrophages quiescents. Le nombre de fibres élastiques y est très limité par rapport à celui de la média et à la quantité relative de collagène de l'adventice (Wolinsky et Glagov, 1964). De plus, ces fibres élastiques ne montrent pas de variations morphologiques aussi importantes que celles

de la média lors de variations de pression (Wolinsky et Glagov, 1964). En effet, les fibres élastiques de la média prennent une forme en accordéon à faible pression, puis une forme droite étirée à partir de 80 mmHg.

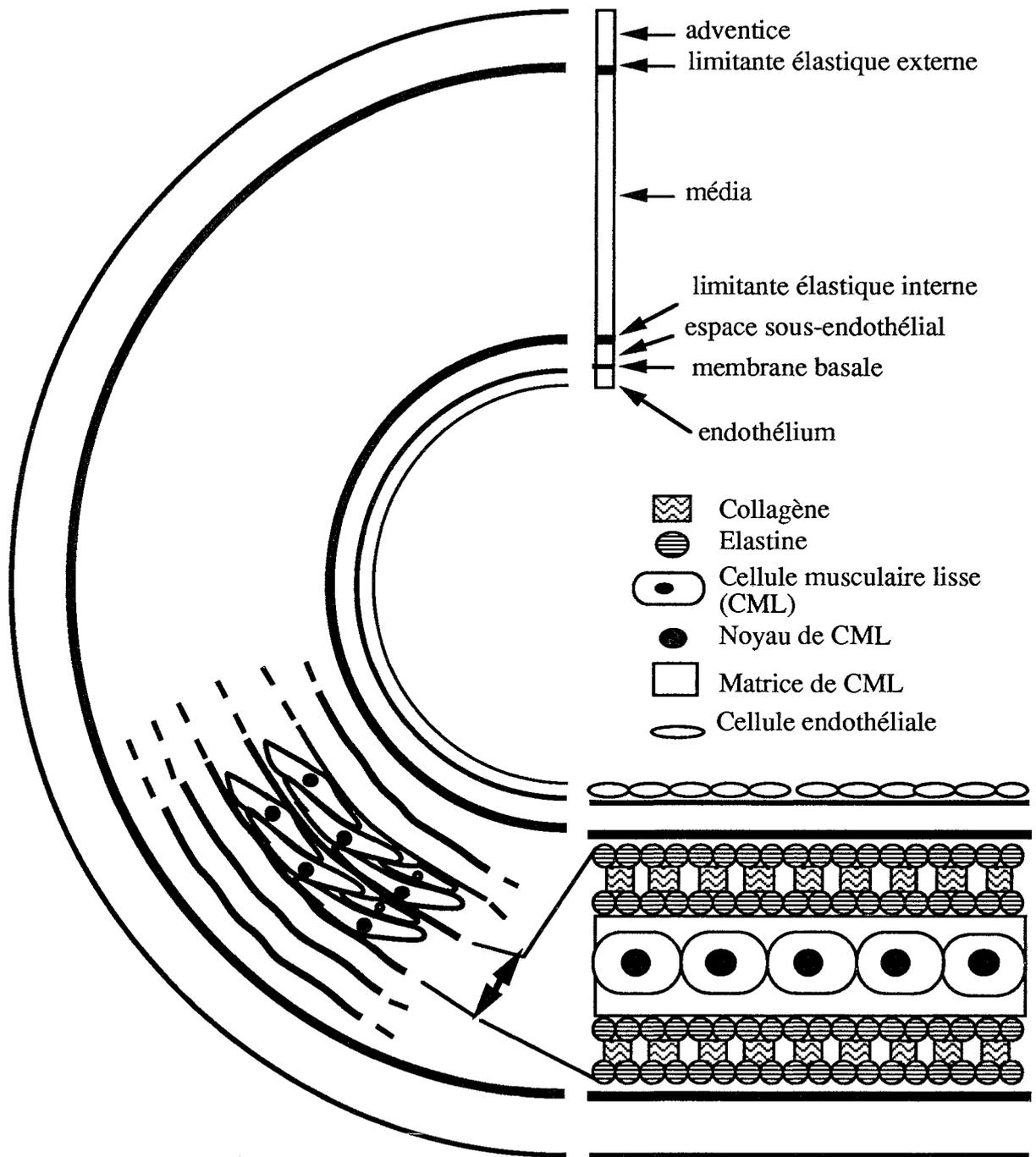


Figure 1.6. Schéma des différentes couches de la paroi artérielle (partie gauche, coupe circulaire) et représentation schématique d'une unité fibrolamellaire (coupe axiale) avec les différents éléments constituant la média d'après Clark et Glagov (1985) (partie droite).

3. Le système artériel

Au fur et à mesure que l'on s'éloigne du cœur, le diamètre des artères diminue (et le rapport de l'épaisseur de la paroi sur ce diamètre augmente), tandis que la section transversale totale augmente, ceci par division importante de l'arbre artériel (Figure 1.7). De la même façon, la proportion des différents éléments constitutifs de la paroi artérielle varie avec la distance cœur-vaisseau. On distingue ainsi d'abord les artères de type élastique, puis celles de type musculaire avec, respectivement, une forte proportion d'élastine ou de cellules musculaires lisses au niveau de la média.

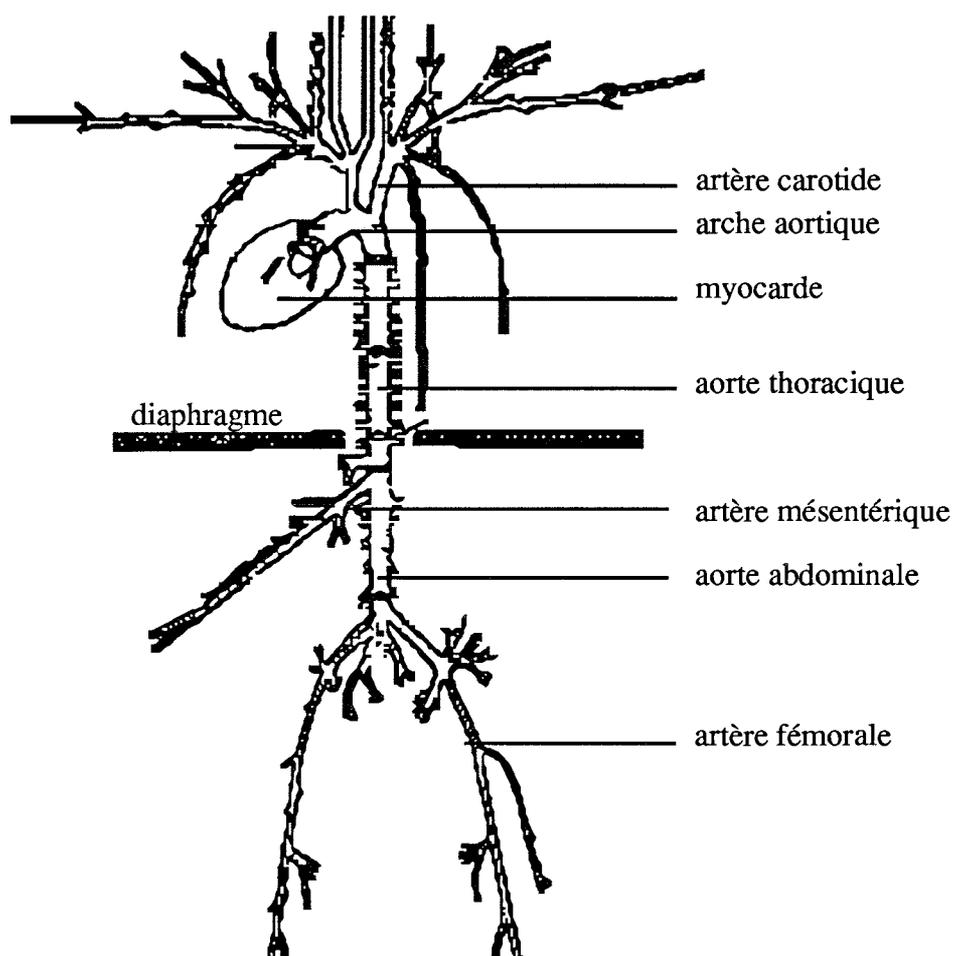


Figure 1.7. Système vasculaire d'un chien. D'après McDonald (1974).

Les artères dites élastiques (aorte et portions proximales des gros troncs artériels tels que l'artère pulmonaire, le tronc brachio-céphalique, les artères carotides communes, les artères iliaques primitives), ont pour fonction (1) de conduire le sang du cœur vers la périphérie, et (2) de transformer le débit pulsé provenant du ventricule gauche en un débit continu.

Les artères dites musculaires (1) assurent la distribution du sang dans les différents lits vasculaires, et (2) atténuent l'amplitude des ondes de pression (McVeigh et coll., 1991). Les artères musculaires les plus distales (artérioles) s'opposent à l'écoulement du sang et sont ainsi responsables des résistances vasculaires qui déterminent en partie le niveau de pression.

4. Caractéristiques et paramètres définissant l'élasticité de la paroi artérielle

Une artère de type élastique de par sa composition complexe est un tube visco-élastique dont le diamètre varie sous la pression pulsée. Elle permet la propagation des ondes de pression et de flux sanguin à partir du ventricule gauche. Il convient donc de rappeler les propriétés et la définition d'un corps visco-élastique.

4.1. Elasticité

C'est la propriété que possède un corps de regagner sa forme initiale après que la force ayant entraîné sa déformation ait cessé. La force ou contrainte que subit l'artère est définie comme étant la force appliquée par unité de surface (σ) :

$$\sigma = F/A \text{ (dyne/cm}^2\text{)}$$

où F est la force et A la surface d'une section transversale.

Cette contrainte peut prendre différentes formes :

- contrainte de traction ou de rétractation, induisant un changement de la longueur de l'objet (Figure 1.8A),
- contrainte de compression, réduisant les dimensions de l'objet (Figure 1.8B),
- contrainte de cisaillement qui s'exerce tangentiellement à l'axe (Figure 1.8C).

Lorsque la contrainte est appliquée à l'objet, celui-ci subit une déformation (ϵ) qui pourra prendre différentes formes :

- déformation longitudinale correspondant à une modification de la longueur, positive lors d'un allongement (Figure 1.8A) et négative lors d'un raccourcissement. La déformation relative de l'objet sera :

$$\epsilon = \Delta l/l_0$$

où Δl est la variation de la longueur et l_0 la longueur initiale.

- déformation compressive (Figure 1.8B) ou expansive, correspondant à un changement de volume,
- déformation de cisaillement, quand la déformation est angulaire, c'est-à-dire un déplacement de deux points appartenant à des plans parallèles dans une direction parallèle à ces plans (Figure 1.8C).

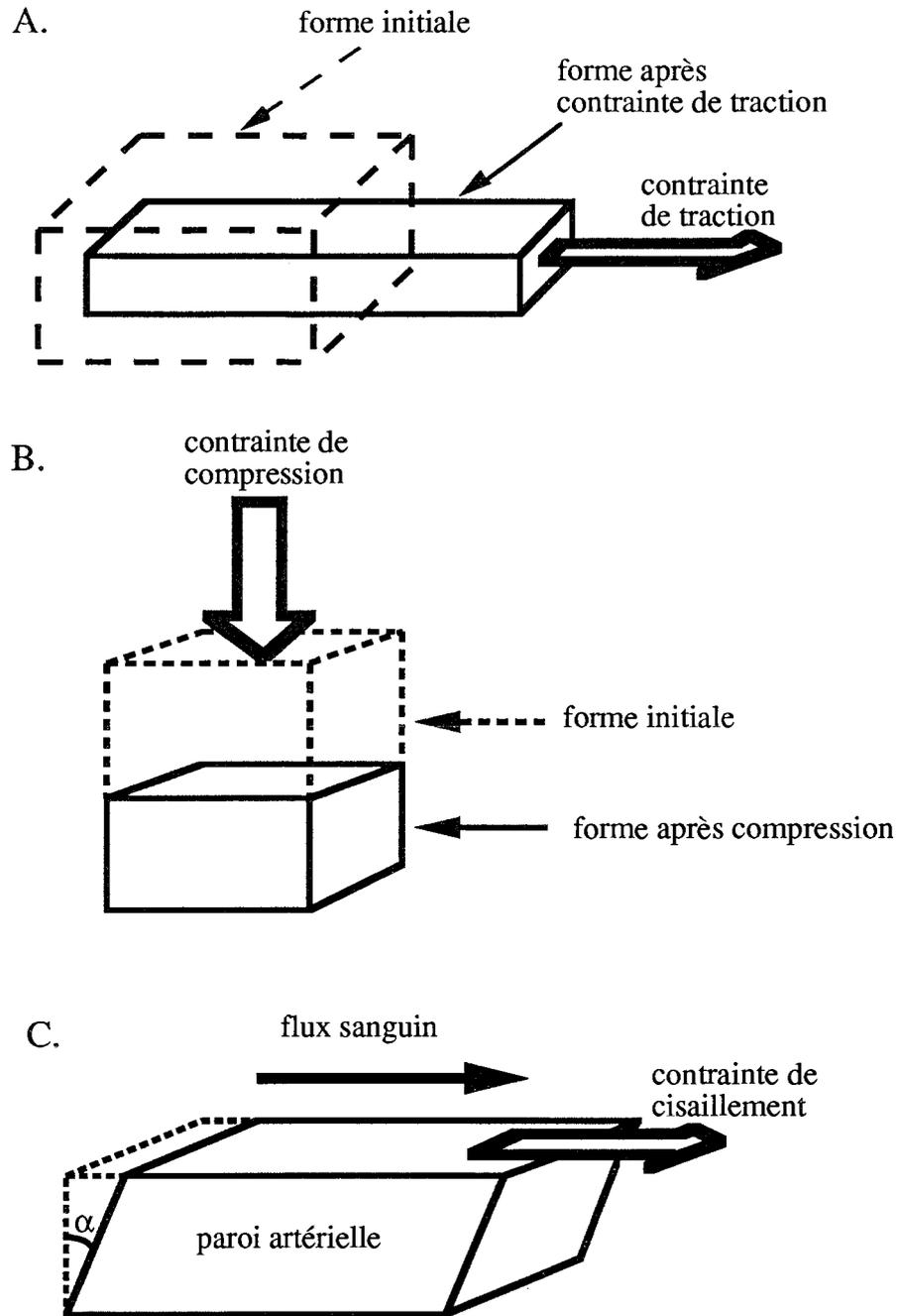


Figure 1.8. Exemples de contrainte s'exerçant sur la paroi artérielle. **A.** : Contrainte de traction entraînant une élévation. **B.** : Contrainte de compression entraînant une diminution de volume. **C.** : Contrainte de cisaillement due au frottement de la lame de sang circulante la plus externe entraînant une déformation mesurée par l'angle de cisaillement α . D'après Milnor (1989).

Dans le cas d'un allongement de l'objet, celui-ci deviendra simultanément plus mince dans la direction transversale. Le rapport des déformations transversale / longitudinale, appelé rapport de Poisson, sera compris entre 0 et 0,5 (McDonald, 1974). Pour une artère, le rapport de Poisson est certainement proche de 0,5 (Nichols et O'Rourke, 1990) en considérant que les propriétés élastiques sont isovolumétriques pendant la déformation (Carew et coll., 1968). Ainsi, pour de faibles allongements, le volume du solide reste constant quand il est étiré. Si ce rapport était égal à zéro, l'augmentation du volume serait proportionnelle au changement de longueur.

Les contraintes appliquées à la paroi artérielle sont à l'origine de ces déformations. Dans un segment artériel cylindrique, une contrainte peut théoriquement provoquer une déformation dans trois directions : longitudinale dans l'axe luminal, radiale et circumférentielle (Figure 1.9).

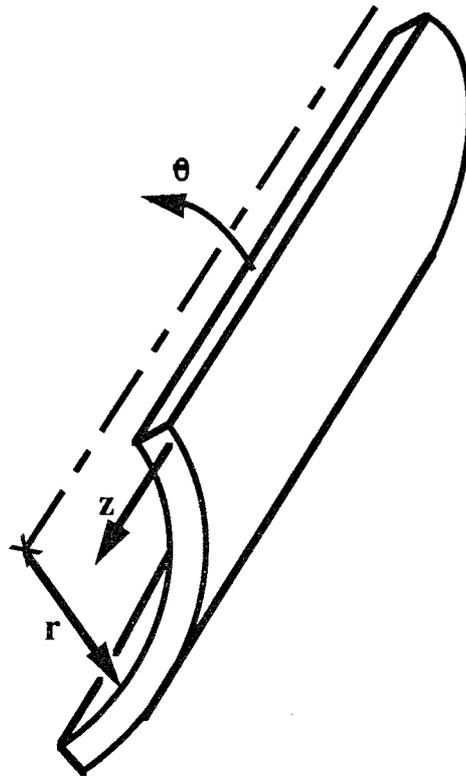


Figure 1.9. Schéma d'un segment artériel illustrant les trois directions pour la contrainte et la déformation : circumférentielle (θ), longitudinale (z) et radiale (r). D'après Dobrin (1978).

De même, trois principales contraintes, dont l'origine est la pression artérielle, peuvent être définies selon leur direction d'application :

- contrainte longitudinale = $P \times (R_i^2 / (R_e^2 - R_i^2))$,
- contrainte radiale = $P/2$,
- contrainte circumférentielle = T (voir ci-dessous),

où P est la pression artérielle de distension, R_i le rayon interne et R_e le rayon externe. La plus importante est la contrainte circumférentielle T .

Pour un cylindre de paroi très mince, comme la paroi des artères dites élastiques dont le rapport épaisseur pariétale / rayon interne est compris entre 0,06 et 0,16 (pour références Nichols et O'Rourke (1990)), il s'exerce une tension pariétale déterminée par la loi de Laplace :

$$T = P \times R_i \quad (\text{dyne/cm})$$

Si l'épaisseur de la paroi artérielle est h , la contrainte circonférentielle est déterminée par l'équation de Lamé :

$$T = P \times R_i / h \quad (\text{dyne/cm}^2)$$

Les contraintes ont le même caractère pulsé que la pression artérielle qui en est à l'origine. En moyenne, la contrainte circonférentielle est la plus élevée ; les contraintes longitudinale et radiale ne représentent respectivement que 50% et 5% de la contrainte circonférentielle (Dobrin, 1983).

4.2. Relation entre contrainte et déformation

La loi de Hooke stipule que, dans certaines limites, la déformation d'un corps parfaitement élastique est proportionnelle à la contrainte (Figure 1.10). Cette relation est exprimée par le module élastique (E) qui est égal au rapport de la contrainte sur la déformation :

$$E = \sigma / \varepsilon = F \times l / A \times \Delta l \quad (\text{dyne/cm}^2)$$

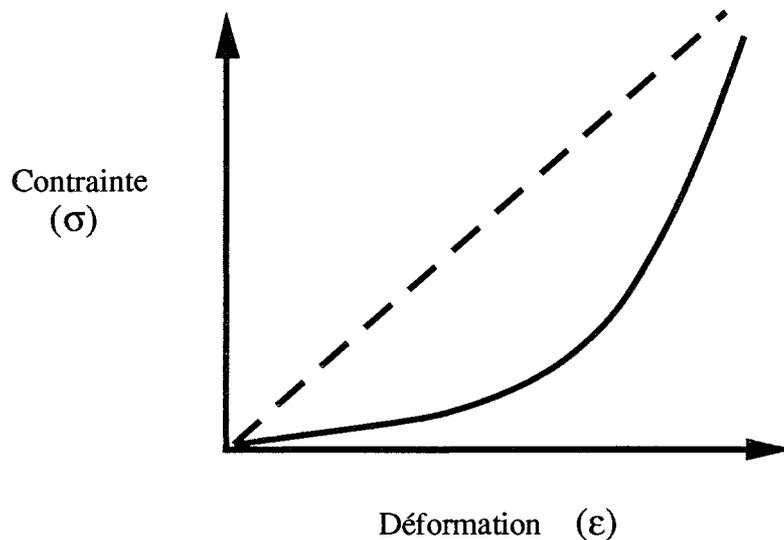


Figure 1.10. Représentation schématique de la relation contrainte-déformation pour un corps parfaitement élastique (trait en pointillés) et un corps visco-élastique tel qu'une artère (trait continu). La tangente à chaque point de la courbe représente le module élastique incrémental. D'après Dobrin (1978).

Plus la valeur de E est élevée, plus le matériel est rigide. Ce module élastique est une constante caractéristique d'un corps. Ainsi, le module élastique du collagène serait compris entre $0,3$ et $2,5 \times 10^{10}$ dynes/cm², soit environ 1000 fois plus élevé que celui de l'élastine ($1,5-4,1 \times 10^6$ dynes/cm²), traduisant ainsi sa faible élasticité (voir pour références Dobrin, 1978).

L'élasticité d'un objet n'est pas infinie. Il existe en effet une intensité de contrainte à partir de laquelle la loi de Hooke ne s'applique plus, le point limite d'élasticité, au-delà duquel l'objet déformé ne pourra retrouver sa forme initiale.

4.3. Contrainte et déformation de la paroi artérielle

La paroi artérielle étant considérée incompressible lors d'une déformation (Carew et coll., 1968 ; Girerd et coll., 1992) et la déformation de cisaillement étant négligeable (Patel et Fry, 1964), la déformation induite par une contrainte sera principalement de rétractation ou d'extension.

La paroi artérielle, non homogène, ne se comporte pas comme un objet complètement élastique et est caractérisée par une relation contrainte-déformation non linéaire (Figure 1.10). Dans ce cas, il est plus approprié d'utiliser le module élastique incrémental (E_{inc}) qui détermine la pente (ou tangente) de la relation contrainte-déformation aux différents points de la courbe :

$$E_{inc} = \Delta\sigma/\Delta\varepsilon \quad (\text{dyne/cm}^2)$$

En considérant un tube isotropique, c'est-à-dire de propriétés identiques dans toutes les directions, et des déformations faibles, les déformations induites par la contrainte dans les trois directions possibles peuvent être résolues comme suit :

$$E' = (\Delta P/\Delta R_e) \times [2 \times R_i^2 R_e / (R_e^2 - R_i^2)] \quad (\text{dyne/cm}^2)$$

où ΔP est la variation de pression, ΔR_e la variation du rayon externe, R_e le rayon externe, R_i le rayon interne. Dans la pratique, cette équation est utilisée pour calculer le module élastique incrémental (E_{inc}) (Cox, 1977).

Si le module élastique de l'artère reste constant, le volume intraluminal augmente avec la pression jusqu'à un point limite où l'artère devrait éclater. Cependant, le module élastique des vaisseaux sanguins s'accroît conjointement avec la déformation circonférentielle : cela permet aux artères de maintenir leur intégrité structurale dans un large domaine de pression. Ainsi, le vaisseau devient de moins en moins élastique au fur et à mesure que la déformation augmente (Milnor, 1989).

Contrairement à ce qui survient pour un corps parfaitement élastique, le facteur temps, c'est-à-dire la vitesse avec laquelle la contrainte est appliquée joue un rôle important. Ainsi, pour un élément doté simultanément des propriétés apparentées à un solide élastique et à un liquide visqueux, la déformation dépendra non seulement de l'amplitude de la contrainte, mais également de sa vitesse d'application, déterminant ainsi les propriétés visco-élastiques de la paroi artérielle.

Si cette dernière est étirée rapidement, elle devient plus rigide que si l'étirement est lent.

Deux types de module élastique sont déterminés :

(1) le module élastique statique (E_{stat}), correspond à celui précédemment défini lorsque la pression est statique,

(2) le module élastique dynamique (E').

Ce dernier module est obtenu par application d'une contrainte sinusoïdale de fréquence déterminée à l'origine d'une déformation également sinusoïdale (Figure 1.11). Il se définit comme un nombre complexe et possède deux composantes : l'une élastique dite partie réelle ($E'\cos\phi$) et l'autre visqueuse dite partie imaginaire ($\eta\omega = E'\sin\phi$), où ϕ est l'angle de phase (temps de décalage entre les variations de pression et les variations de diamètre), η le coefficient de viscosité, ω la vitesse angulaire. E' représente l'amplitude du module élastique complexe.

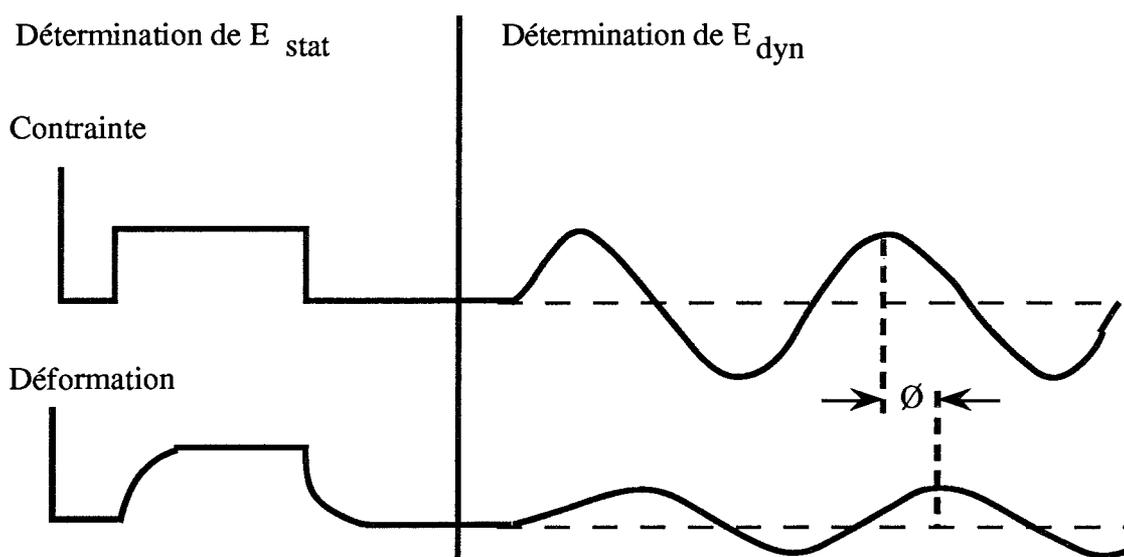


Figure 1.11. Déformations induites par une contrainte statique ou sinusoïdale permettant la détermination du module élastique statique (E_{stat}) ou dynamique (E_{dyn}), respectivement.

Lorsque la composante visqueuse est nulle ou relativement faible par rapport à la composante élastique, $E'\cos\phi$ est une bonne estimation du module élastique dynamique (Bergel, 1961a). Lorsque la fréquence s'élève de 0 à 2 Hz, la rigidité artérielle augmente fortement jusqu'à 59% pour le module élastique de l'artère carotide (Bergel, 1961a). Ces variations sont plus faibles pour des fréquences supérieures. La composante visqueuse quant à elle, reste relativement faible (Bergel, 1961a).

Ce module élastique dynamique mesuré *in vitro* peut être apprécié directement *in vivo* par la mesure du module élastique décrit par Peterson et coll. (1960), le module élastique de pression (E_p).

Cette méthode est simple à appliquer, car elle ne nécessite pas la mesure de l'épaisseur pariétale et ne dépend que de la pression artérielle et du diamètre interne :

$$E_p = \Delta P / (\Delta D / D) \quad (\text{dyne/cm}^2)$$

où ΔP est la variation de pression se produisant lors de chaque cycle cardiaque, c'est-à-dire la différence entre la pression systolique et la pression diastolique, ΔD l'oscillation du diamètre au cours de chaque cycle cardiaque, c'est-à-dire la différence entre le diamètre de systole et celui de diastole, D le diamètre moyen ou le diamètre de diastole.

4.4. Effets de la pulsativité sur la paroi artérielle

La pression artérielle par son caractère pulsé induit des contraintes également pulsées qui déforment la paroi artérielle. L'analyse des ondes de pression permet de définir plusieurs paramètres tels que : le pic systolique de pression, la vitesse d'ascension de la pression systolique, la pression différentielle c'est-à-dire la différence entre pressions maximale et minimale d'une pulsation de pression. Dans un autre domaine, des études réalisées sur les élastomères industriels ont montré que l'usure de ces composés est majorée lorsqu'ils sont soumis à une contrainte pulsée par rapport à une contrainte continue (Gent, 1972). Ce phénomène pourrait s'appliquer aux élastomères artériels. Toute modification des paramètres précédents peut entraîner à long terme des modifications structurales de la paroi artérielle et par conséquent altérer certaines fonctions hémodynamiques. Par exemple dans le cas de l'hypertension artérielle, caractérisée par une élévation de la pression différentielle, une fatigue des fibres élastiques suivie par leur désorganisation voire leur fragmentation est observée tandis qu'au niveau des cellules musculaires lisses, la synthèse de collagène augmente et le nombre de myofibrilles diminue (Leung et coll., 1976).

5. Propriétés de la paroi artérielle

De nombreux modèles expérimentaux et mathématiques ont tenté de mimer les propriétés visco-élastiques de la paroi artérielle. Cependant, aucun ne répond complètement aux réalités physiologiques. Ces modèles comportent deux types d'éléments, placés en série (Figure 1.12A), et/ou en parallèle (Figure 1.12B) selon différentes combinaisons : un ressort de module élastique connu représente l'élément élastique, et un *dashpot* (cylindre contenant un liquide de viscosité connue dans lequel se trouve une vanne) le comportement de flux visqueux.

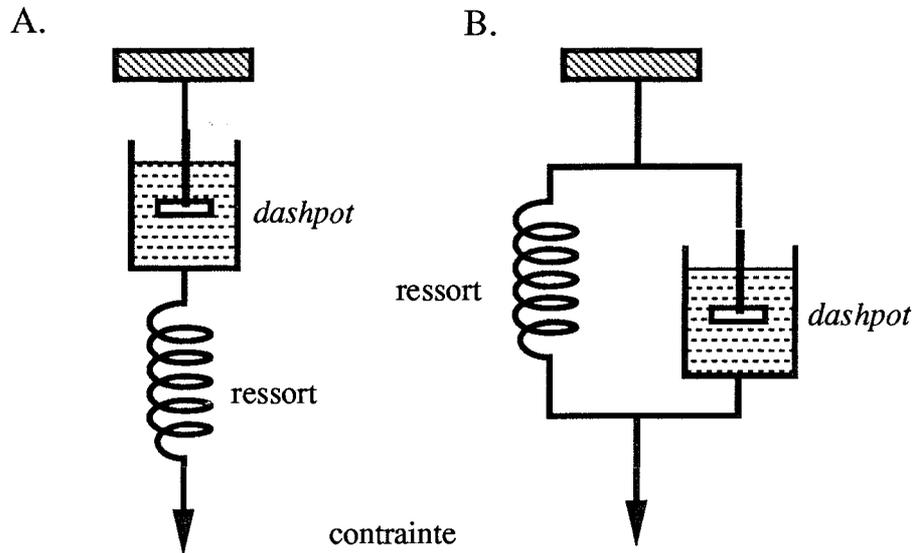


Figure 1.12. Exemple de modèles mécaniques possédant des propriétés élastiques et composés d'éléments élastique (ressort) et visqueux (*dashpot*). **A** : deux éléments en série, modèle de Maxwell (relaxation à la contrainte). **B** : deux éléments en parallèle, modèle de Voigt (*creep*). D'après Milnor (1989).

5.1. Relaxation à la contrainte

Lorsqu'une contrainte est appliquée soudainement, seul l'élément élastique répond initialement, puis la partie visqueuse se met en mouvement progressivement entraînant une diminution exponentielle de la contrainte (Figure 1.13). Ce phénomène a été observé *in vitro* sur l'artère carotide (Zatzman et coll., 1954) et l'aorte de chien (Apter, 1967). Cette propriété a été modélisée grâce à un ressort et un *dashpot* en série appelé modèle de Maxwell (Zatzman et coll., 1954), ou avec un ressort supplémentaire en parallèle du modèle de Maxwell (Apter, 1967).

5.2. Creep (glissement, ramper en français)

Le *creep* correspond à une réponse élastique retardée par rapport à la force appliquée, et à un développement lent vers la déformation finale (Figure 1.14). Ceci a été modélisé par un ressort et un *dashpot* en parallèle (Modèle de Voigt).

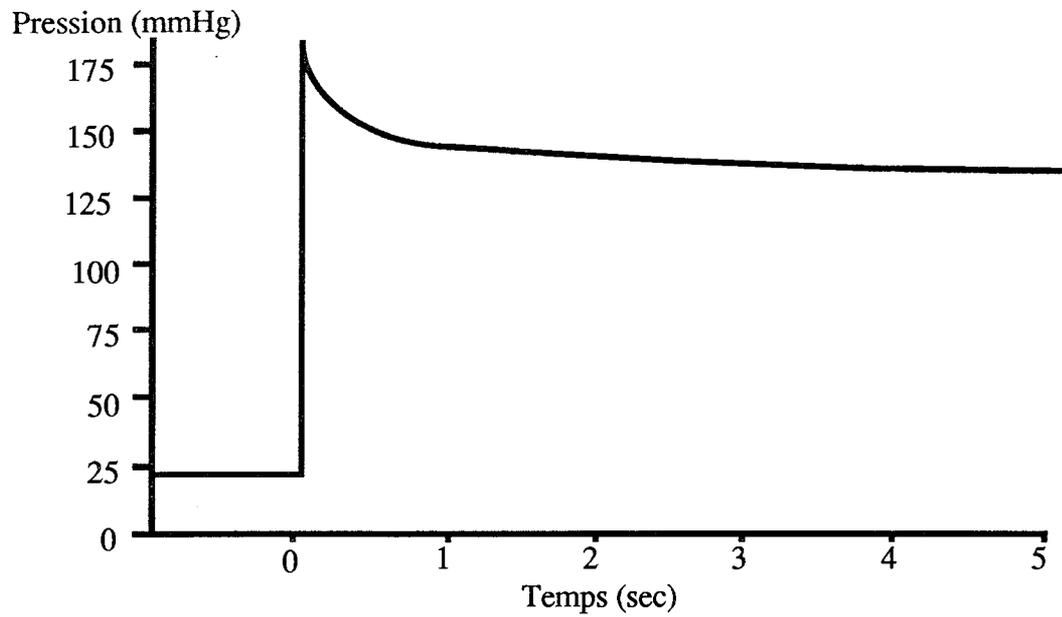


Figure 1.13. Courbe représentative de la relaxation à la suite de l'application d'une contrainte, c'est-à-dire une augmentation soudaine du volume du segment artériel au temps 0 suivie de son maintien constant. D'après Zatzman et coll. sur artère carotide de chien *in vitro* (1954).

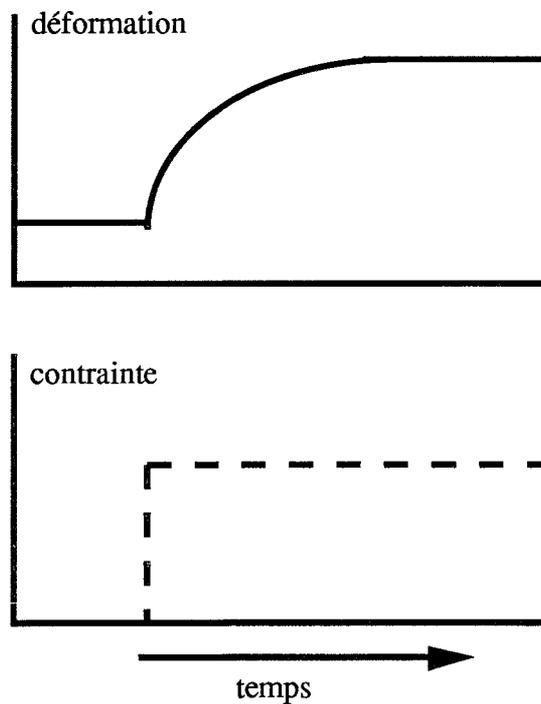


Figure 1.14. Phénomène de *creep*. D'après Milnor (1989).

5.3. Hystérésis

Lorsque le vaisseau est soumis à plusieurs cycles d'inflations et de déflations successives, son diamètre s'agrandit et le volume intraluminal peut augmenter de plus de 50% (Figure 1.15 ; Bergel, 1961b). De plus, les courbes d'inflation et de déflation d'un même cycle ne se superposent pas, mais forment une boucle d'hystérésis. La largeur de cette boucle diminue au fur et à mesure de la répétition des cycles (Remington, 1955 ; Bergel, 1961b ; Cox, 1978a).

5.4. Compliance

La compliance artérielle est la variation absolue de volume qu'induit une variation de pression artérielle ($\Delta V/\Delta P$, ml/mmHg). Lorsque la pression transmurale (différence entre la pression intra- et extra-vasculaire) s'élève, les vaisseaux se dilatent, permettant de stocker un volume de sang supplémentaire. La compliance est un facteur responsable de la forme et de l'amplitude des ondes de pression et de flux sanguin (Westerhof et coll., 1971). La compliance aortique constitue une partie de la post-charge imposée par le système vasculaire au ventricule gauche.

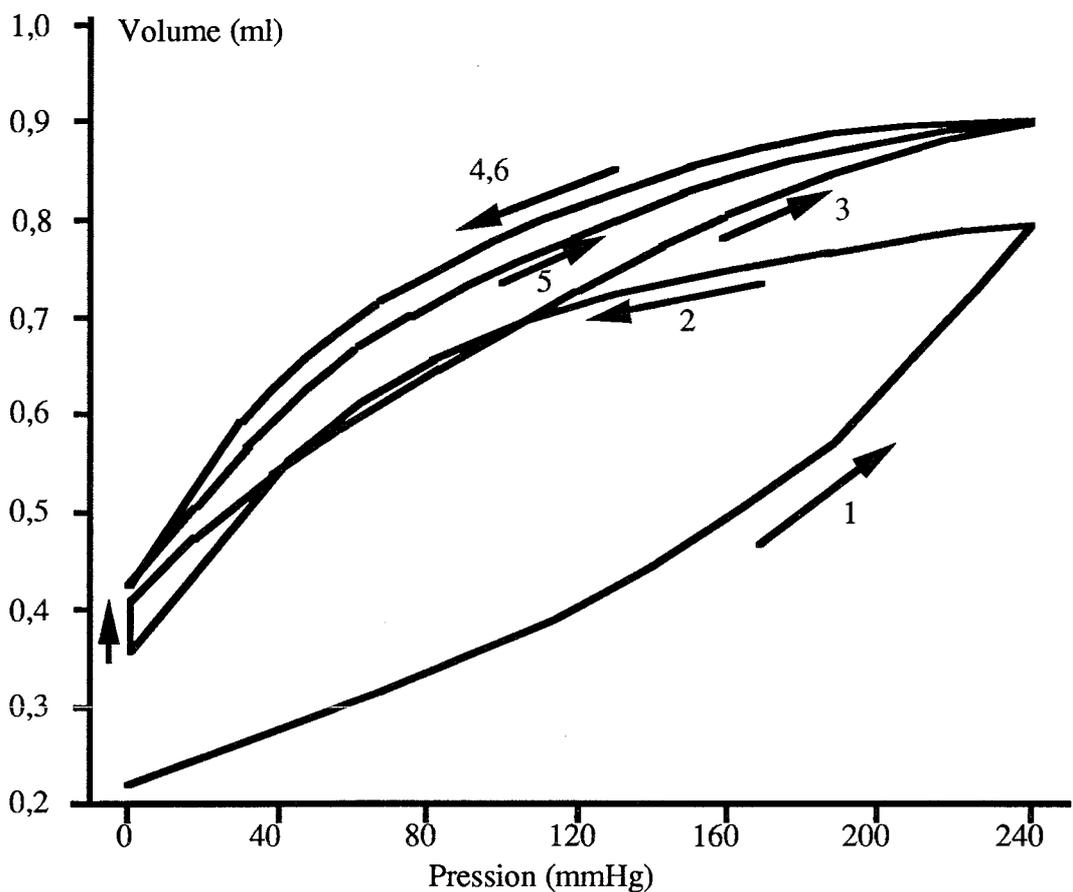


Figure 1.15. Trois cycles consécutifs de pressurisation-dépressurisation (indiquées par les flèches) de l'artère fémorale de chien *in vitro*. D'après Bergel (1961b).

5.5. Distensibilité

La distensibilité artérielle est la variation relative de volume qu'induit une variation de pression artérielle ($\Delta V/V_0\Delta P$). Celle-ci tient donc compte de la dimension initiale de l'artère (V_0) et doit être distinguée attentivement de la compliance. En effet, un vaisseau très distensible, mais de volume intraluminal initial faible, sera éventuellement moins compliant qu'un vaisseau dont le volume initial est plus élevé (Guyton, 1991).

6. Techniques d'évaluation des propriétés élastiques de la paroi d'un segment artériel

6.1. Mesure du diamètre

En se reportant aux paragraphes précédents, il est clair que la mesure du diamètre est essentielle, par exemple pour l'estimation du module élastique. La plupart des techniques utilisées ont été appliquées *in vivo* et *in vitro*.

Pour l'étude des propriétés élastiques il est important de mesurer les changements instantanés de diamètre (Patel et Vaishnav, 1972 ; McDonald, 1974 ; Milnor, 1989). Dans ce cas, la mesure doit être suffisamment précise pour détecter de faibles variations de diamètre. Par exemple, une variation de 50% de la pression intraluminaire au cours de chaque cycle cardiaque peut être accompagnée d'un changement de rayon inférieur à 5% (Peterson, 1966).

La plupart des études *in vitro* ont été réalisées sur des vaisseaux soumis à une pression statique. Les principales catégories d'instrumentation sont électriques, optiques et ultrasoniques.

6.1.1. Méthodes utilisant des capteurs de déformation (instruments électriques à résistance ou inductance)

6.1.1.1. Capteurs à résistance

Patel et coll. (1969) ont utilisé un instrument comportant une jauge métallique fixée à un pont métallique fin qui relie les deux bras du capteur (Figure 1.16). Ces derniers sont suturés à la paroi externe de l'artère. Quand la jauge métallique est étirée, un changement de l'aire transversale (et donc de la résistance) se produit. Cette jauge étant déformée par l'application d'une force, le pont de Wheatstone, auquel elle est reliée à un bras, n'est plus équilibré. Le changement de voltage en résultant est directement relié à la force appliquée. Ainsi les relations pression artérielle-diamètre ont été étudiées *in situ* sur l'aorte thoracique de chien (Patel et coll., 1969 ; Barnett et coll., 1961), *in vivo* sur l'artère carotide primitive humaine (Greenfield et coll., 1964).

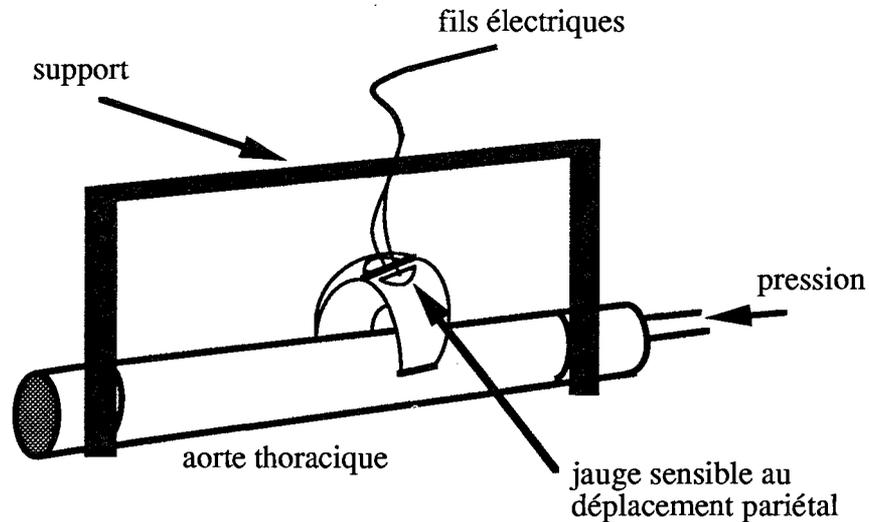


Figure 1.16. Système permettant la mesure des variations de diamètre artériel grâce à une jauge métallique reliant les deux bras du capteur de déformation. D'après Patel et coll. (1969).

6.1.1.2. Capteurs à inductance

Ceux-ci comportent un transformateur différentiel. Quand un changement de diamètre se produit, la résistance électrique de l'élément conducteur change, la variation de voltage est directement proportionnelle à celle du diamètre (Dobrin et Rovick, 1969 ; Dobrin, 1978). Pour mesurer le diamètre externe de l'artère carotide de chien, Dobrin et Rovick (1969) utilisèrent *in vitro* un capteur à déplacement linéaire constitué d'un disque d'une surface définie en contact avec le segment artériel (Figure 1.17). Ce disque est relié à un petit transformateur différentiel couplé à une jauge à déplacement micrométrique. Plus récemment, Cox (1977) atteint avec un capteur similaire une résolution de $\pm 2 \mu\text{m}$. Des changements de diamètre de $\pm 10 \mu\text{m}$ sont mesurés avec une précision meilleure que $1 \mu\text{m}$ (Langewouters et coll., 1984). Ce type d'instrument a également été utilisé *in vivo* (Gow, 1966).

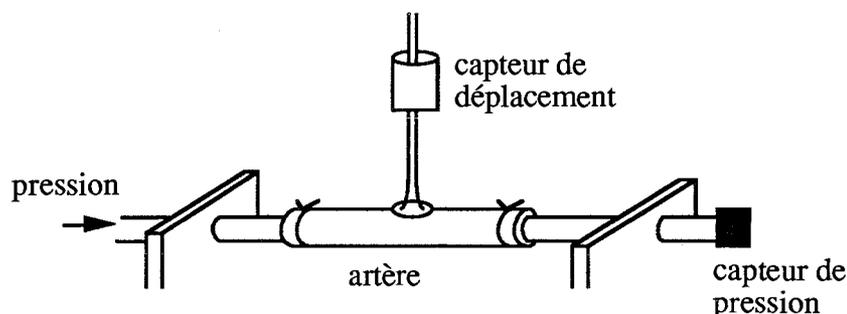


Figure 1.17. Schéma de mesure de diamètre par un capteur à déplacement linéaire. D'après Dobrin et Rovick (1969).

Ces deux types de capteurs électriques (à résistance ou à inductance) doivent répondre à plusieurs caractéristiques :

- leur poids et rigidité doivent être minimaux pour laisser la paroi artérielle libre de tout mouvement.

- ils doivent avoir des caractéristiques de fréquence dynamique similaires à celles des instruments utilisés pour la mesure d'autres paramètres, tels que la pression artérielle. Par exemple, les capteurs utilisés par Langewouters et coll. (1984) ont une réponse en fréquence essentiellement plate et aucun décalage de phase jusqu'à 30 Hz.

- ils doivent avoir une bonne linéarité de réponse.

6.1.2. Méthodes optiques

Le principe de base est de placer le vaisseau dans le champ d'un faisceau lumineux qui est de largeur supérieure au diamètre du vaisseau et perpendiculaire à son axe longitudinal. La quantité de lumière transmise mesurée dépend du diamètre du vaisseau, elle est d'autant plus faible que le diamètre est élevé, et inversement.

Bergel (1961b) utilisa cette méthode photo-électrique pour la mesure *in vitro* du diamètre externe de différentes artères de chien (aortes thoracique et abdominale, artères fémorale et carotide). L'ombre formée par le vaisseau contrôle la quantité de lumière détectée par un photomultiplicateur relié à un amplificateur et un oscilloscope. La résolution de la mesure est de $\pm 4\%$ et des changements de diamètre d'environ 6 μm peuvent être détectés. En parallèle, la pression intraluminale est mesurée par un capteur introduit dans la lumière du vaisseau, au niveau de la mesure du diamètre (Bergel, 1961b).

Une autre méthode optique est l'utilisation d'un microscope permettant une précision de mesure de $\pm 3 \mu\text{m}$ sur l'artère centrale de l'oreille de lapin (Speden et Freckelton, 1970).

Plus récemment, l'emploi de caméra et systèmes vidéo s'est développé (Harder, 1987 ; Bell et coll., 1988 ; Meininger et coll., 1991 ; Takamizawa et coll., 1992). La caméra enregistre une image amplifiée du vaisseau qui est affichée sur un écran de télévision.

Les méthodes optiques ont également été appliquées pour la mesure de changements phasiques du diamètre, c'est-à-dire sur artères *in situ* ou sur artères *in vitro* soumises à une pression pulsée. Bergel (1961a) mesura *in vitro* les variations instantanées de diamètre aortique lors de variations sinusoïdales du volume intraluminale induites par une pompe à piston (Figure 1.18). Tandis que la pression moyenne est maintenue stable à 100 mmHg, des pulsations de pression de $\pm 5-10$ mmHg entraînent des variations de rayon de $\pm 2-3\%$ (Bergel, 1961a).

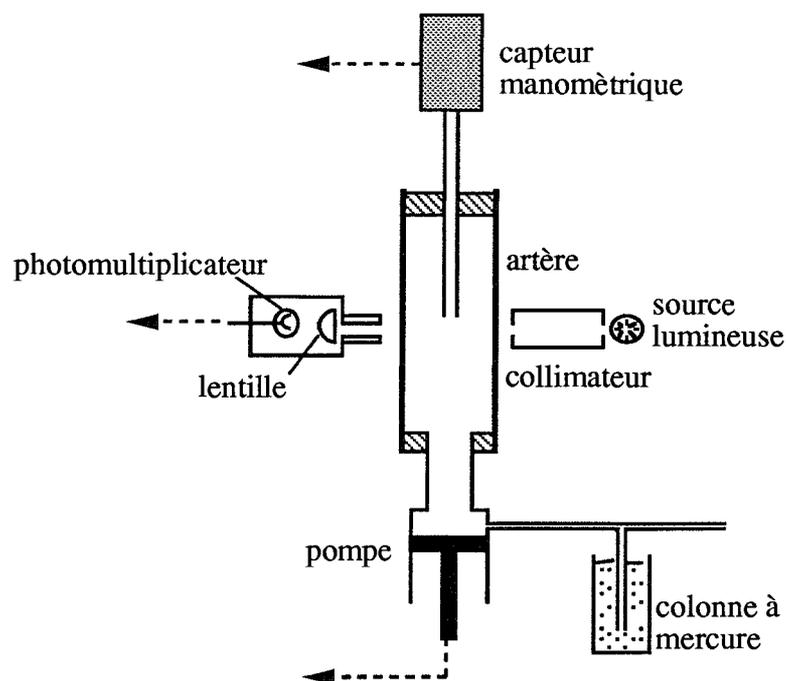


Figure 1.18. Schéma du système optique de mesure du diamètre de l'artère soumise à une pression sinusoïdale. D'après Bergel (1961a).

Wetterer et coll. (1977) développèrent un appareil photoélectrique pour suivre *in situ* les variations phasiques de diamètre artériel. Cette technique a été également utilisée *in vitro* sur l'artère caudale de rat (Burger et coll., 1984) et l'artère coronaire de chien (Busse et coll., 1983). Cet appareil développé par Wetterer et coll. (1977) a permis de mesurer *in vivo* les propriétés élastiques dynamiques d'artères canines (Wetterer et coll., 1978) et humaines (Summa, 1978).

Plus récemment, Brant et coll. (1987) ont employé un laser He-Ne (Figure 1.19). Un faisceau de lumière monochromatique (632,8 nm) de largeur supérieure au diamètre du segment artériel est émis perpendiculairement à l'axe longitudinal de ce dernier. La présence de l'artère dans le faisceau empêche la lumière d'atteindre la cellule réceptrice pendant un intervalle de temps t . Connaissant en plus la vitesse de balayage du faisceau, il est possible de déterminer le diamètre externe au cours de la perfusion pulsée de l'artère (Figure 1.19). Par cette technique il est également possible de mesurer le diamètre interne et l'épaisseur pariétale en alignant le segment artériel, fixé sur un support spécial, dans l'axe du laser (Brant et coll., 1987).

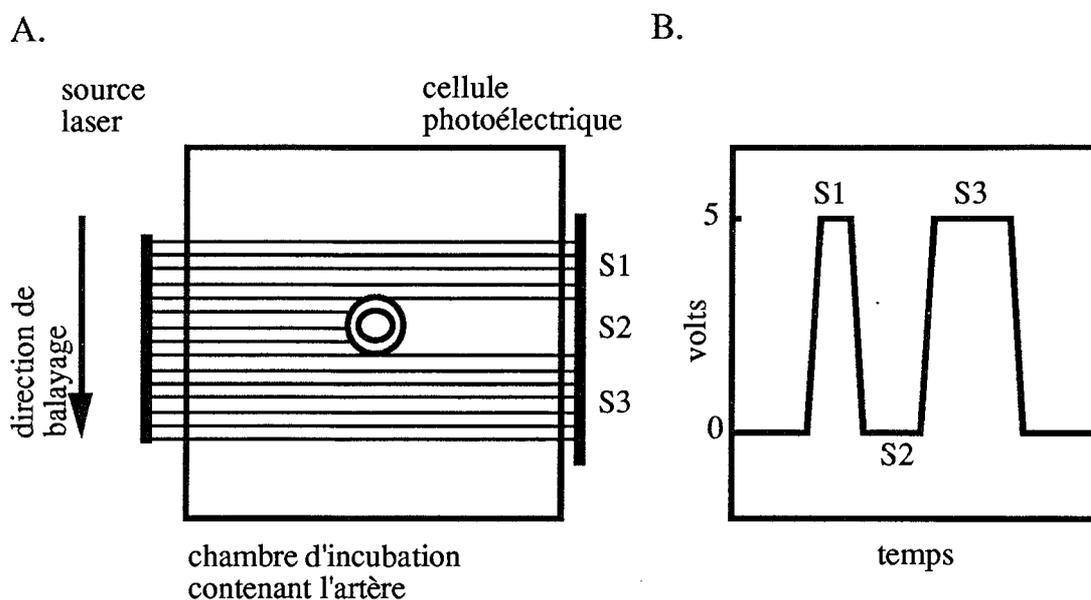


Figure 1.19. A : Schéma de la chambre d'incubation illustrant le balayage lumineux laser d'un segment carotidien. La présence de l'artère empêche la lumière d'atteindre la cellule photoélectrique produisant 3 sections de réponse (S1, S2 et S3). B : La section S2 représente la durée pendant laquelle la lumière n'atteint pas la cellule photoélectrique et à partir de laquelle le diamètre externe est calculé. D'après Brant et coll. (1987).

6.1.3. Méthodes ultrasoniques

Le diamètre interne peut être calculé indirectement à partir des mesures de diamètre externe, du volume ou de l'épaisseur pariétale, ceci en considérant la paroi artérielle incompressible (Carew et coll., 1968 ; Girerd et coll., 1992).

Les nouvelles méthodes ultrasoniques se sont développées aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* pour des mesures statiques ou dynamiques de diamètre. Elles permettent l'exploration du système artériel par la mesure du diamètre et de l'épaisseur, notamment des artères superficielles chez l'Homme.

Le principe de base est l'émission d'ultrasons par des quartz ayant des propriétés piézoélectriques. Deux techniques différentes de mesure existent :

- l'une mesure le temps de transmission entre deux cristaux placés de chaque côté de la paroi artérielle,
- l'autre mesure le temps qui sépare l'émission d'une brève pulsation d'ultrasons de la réception des échos provenant des parois artérielles proximale et distale.

La première technique est employée dans les études sur l'animal *in vivo* (Aars, 1969 ; Pagani et coll., 1978). Par exemple sur le lapin, après implantation des cristaux au niveau de l'aorte ascendante, la relation pression-diamètre est étudiée à différents niveaux de pression par retrait ou re-infusion de sang par la veine jugulaire cathétérisée (Aars, 1969).

La deuxième technique est utilisée *in vitro* pour mesurer les changements de diamètre interne. Le capteur cylindrique, perpendiculaire à l'axe longitudinal de l'artère, contient un élément piézoélectrique (de fréquence 12 MHz) placé à 45° par rapport à l'axe longitudinal du capteur (Tedgui et coll., 1987 ; Caputo et coll., 1992 ; Figure 1.20). Le minimum de détection est de 500 μm avec une résolution meilleure que $\pm 10 \mu\text{m}$ (Tedgui et coll., 1987).

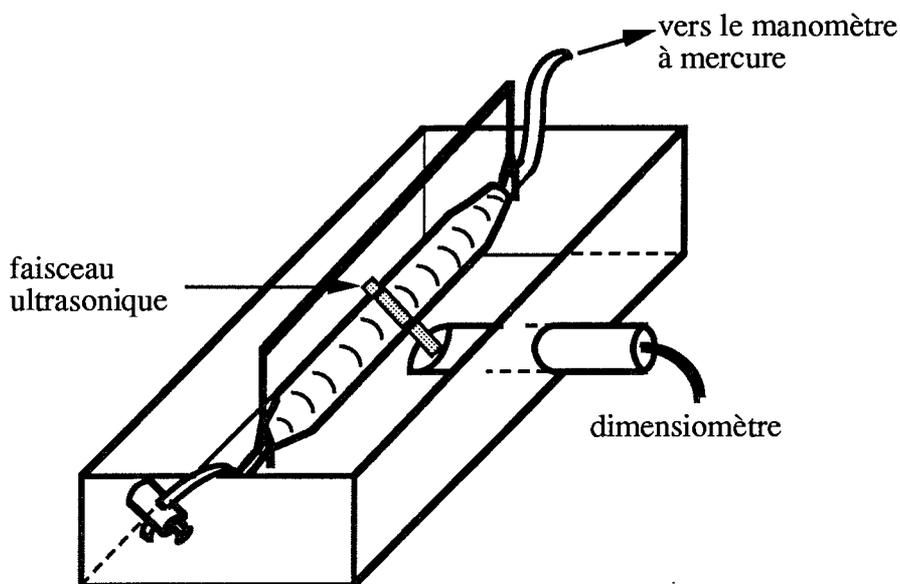


Figure 1.20. Schéma du système *in vitro* pour la mesure du diamètre artériel par méthode ultrasonique. Le segment artériel est placé dans un bain de solution de Krebs-Ringer oxygénée (95% O_2 -5% CO_2) à 39°C. D'après Tedgui et coll. (1987). Utilisé par Caputo et coll. (1992) pour l'étude de la compliance carotidienne chez le rat.

En utilisant des pulsations ultrasoniques de 10 MHz, Girerd et coll. (1992) ont mesuré *in vitro* les diamètres internes des artères radiale et mammaire interne humaines de la même façon que précédemment (Tedgui et coll., 1987), et de plus la mesure de l'épaisseur pariétale est rendue possible à partir de l'écho distal.

Cette méthode permet une mesure non invasive du diamètre artériel sur l'animal (Farrar et coll., 1991 ; Joannides et coll., 1994) et, sur différentes artères humaines telles que l'aorte abdominale (Imura et coll., 1986), l'artère carotide (Bouthier et coll., 1985 ; Laurent et coll., 1994), l'artère humérale (Safar et coll., 1981), l'artère radiale (Tardy et coll., 1991 ; Hayoz et coll., 1993 ; Laurent et coll., 1993). Par exemple, l'angiomètre de haute résolution Nius-02, déjà utilisé *in vitro* (Girerd et coll., 1992), permet l'obtention d'un signal radiofréquence des parois artérielles avec une résolution axiale de 160 μm (Figure 1.21 ; Girerd et coll., 1994). Cet appareil comporte une sonde Doppler pulsée de 10 MHz permettant un seuil de détection de 2,5 μm .

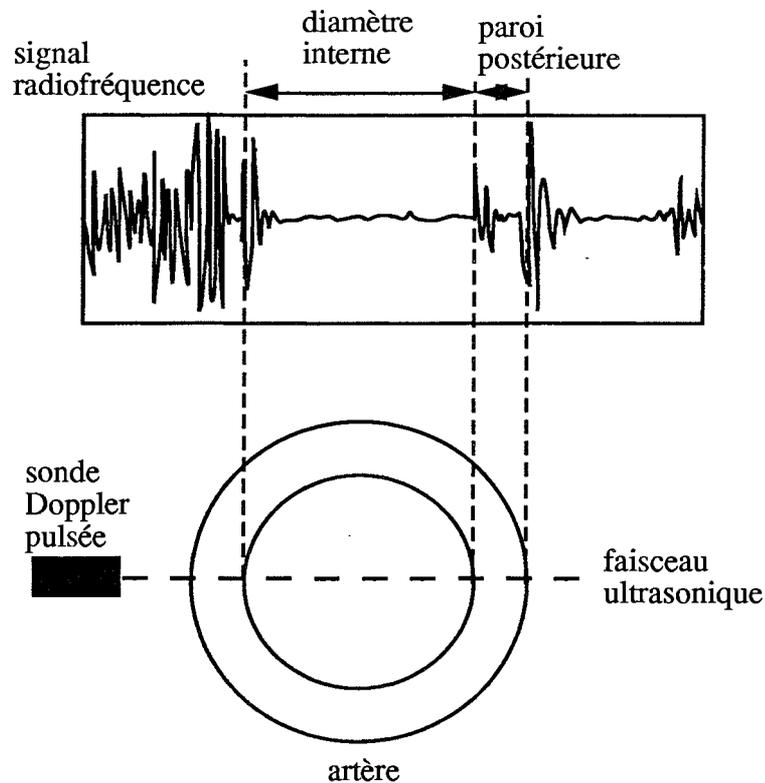


Figure 1.21. Schéma du système de mesure des dimensions de l'artère radiale humaine grâce à une sonde Doppler pulsée et à l'émission du signal radiofréquence caractéristique. D'après Girerd et coll. (1994).

Ainsi, de façon non invasive, des courbes pression-diamètre ont été réalisées grâce au couplage d'un appareil d'écho-tracking vasculaire de haute résolution (1) à la tonométrie d'aplanation (voir Figure 1.22 ; Kelly et coll., 1989), sur l'artère carotide chez l'Homme, (2) à la mesure intra-artérielle de la pression, sur l'artère carotide chez le chien, et (3) à un photopléthysmographe, sur l'artère radiale chez l'Homme (Tardy et coll., 1991). Le diamètre interne et ses variations systolo-diastoliques peuvent être mesurés avec une précision de 50 μm et de 1-2 μm , respectivement (Hoeks et coll., 1990).

Avec un instrument ultrasonique, les épaisseurs de la média et de l'intima de l'artère carotide peuvent être directement visualisées en temps réel chez l'Homme par échotomographie (Touboul et coll., 1992).

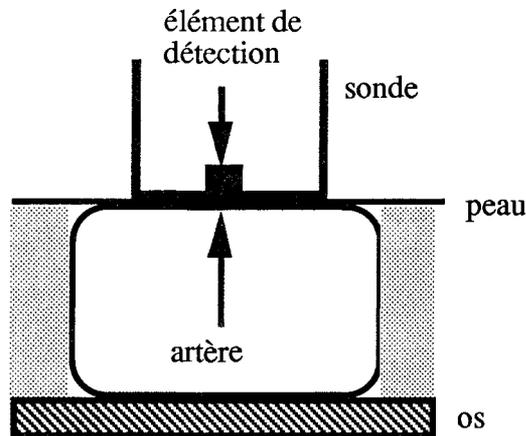


Figure 1.22. Tonométrie d'aplanation. La sonde est placée au dessus du vaisseau et appuyée sur l'artère contre l'os sous-jacent. La surface du vaisseau étant ainsi aplatie, les contraintes circonférentielles de la paroi sont en équilibre et la pression enregistrée par l'élément de détection est la pression intra-artérielle réelle. D'après Kelly et coll. (1989).

6.2. Mesure du volume intraluminal

La compliance étant la variation absolue de volume que suscite une variation de pression, ce volume (ou compliance déterminée par coupe transversale) peut être calculé indirectement à partir des valeurs de diamètre (Caputo et coll., 1992 ; Bénétos et coll., 1993 ; Laurent et coll., 1993) ou mesuré directement (Lévy et coll., 1988, 1990).

Lévy et coll. (1988) ont développé une méthode *in situ* dans laquelle l'artère carotide de rat est cathétérisée à son extrémité distale avec un long tube de nylon (80 cm de long et 0,6 mm de diamètre interne ; Figure 1.23). Ce tube est partiellement rempli d'une solution saline de bleu Evans ; les variations de position du ménisque, créé à l'interface de cette solution avec l'air, représentent les variations de volume à l'intérieur de l'artère. A son extrémité proximale, l'artère carotide est clampée ; à son extrémité distale, le tube de nylon est relié à un manomètre. L'artère est soumise à des augmentations de pression de 0 mmHg à 175 mmHg par plateau de 25 mmHg (Figure 1.24 ; Lévy et coll., 1990). La pression de chacun de ces plateaux est maintenue par ajustement du volume du liquide physiologique à l'intérieur de l'artère par servo-contrôle.

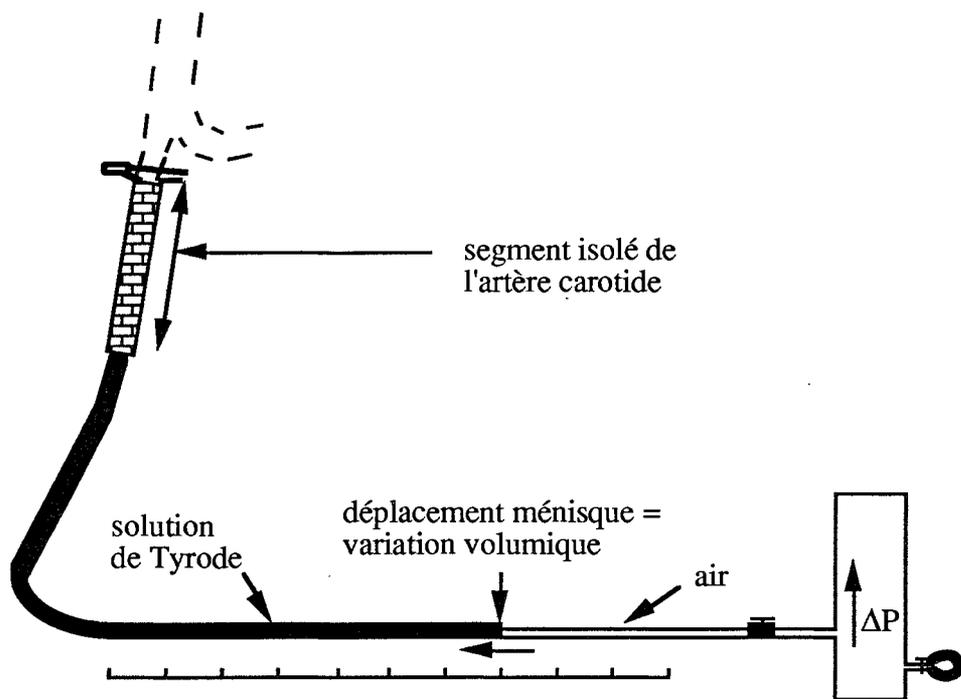


Figure 1.23. Schéma du système de mesure *in situ* du volume intraluminal de l'artère carotide isolée. D'après Lévy et coll. (1990).

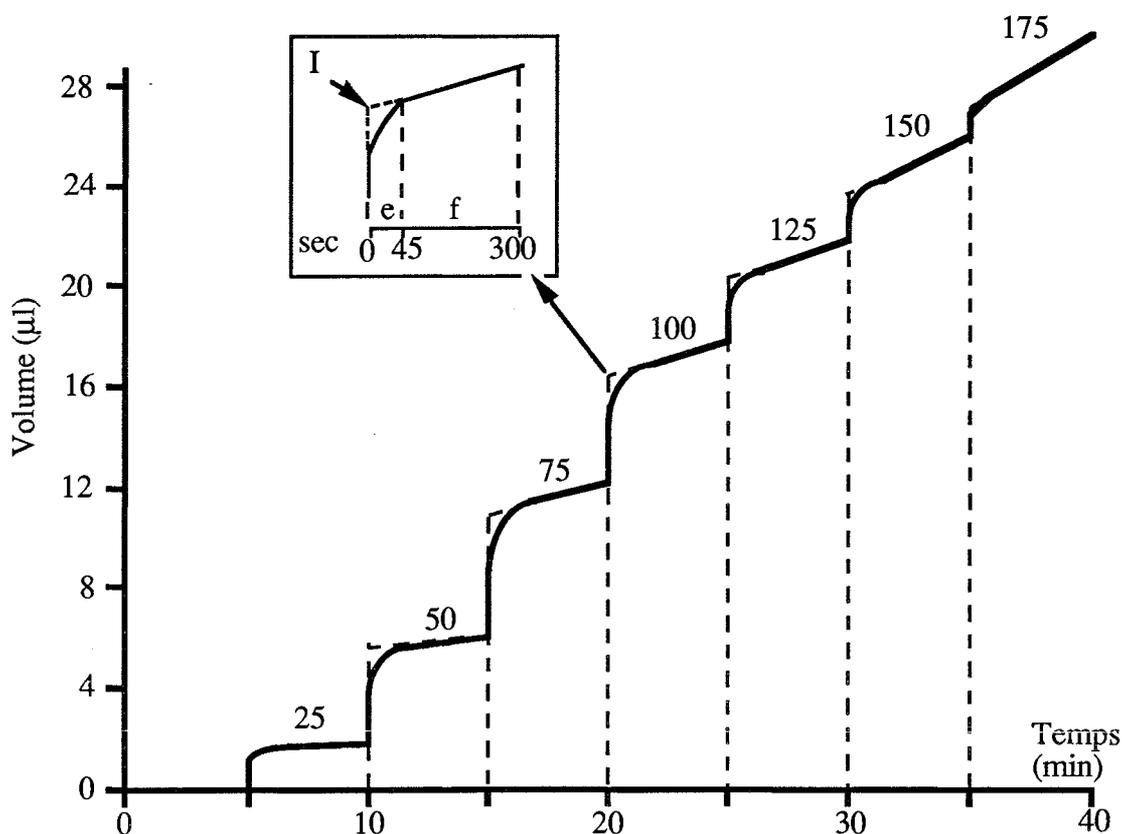


Figure 1.24. Variation de volume dans l'artère carotide isolée pendant un cycle de pressurisation de 0 à 175 mmHg par palier de 25 mmHg (valeurs de pression indiquées à chaque palier). Dans l'encadré, sont montrées les deux phases de l'augmentation de volume (e et f) et le calcul de l'augmentation initiale de volume (supposée non reliée aux effets visco-élastiques ; point I) par extrapolation de la portion linéaire au temps de l'application de la pression. D'après Lévy et coll. (1990).

In situ, la relation volume-pression a été déterminée sur l'aorte de rat (Frohlich et coll., 1992) et sur l'artère humérale humaine (Greene et coll., 1966).

Un autre appareillage permet d'étudier *in vitro* les relations pression-volume d'un segment artériel (Figure 1.25 ; Callaghan et coll., 1986). L'une des extrémités du vaisseau est reliée à une seringue qui permet d'introduire rapidement (< 100 msec) des volumes déterminés d'une solution physiologique. A l'autre extrémité, un microcapteur de pression est introduit à l'intérieur de l'artère, et permet de mesurer les variations de pression provoquées par les variations de volume.

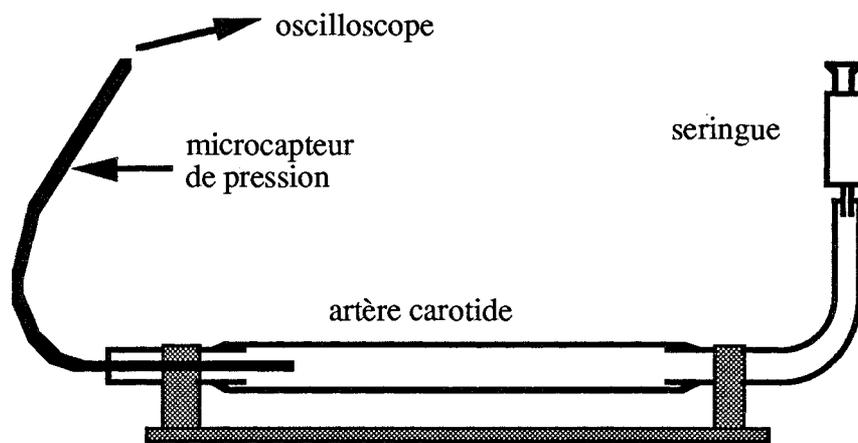


Figure 1.25. Appareillage permettant de déterminer *in vitro* les relations pression-volume. D'après Callaghan et coll. (1986).

6.3. Mesure de la vitesse de propagation de l'onde de pouls

La vitesse de l'onde de pression est le plus communément calculée par le temps Δt que met le pied de l'onde à parcourir une distance connue (Figure 1.26). *In vivo* la partie initiale de l'onde (partie initiale de la systole), contenant l'information de haute fréquence, est peu affectée par des ondes réfléchies (McDonald, 1974 ; Milnor, 1989). La plupart des études ont déterminé une vitesse de l'onde de pression comprise entre 2 et 15 m/sec, dépendant non seulement de la technique de mesure ou de la méthode de calcul, mais aussi de l'artère et du sujet (voir Nichols et O'Rourke (1990), p 104). A des valeurs de pression artérielle ≤ 100 voire 200 mmHg, la vitesse de l'onde de pression est linéairement reliée à la pression (Callaghan et coll., 1984 ; Makki et coll., 1994).

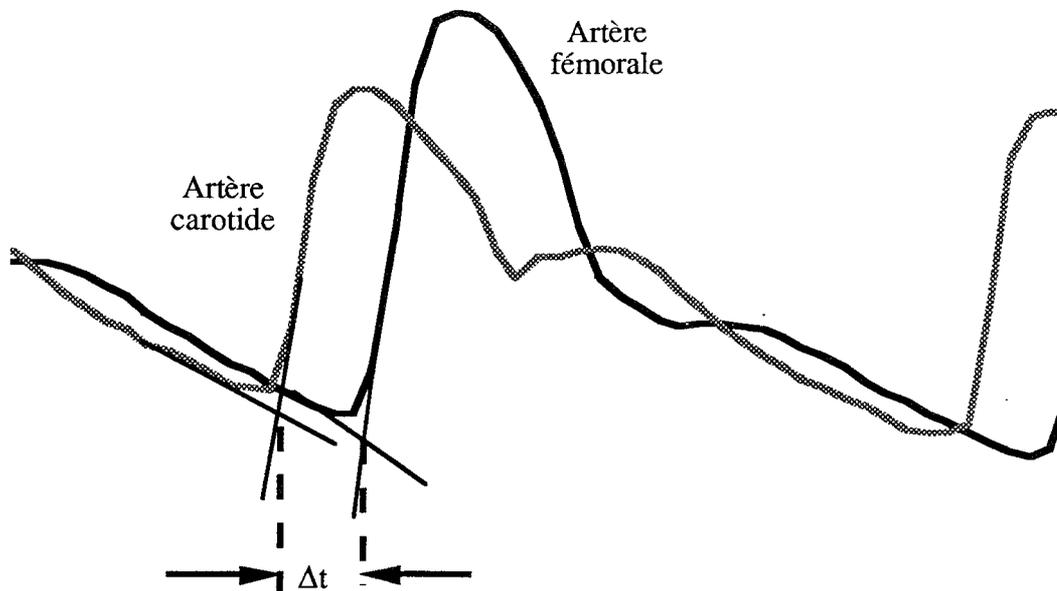


Figure 1.26. Mesure de la vitesse de propagation de l'onde de pression entre les artères carotide et fémorale à partir du décalage de temps Δt .

La vitesse de l'onde de pression a été estimée chez le chien *in vitro*, mais aussi *in situ* par Callaghan et coll. (1984). L'artère carotide commune est cathétérisée à ses deux extrémités (Figure 1.27). Un microcapteur de pression est introduit à l'intérieur du vaisseau à chacune de ces extrémités *via* les cathéters. Les pulsations de la pression sont suscitées par une seringue contrôlée électroniquement pour choisir l'amplitude et la durée des pulsations. La mesure du décalage dans le temps de l'apparition d'une même pulsation au niveau de chacun des capteurs permet de calculer la vitesse de propagation de l'onde de pouls, après évaluation de la distance qui sépare les deux capteurs (10 cm). Cette vitesse est calculée alors que la pression moyenne est augmentée de 0 à 200 mmHg par palier de 20 mmHg (Callaghan et coll., 1984).

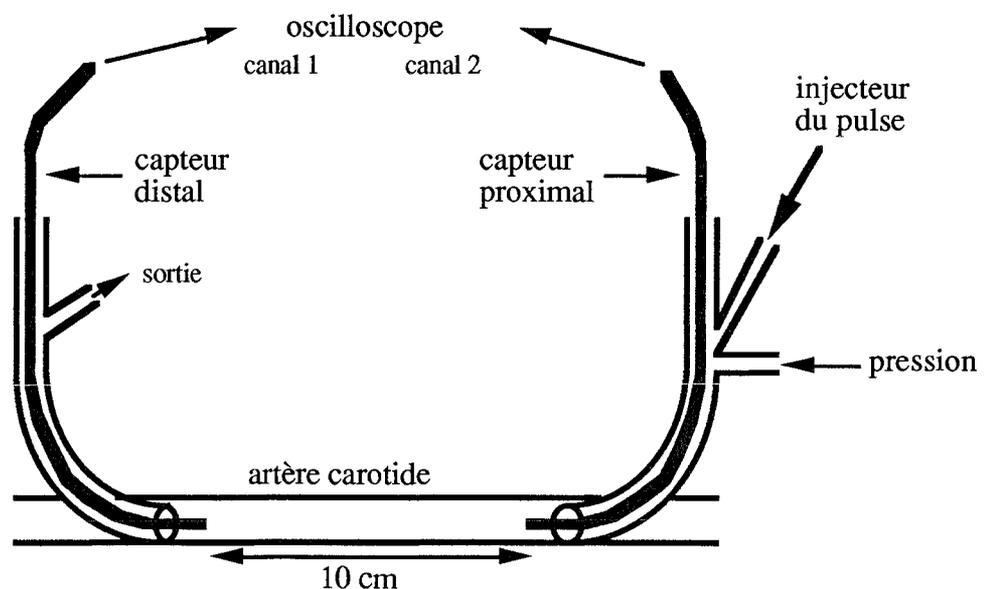


Figure 1.27. Détermination *in situ* de la vitesse de transmission de l'onde de pouls au niveau de l'artère carotide commune de chien. D'après Callaghan et coll. (1984).

La vitesse de propagation de l'onde de pouls a été mesurée de façon invasive chez le singe grâce à deux microcapteurs de pression insérés, l'un jusqu'à la crosse aortique *via* l'artère sous-clavière gauche et l'autre dans l'aorte thoracique *via* l'artère fémorale droite (Farrar et coll., 1991). De façon non invasive, le même groupe a déterminé la vitesse de propagation de l'onde de pouls entre les artères carotide et fémorale en plaçant un capteur sur la peau au niveau de chacune de ces artères. Chez l'Homme, grâce à deux capteurs fixés sur la peau au-dessus des artères humérale et radiale, le décalage de temps des pieds d'onde est mesuré (Safar et coll., 1986).

Une approche différente est décrite par Anliker et coll. (1968). Ces auteurs ont étudié la distensibilité de l'aorte de chien par mesure de la dispersion et de l'atténuation d'ondes de pression induites artificiellement (Figure 1.28). Une pompe ou un générateur d'ondes électromagnétiques génère une série de quatre oscillations sinusoïdales de fréquence et amplitude déterminées qui se surimposent à l'onde de pression artérielle.

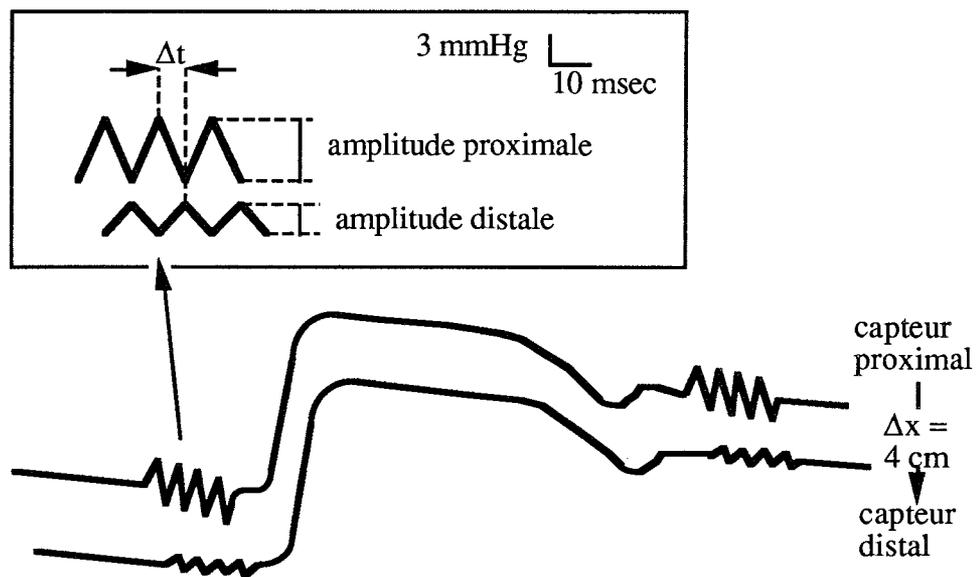


Figure 1.28. Ondes de pression de l'aorte de chien (détectées par deux capteurs de pression distants de 4 cm) avec surimposition de séries d'ondes artificielles. Calculs de la vitesse de transmission grâce au temps Δt et à la distance Δx , et de l'amortissement de l'amplitude des ondes artificielles grâce aux amplitudes proximale et distale. D'après Anliker et coll. (1968).

La vitesse de propagation de l'onde de pouls est liée au module élastique comme le démontre la formule de Moens-Korteweg (1878) :

$$c = (hxE/2xR_i x \rho)^{1/2} \quad (\text{cm/sec})$$

où c est la vitesse de transmission de l'onde de pression, h l'épaisseur pariétale, R_i le rayon interne, ρ la densité du liquide dans la lumière du vaisseau, et E le module élastique. Ainsi, cette vitesse c peut aussi être calculée indirectement (Merillon et coll., 1978 ; Lehmann et coll., 1993).

En résumé, les techniques employées *in vitro* pour l'évaluation des propriétés visco-élastiques de la paroi artérielle sont principalement basées sur des mesures de diamètre artériel. Celles-ci utilisent des méthodes optiques, ultrasoniques ou des capteurs de déformation. Les variations de volume intraluminal et de vitesse de propagation de l'onde de pouls sont également étudiées. Toutes ces techniques ont permis d'étudier le rôle des différents constituants de la paroi artérielle dans la détermination de son élasticité. De plus, elles ont permis d'apprécier les modifications fonctionnelles consécutives aux altérations structurales apparaissant non seulement dans de nombreuses pathologies, mais aussi au cours du vieillissement, objet principal de notre étude.

7. Effets du vieillissement sur la paroi artérielle

Le vieillissement est associé à une grande variété de modifications structurales et fonctionnelles du système. Celles-ci présentent de nombreuses analogies avec les modifications induites par des désordres cardio-vasculaires tels que l'hypertension, les maladies coronariennes, l'angine de poitrine, *etc.*, dont l'incidence augmente avec l'âge.

7.1. Effets structuraux

7.1.1. Sur les dimensions artérielles

Au cours de la sénescence chez l'Homme, une dilatation progressive accompagnée d'un allongement de l'aorte apparaissent (Gerstenblith et coll., 1976). De plus, la capacité du vaisseau à se rétracter lors de sa section diminue avec l'âge (Learoyd et Taylor, 1966 ; Figure 1.29). Ainsi, chez le sujet jeune (< 35 ans), cette rétractation est supérieure de 10 à 15% à celle des sujets plus âgés (> 35 ans). Le taux de rétractation dépend de la localisation de l'artère dans le système artériel et de l'âge du sujet (Learoyd et Taylor, 1966). Le même phénomène de rétractation longitudinale est observé chez l'animal (Bergel, 1961b ; Band et coll., 1972). L'aorte se rétracte de 23% chez les rats âgés de 6 mois tandis que cette rétractation n'est plus que de 18% chez ceux âgés de 18 mois (Band et coll., 1972).

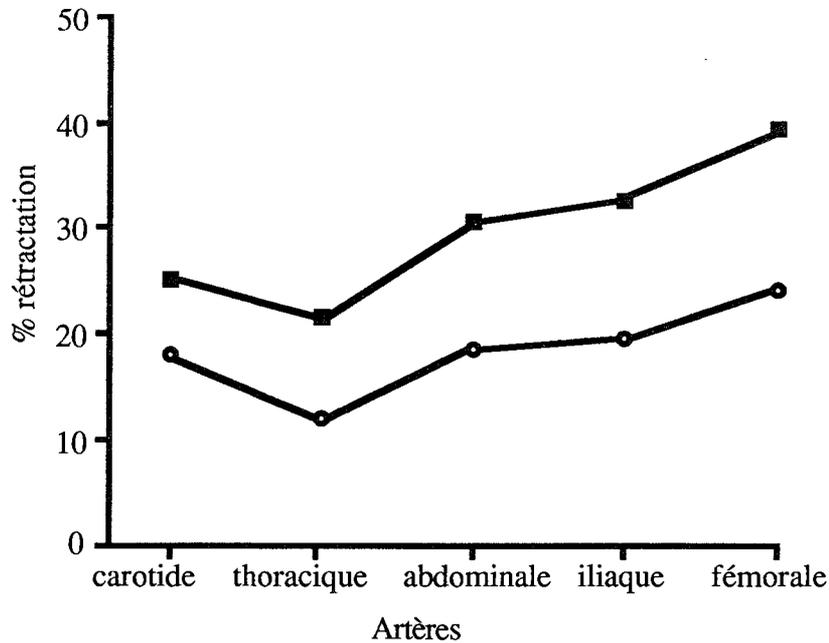


Figure 1.29. Rétractation des segments artériels (indiqués en abscisse) en fonction de l'artère et de l'âge (■, personnes jeunes (< 35 ans) ou ●, plus âgées (> 35 ans)) exprimée en pourcentage de la longueur *in situ*. D'après Learoyd et Taylor (1966).

L'observation macroscopique montre également un accroissement de la taille des vaisseaux. En effet, une dilatation artérielle apparaît progressivement avec l'âge (Learoyd et Taylor, 1966 ; Nichols et coll., 1985). Par exemple, le rayon interne de l'aorte ascendante, mesuré à la pression systolique, s'élève de 9% tous les 10 ans entre 20 et 60 ans chez l'Homme (Nichols et coll., 1985). Cette dilatation est accompagnée d'un épaissement de la paroi artérielle (Learoyd et Taylor, 1966). Par contre d'après Safar et coll. (1988), le diamètre de l'artère carotide semble être peu influencé par l'âge ($0,651 \pm 0,015$ cm chez des sujets de moins de 45 ans et $0,653 \pm 0,011$ cm chez des personnes plus âgées). L'épaisseur pariétale relative, c'est-à-dire l'épaisseur pariétale absolue rapportée au diamètre interne moyen (h/D_i , Figure 1.30), s'accroît dans toutes les artères avec l'âge (Learoyd et Taylor, 1966).

Un épaissement de l'intima et de la couche sous-endothéliale est également observé au cours du vieillissement vasculaire (Michel et coll., 1994).

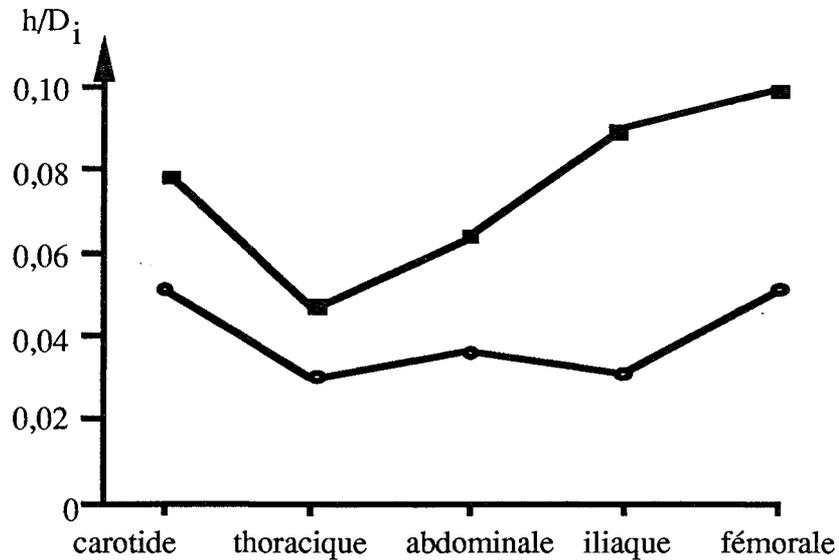


Figure 1.30. Epaisseur pariétale relative (h/D_i) en fonction de l'artère (en abscisse), mesurée à 100 mmHg chez des sujets jeunes (\circ , < 35 ans) ou plus âgés (\blacksquare , > 35 ans). D'après Learoyd et Taylor (1966).

7.1.2. Sur la morphologie artérielle

En plus de l'épaississement intimal, les cellules endothéliales deviennent irrégulières en taille et forme, et le nombre de cellules géantes multinucléées augmente. La couche sous-endothéliale épaissit par élévation du contenu en tissu conjonctif (Haudenschild et coll., 1981).

De nombreuses études histologiques ont montré une dégénérescence progressive des fibres élastiques ; celles-ci perdent leur arrangement ordonné, s'amincissent, s'effilochent et se fragmentent. La quantité d'élastine rapportée au poids sec diminue avec l'âge de 25% (à l'âge de 12 mois) à 34% (à 24 mois) par rapport à celle de 2 mois, mais est inchangée entre 12 et 24 mois (Cox, 1977). Au contraire, la quantité d'élastine totale, calculée par aire de coupe transversale, augmente significativement avec l'âge (Michel et coll., 1994). La quantité de collagène exprimée en pourcentage de poids sec s'accroît avec l'âge de 39% (à 12 mois) à 46% (à 24 mois) par rapport à celle de 6 mois, de même que le contenu absolu en collagène (Michel et coll., 1994). Cette majoration absolue du taux protéique dans la matrice interstitielle associée à une élévation de la masse en cellules musculaires lisses contribue à l'épaississement de la paroi artérielle (Lévy et coll., 1988). Le rapport du contenu en collagène sur celui en élastine passe avec l'âge, d'une valeur de 1,16 à 2 mois, à celle de 1,59 à 12 mois jusqu'à celle de 1,86 à 24 mois (Cox, 1977).

De plus, le contenu calcique artériel chez l'Homme s'élève au cours du vieillissement (Fleckenstein et coll., 1983) ; entre les âges de 10 et 90 ans, le contenu en calcium total de l'aorte est multiplié par 100. Chez le rat, ce phénomène survient également mais de façon moins

prononcée. Par exemple, de l'âge de 2 à 24 mois le contenu en calcium total de l'aorte de rat Fischer 344 n'est augmenté que de deux fois (Thorin et coll., 1990).

Afin de se rapprocher des modifications artérielles structurales et fonctionnelles observées chez l'Homme, un modèle animal de surcharge calcique vasculaire accélérée a été développé au sein de notre laboratoire (modèle VDN ; Atkinson, 1992). Cette surcharge, initialement développée chez le rat par Fleckenstein et coll. (1983) est induite grâce à l'administration de deux substances : la vitamine D₃ et la nicotine (Atkinson, 1992). La première favorise l'apparition d'une hypercalcémie par les activités sur l'homéostasie du calcium de sa forme active 1,25-dihydroxylée au niveau intestinal (augmentation de l'absorption), rénal (diminution de l'élimination) et osseuse (augmentation de la libération du calcium par l'os), et la seconde la pénétration du calcium dans la paroi artérielle (Hass et coll., 1966). Afin d'éviter le taux de mortalité important du traitement original décrit par Fleckenstein et coll. (1983), nous avons modifié le protocole : il n'inclut finalement qu'un seul jour de traitement chez des rats âgés de 2 mois (voir Matériel et méthodes du Chapitre IV) suivi d'un délai minimal de 16 jours de repos (Atkinson, 1992). Henrion et coll. (1991a) ont montré que le calcium tissulaire se dépose essentiellement sur le matériel élastique, notamment sur les 3 ou 4 lames élastiques adluminales, les animaux contrôles ne présentant pas de dépôts calciques.

L'étude histomorphométrique (voir Matériel et méthodes du Chapitre IV pour la description de la technique) réalisée sur des aortes thoraciques de rats âgés de 2+1 et 2+4 mois (résultats non publiés) ne montre aucune modification des paramètres étudiés 1 mois après le traitement VDN. Au contraire, 4 mois après ce traitement, une augmentation du diamètre interne ($1,89 \pm 0,08$ par rapport à $1,57 \pm 0,05$ mm) sans variation de l'épaisseur de la média (72 ± 4 par rapport à 75 ± 4 μ m) est observée chez les rats VDN par rapport aux rats témoins. De plus, le pourcentage d'élastine de la média est inchangé 1 mois après le traitement VDN ($43,6 \pm 1,1$ par rapport à $45,9 \pm 2,0\%$) mais diminué après 4 mois chez les rats VDN ($39,4 \pm 1,6$ par rapport à $43,7 \pm 1,3\%$; résultats non publiés).

Le traitement VDN induit également une hypertrophie cardiaque chez les rats âgés de 3 et de 6 mois, caractérisée par une augmentation du poids du ventricule gauche rapporté au poids corporel (résultats non publiés).

Tous ces changements structuraux, présents au cours du vieillissement et dans notre modèle VDN, sont associés à des variations des propriétés mécaniques des artères.

7.2. Effets fonctionnels

Les changements structuraux conduisent à une rigidification artérielle avec l'âge et à une diminution de la compliance artérielle (Merillon et coll., 1978 ; Cox, 1983 ; Langewouters et coll., 1984). La compliance carotidienne mesurée *in situ* est abaissée chez les rats âgés de 24 et 30 mois par rapport à celle de ceux âgés de 6 et 12 mois (Michel et coll., 1994). La compliance carotidienne, mesurée chez les rats VDN, décroît de façon massive indépendamment de la

pression appliquée. De plus, cette dernière est inversement corrélée au contenu de calcium carotidien (Atkinson et coll., 1994a).

Le niveau du module élastique incrémental circonférentiel passe de $7,5 \times 10^6$ chez les sujets âgés de moins de 35 ans à celui de $16,6 \times 10^6$ dynes/cm² chez ceux plus âgés (> 35 ans) (Learoyd et Taylor, 1966). Le module élastique de l'aorte fait plus que doubler entre 20 et 60 ans (Nakashima et Tanikawa, 1971 ; Yin et coll., 1983). Selon l'équation de Moens-Korteweg, une telle élévation du module élastique, associée à l'augmentation du rapport h/D_i (due à un accroissement proportionnellement plus important de l'épaisseur pariétale que du diamètre) suggère que la transmission de l'onde de pouls est également accélérée avec l'âge. Ceci a été observé expérimentalement chez l'Homme par Avolio et coll. (1983, 1985) ; ces auteurs ont noté un doublement de la vitesse de propagation de l'onde de pouls entre les âges de 17 et 70 ans en absence de pathologies associées telles que l'athérosclérose et l'hypertension (Avolio et coll., 1985) (Figure 1.31). De même, dans notre modèle VDN, la vitesse de transmission de l'onde de pouls au niveau aortique est augmentée et, de plus, est significativement corrélée au taux de calcium aortique (Atkinson et coll., 1994a).

Le changement de cette vitesse de transmission de l'onde de pouls aortique au cours du vieillissement chez l'Homme, semble être indépendant des variations de la pression sanguine et ne dépendre que de l'âge. Cette accélération de la transmission de l'onde de pouls est attribuée à la rigidité pariétale, mais une telle augmentation peut également se produire par élévation aiguë de la pression artérielle.

De plus, la composante pulsée de la charge externe imposée au ventricule gauche (impédance caractéristique) augmente de 60 à 137% de l'âge de 20 à celui de 60 ans (Avolio et coll., 1983; Nichols et coll., 1985) alors que la composante non pulsée (résistance périphérique) est nettement moindre.

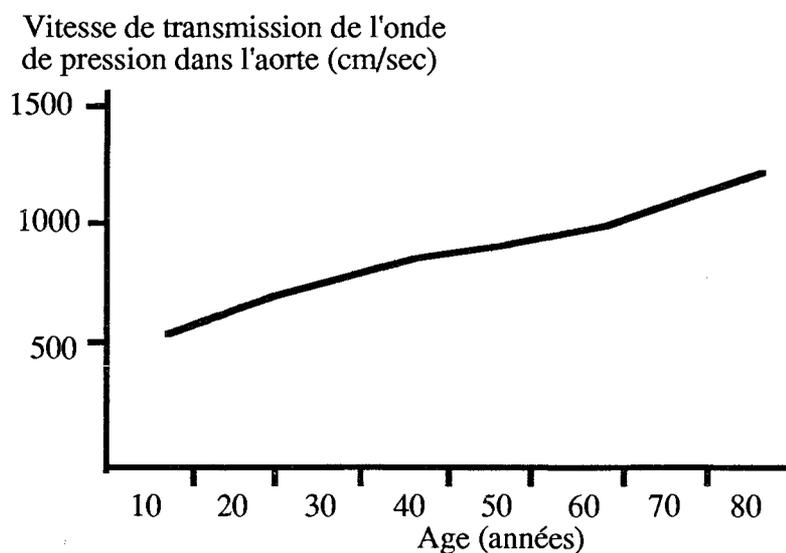


Figure 1.31. Evolution de la vitesse de transmission de l'onde de pression dans l'aorte humaine en fonction de l'âge. D'après Avolio et coll. (1985).

La rigidité aortique est aussi reflétée par les modifications, liées à l'âge, de la forme du spectre d'impédance d'entrée et des réflexions d'onde (Nichols et coll., 1985) (Figures 1.32 et 1.33). Les changements de forme de l'onde de pression sont largement responsables de l'augmentation de la pression systolique, due à une rigidité accrue et à des réflexions d'onde plus précoces (Nichols et coll., 1985 ; O'Rourke et coll., 1991).

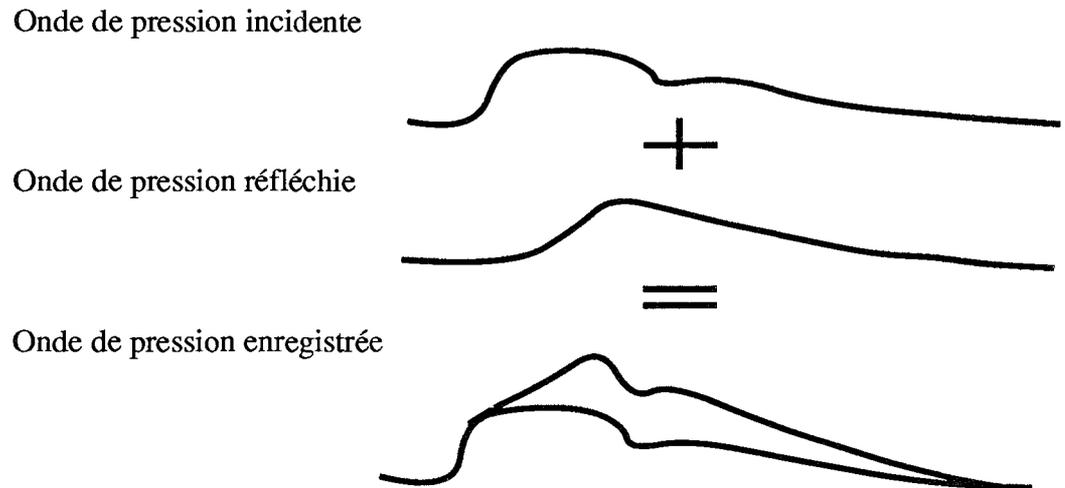


Figure 1.32. Exemple d'onde enregistrée dans l'aorte ascendante résultant de la somme d'une onde incidente et d'une onde réfléchie, cette dernière devenant plus importante et plus précoce avec l'âge. D'après Murgo et coll. (1981).

En général, la pression artérielle s'accroît avec l'âge. Cependant la pression systolique augmente nettement plus que la pression diastolique qui peut même rester inchangée (Figure 1.34). Ainsi, la prévalence de l'hypertension systolique isolée croît avec l'âge et devient un facteur de risque indépendant pour la mortalité et la morbidité cardio-vasculaires (Kannel, 1987).

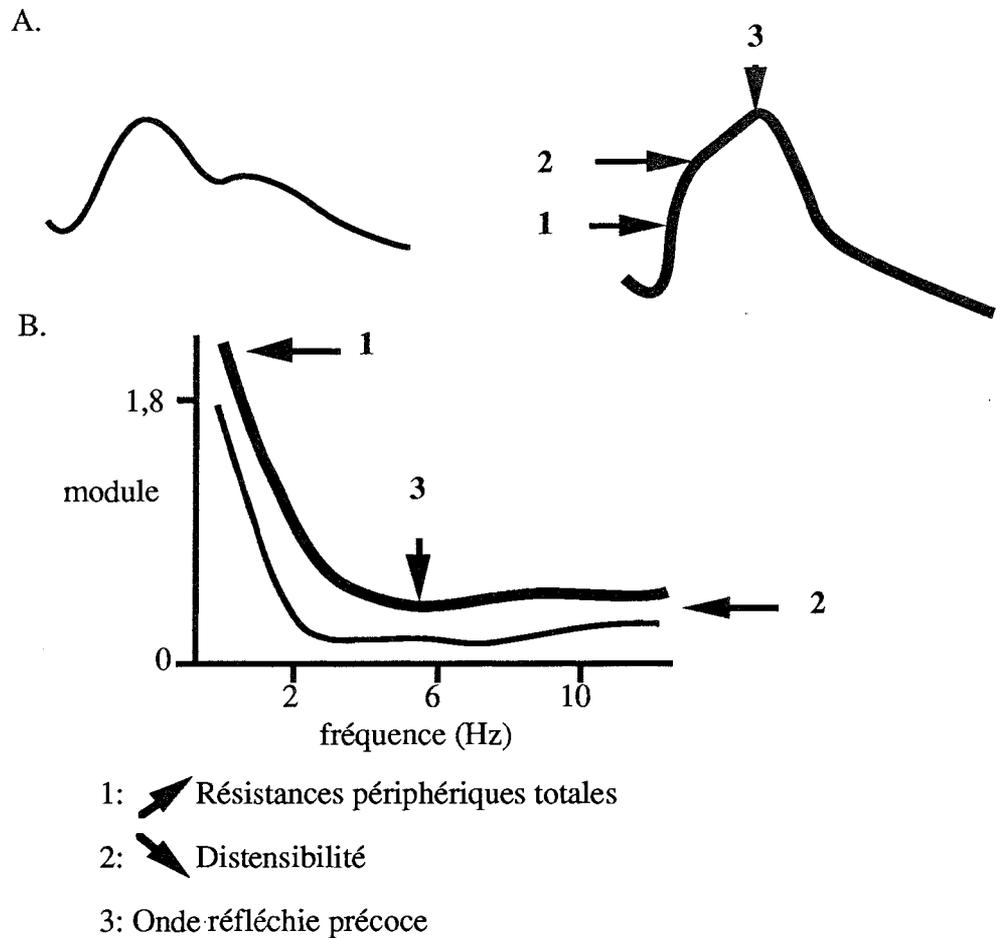


Figure 1.33. Relation entre A : la forme de l'onde de pression et B : le spectre d'impédance d'entrée ($10^3 \text{ dynes} \times \text{sec} / \text{cm}^5$) dans l'aorte ascendante et modifications apparaissant avec l'âge (trait épais). D'après Nichols et O'Rourke (1990).

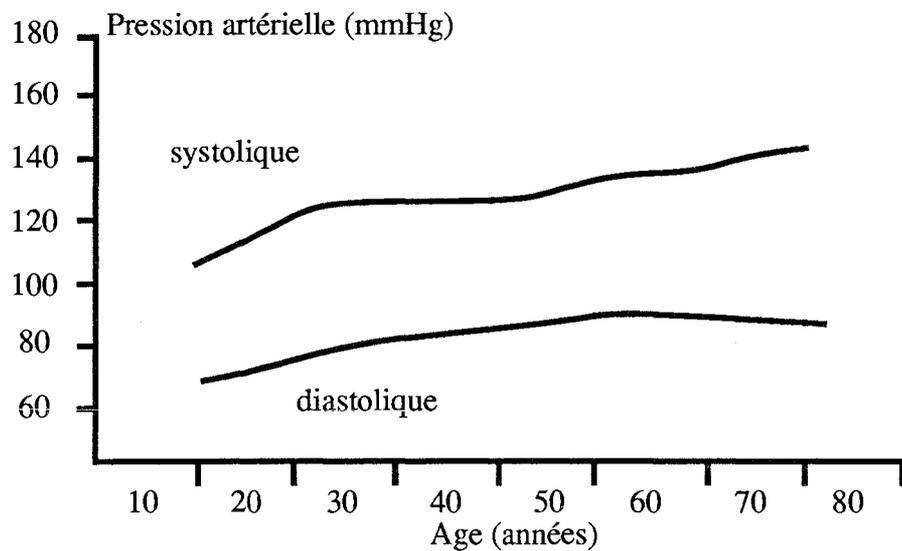


Figure 1.34. Evolution des pressions systolique et diastolique en fonction de l'âge chez l'Homme. D'après Nichols et coll. (1985).

Pour revenir au rôle du calcium dans la compliance artérielle, celui-ci pourrait agir à deux niveaux, intra- et/ou extracellulaire.

L'augmentation du taux de calcium total artériel est associée à une rigidification artérielle (Blumenthal et coll., 1950 ; Fleckenstein et coll., 1983). Ainsi, cette calcinose vasculaire au cours du vieillissement pourrait être associée aux modifications fonctionnelles décrites ci-dessus, notamment par dépôt de calcium sur les fibres élastiques et par fragmentation ultérieure de celles-ci (Fleckenstein et coll., 1983 ; Henrion et coll., 1991a). Comme nous l'avons vu en différents points de ce paragraphe, le modèle VDN possède de nombreuses caractéristiques communes avec les modifications vasculaires apparaissant au cours du vieillissement chez l'Homme, en particulier une diminution de la compliance artérielle et des dépôts de calcium sur les fibres élastiques.

Les cellules musculaires lisses peuvent également intervenir dans la détermination de la compliance artérielle (Cox, 1979 ; Lévy et coll., 1990). Le calcium est le principal messager de la contraction de ces cellules, et l'utilisation d'inhibiteurs de flux calciques améliorent la compliance artérielle (Safar et coll., 1989 ; Van Merode et coll., 1990) : la réactivité cellulaire et la $[Ca^{2+}]_i$ pourraient jouer un rôle important dans la détermination de cette compliance artérielle. Ainsi, la mesure de $[Ca^{2+}]_i$ devient un paramètre important. Nous allons décrire la méthode utilisée, c'est-à-dire l'emploi d'une sonde fluorescente, qui nous a permis de suivre simultanément les variations de $[Ca^{2+}]_i$ et les modifications de l'élasticité de la paroi artérielle dans différentes conditions (voir Chapitres suivants).

II. Mesure du calcium cytoplasmique

L'étude de l'homéostasie du calcium cellulaire fait appel à un large panel de techniques utilisant différents indicateurs tels que les photoprotéines (aéquorine, obéline), les indicateurs métallochromiques (arsénazo-III, antipyrylazo-III, murexide), les indicateurs marqués à la fluorine (FBAPTA) pour la résonance magnétique nucléaire, mais aussi des micro-électrodes sensibles au calcium.

Plus récemment, ce domaine de recherche a été révolutionné par le développement de sondes fluorescentes qui peuvent être incorporées dans les cellules de façon non disruptive. Le groupe de Tsien (Tsien, 1981 ; Tsien et coll., 1982, 1985) a été à l'origine de ce développement avec l'utilisation du quin-2 pour la mesure du calcium cytosolique libre. Depuis, d'autres sondes fluorescentes ont vu le jour avec des propriétés améliorées, la plus largement utilisée étant certainement l'ester acétoxyméthyl du fura-2 (fura-2 AM).

Ainsi dans cette deuxième partie du Chapitre I, nous nous concentrerons sur les sondes fluorescentes, et plus particulièrement le fura-2, que nous avons utilisé dans notre étude.

1. Généralités sur les principes de fluorescence

La fluorescence est un processus moléculaire dans lequel l'émission de radiations électromagnétiques découle de l'absorption préalable de radiations provenant d'une source extramoléculaire. La longueur d'onde de la lumière émise est supérieure à celle de la lumière excitatrice (Loi de Stokes). La lumière émise a donc une énergie plus faible que la lumière excitatrice. L'état excité de la molécule a généralement une demi-vie de l'ordre de 10^{-8} sec, ainsi la fluorescence ne persiste pas une fois que l'excitation est terminée.

Chaque molécule fluorescente possède une ou plusieurs longueurs d'onde optimales pour l'excitation, qui généralement correspondent aux maxima d'absorption, ainsi qu'une ou plusieurs longueurs d'onde optimales pour l'émission. Les altérations des propriétés fluorescentes survenant lors de la complexation de la sonde avec l'ion mesuré sont à l'origine de la détermination des variations de concentration ionique. Ainsi trois changements peuvent apparaître, seuls ou en combinaison : (1) un déplacement du spectre d'excitation, (2) un déplacement du spectre d'émission, et (3) une variation d'intensité de fluorescence. Dans le cas du quin-2, par exemple, qui se caractérise par une seule longueur d'onde d'excitation et une seule longueur d'onde d'émission, la liaison avec le calcium conduit à une augmentation de l'intensité du signal fluorescent émis. Cela paraît être la méthode la plus directe à employer, cependant plusieurs problèmes apparaissent : pour la calibration du signal fluorescent, il est nécessaire de connaître la concentration de l'indicateur, les paramètres pouvant influencer la mesure (épaisseur de l'échantillon, distribution non homogène de l'indicateur pouvant induire des différences qui n'ont rien à voir avec les variations réelles du paramètre étudié). Lorsque le spectre d'excitation

(fura-2) ou d'émission (indo-1) est déplacé lors de la fixation du calcium, les problèmes précédemment décrits peuvent être écartés (concentration et mauvaise répartition de la sonde fluorescente, taille de l'échantillon, *etc.*) par utilisation du rapport des intensités de fluorescence correspondant aux deux longueurs d'onde d'excitation (fura-2) ou d'émission (indo-1).

2. Caractéristiques des indicateurs fluorescents du calcium

Les indicateurs fluorescents disponibles pour la mesure du calcium ont été développés d'après un chélateur spécifique du calcium (Ca^{2+}), l'EGTA (acide éthylèneglycol tétraacétique), dont l'affinité pour le Ca^{2+} est cinq à six fois plus élevée que pour le Mg^{2+} . Parmi les différents indicateurs, alors que le site tétracarboxylique de liaison du Ca^{2+} reste inchangé, des groupements supplémentaires ont été ajoutés afin de conférer les propriétés fluorescentes.

2.1. Affinité et sensibilité

La liaison du Ca^{2+} entraîne le retrait des électrons libres de l'azote des noyaux aromatiques produisant une modification des propriétés fluorescentes (Minta et coll., 1989). En modifiant le noyau aromatique afin de le rendre plus ou moins donneur d'électrons, l'affinité du site de liaison pour le Ca^{2+} peut être diminuée ou augmentée, respectivement.

Pour des mesures optimales, l'affinité de liaison de l'indicateur pour le Ca^{2+} (déterminée par le K_d) devrait être du même ordre de grandeur que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ainsi, les variations du signal fluorescent correspondent aux variations réelles de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Il est préférable que la relation entre la fluorescence du complexe indicateur- Ca^{2+} et la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ soit linéaire ; ceci survient à des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inférieures à la valeur du K_d . Mais, dans la pratique, la sensibilité maximale de l'indicateur aux variations de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se situe à des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ proches du K_d (Gurney, 1990).

2.2. Incorporation non disruptive de l'indicateur dans les cellules

La micro-injection, employée pour les photoprotéines, peut être utilisée pour les sondes fluorescentes. Mais, l'avantage de ces dernières est leur existence sous forme ester (acétoxyméthyl, AM), qui permet leur incorporation sans dislocation de la membrane plasmique, par simple incubation (Figure 1.35). En effet, ces esters, non chargés et hydrophobes, traversent la membrane plasmique. Une fois dans le cytoplasme, des estérases endogènes vont activer la sonde fluorescente, c'est-à-dire libérer sa forme acide qui pourra ainsi se lier au Ca^{2+} .

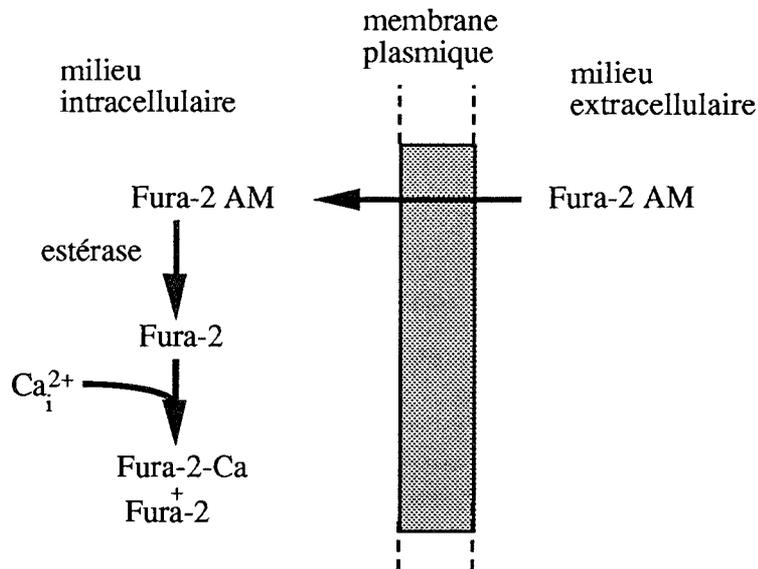


Figure 1.35. Incorporation d'une sonde fluorescente sous forme d'ester acétoxyméthyl (exemple : fura-2 AM) à l'intérieur d'une cellule musculaire lisse.

2.3. Vitesse de réponse

L'indicateur peut détecter des variations de $[Ca^{2+}]_i$ d'apparition très rapide (quelques millisecondes) et de durée assez longue (plusieurs minutes). Les taux de complexation fura-2-Ca et de dissociation sont très rapides, $3-15 \times 10^8 M^{-1}sec^{-1}$ et $80-200 sec^{-1}$, respectivement (Jackson et coll., 1987 ; Groden et coll., 1991 ; Lattanzio et Bartschat, 1991). Cette vitesse de réponse dépend tant de la cinétique de liaison de l'indicateur, que de la fréquence de réponse du spectrofluorimètre. Avec un appareillage dont la résolution temporelle est inférieure à 15 msec, des variations rapides de fura-2 peuvent être mesurées en-dessous de la limite donnée par les cinétiques de la sonde (5-10 msec ; Jackson et coll., 1987). Ainsi, le facteur le plus limitant semble être l'appareillage de mesure. Dans notre travail, les mouvements calciques devront être évalués dans un système dynamique dont la fréquence de travail est de 60 Hz (voir Chapitre suivant) : ces mesures sont donc théoriquement réalisables par utilisation du fura-2 et grâce à une rapidité suffisante d'alternance entre les longueurs d'onde d'excitation 340 et 380 nm.

3. Avantages et désavantages de la fluorescence pour la mesure du calcium

3.1. Avantages

L'emploi d'indicateurs fluorescents représente une technique relativement facile à mettre en oeuvre. L'existence des formes esters de ces indicateurs est un avantage important ; elle permet de laisser la membrane plasmique intacte et par là d'éviter aussi une fuite de calcium. Le rapport signal/bruit est meilleur que dans les techniques non fluorescentes.

Ces indicateurs du Ca^{2+} ont une affinité plus importante pour le Ca^{2+} que pour d'autres cations notamment le Mg^{2+} .

Les cinétiques du fura-2 sont de l'ordre de 5-10 msec, et dépendent de la température et des concentrations absolues de Ca^{2+} (Jackson et coll., 1987). Ainsi, cette limite peut être surmontée grâce aux spectrofluorimètres actuels dont la résolution temporelle (de l'ordre de 1 msec) est inférieure à ces chiffres.

La calibration du signal fluorescent peut se faire sans destruction de la cellule par l'utilisation de substances ionophores permettant d'atteindre des valeurs maximale et minimale de Ca^{2+} intracellulaire (voir paragraphe 5.2).

3.2. Désavantages

L'incorporation d'une molécule étrangère, l'indicateur, peut être considérée comme un désavantage. Elle peut théoriquement perturber le niveau réel de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ par le principe même de sa liaison avec le Ca^{2+} pour la détection (Cobbold et Rink, 1987). Ainsi, un phénomène tampon peut survenir lors de l'utilisation de fortes concentrations d'indicateur. Par exemple, la concentration de quin-2 doit être de l'ordre de 100 μM pour induire un bon rapport signal/bruit mais à une telle concentration un phénomène tampon apparaît. Cet effet tampon peut également modifier la cinétique des changements et réduire des réponses transitoires de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Des problèmes de compartimentalisation de l'indicateur ont été décrits au niveau des organelles intracellulaires (notamment le réticulum endoplasmique) de certaines cellules (Cobbold et Rink, 1987). Si la dé-estérification reste partielle, des formes partiellement estérifiées peuvent subsister et ainsi provoquer des signaux parasites (Oakes et coll., 1988). La présence d'ions de métal lourd peut atténuer le signal fluorescent par un phénomène de *quenching* (extinction de fluorescence). La détermination du K_d dans le milieu intracellulaire n'est pas évidente. Elle peut être influencée, ainsi que celle de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, par plusieurs facteurs tels que la viscosité cellulaire - une élévation de viscosité entraînant une baisse du K_d (Poenie, 1990) -, la présence de protéines, qui peut conduire à une sous-évaluation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Konishi et coll., 1988), la composition ionique du milieu (Roe et coll., 1990 ; Williams et Fay, 1990), la polarité (Roe et coll., 1990).

4. Les indicateurs fluorescents

Différents indicateurs fluorescents ont été développés afin de minimiser le plus possible les désavantages décrits. Le traitement des données par le rapport des intensités de fluorescence à deux longueurs d'onde d'excitation (fura-2) ou d'émission (indo-1), plutôt que par l'intensité absolue à une seule longueur d'onde (quin-2) est un atout majeur, rendant très maniables ces deux premiers indicateurs, notamment le fura-2. Ainsi de nombreux paramètres parasites sont éliminés : l'influence de la photodégradation et de la sortie éventuelle de l'indicateur fluorescent, une concentration intracellulaire de l'indicateur non uniforme modifiant l'intensité du signal indépendamment de l'ion, et l'épaisseur de l'échantillon. Le fura-2 est plus résistant à la photodégradation que le quin-2.

Afin de minimiser les problèmes de compartimentalisation et de fuite, des dérivés dextrans du fura-2 et de l'indo-1 ont été synthétisés, sans perturbation de leurs propriétés fluorescentes (spectres similaires à ceux de la sonde libre). Mais leur affinité pour le Ca^{2+} est inférieure, car le K_d a une valeur d'environ 350 nM.

Des indicateurs récents sont utilisés à des longueurs d'onde plus élevées, c'est-à-dire plus proches du ou dans le visible. Le fluo-3, par exemple, permet de détecter des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ supérieures à celles mesurées avec le fura-2 ou le quin-2, et n'est presque pas fluorescent sans sa fixation au Ca^{2+} ; les variations de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ appréciables sont de $\times 10$ entre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basale et celle correspondant à la saturation de l'indicateur. Sa principale caractéristique est que la formation du complexe indicateur- Ca^{2+} accroît fortement la fluorescence, tandis que les formes libre ou ester (AM) de l'indicateur ne sont presque pas fluorescentes (Minta et coll., 1989). Mais le fluo-3, ainsi qu'une autre sonde, le rhod-2, n'utilisent qu'une seule longueur d'onde d'excitation et qu'une seule longueur d'onde d'émission. Ceci ne permet pas une mesure de rapport de fluorescence, cependant ce désavantage peut être surmonté par l'utilisation simultanée d'un autre indicateur fluorescent. De plus, le problème de fuites n'est pas négligeable. Le fluo-3 et le rhod-2 sont essentiellement utilisés en fluorimétrie, cytométrie de flux et microscopie confocale. L'utilisation d'une longueur d'onde d'excitation dans le visible (avec le calcium-green, calcium-orange, calcium-crimson) permet d'éviter les interférences liés à l'autofluorescence. Dans ce cas, la mesure par utilisation d'un rapport de fluorescence n'est pas possible. Un résumé des propriétés fluorescentes des principaux indicateurs utilisés est présenté dans le Tableau 1.1.

Tableau 1.1. Propriétés de fluorescence des indicateurs de $[Ca^{2+}]_i$.

	<u>Maxima de fluorescence</u>		<u>Coefficient d'extinction</u> ($\times 10^{-3}$)	<u>Longueurs d'onde optimales pour la mesure (nm)</u>		<u>K_d</u> (nM)
	Ex	Em		Ex	Em	
	Fura-2	362	512	30	380	
Fura-2-Ca	335	505	35	340	510	
Fura-2 AM	369	478	30			
Quin-2	352	492	5	339	492	126
Quin-2-Ca	332	492	5	339	492	
Quin-2 AM	339	430	5			
Indo-1	349	485	34	355	485	250
Indo-1-Ca	331	410	34	355	405	
Indo-1 AM	361	479	34			
Fluo-3	506	526	78	490	525	400
Fluo-3-Ca	506	526	83	490	525	
Fluo-3 AM	464	non fluorescent	23			

Ex = longueur d'onde d'excitation (nm), EM = longueur d'onde d'émission (nm).

5. L'utilisation du fura-2

Le fura-2 (Figure 1.36) est l'indicateur fluorescent le plus communément utilisé pour la mesure de $[Ca^{2+}]_i$. Comparé à son prédécesseur, le quin-2, il est 30 fois plus fluorescent, possède un K_d supérieur pour le Ca^{2+} , est moins sensible au Mg^{2+} et à la photodégradation, et finalement, peut être analysé sous le mode de rapport de fluorescence. L'effet tampon vis-à-vis du Ca^{2+} est réduit, car le fura-2 nécessite des concentrations intracellulaires plus faibles (de l'ordre de plusieurs dizaines de micromoles, pour le quin-2 de l'ordre de la millimole).

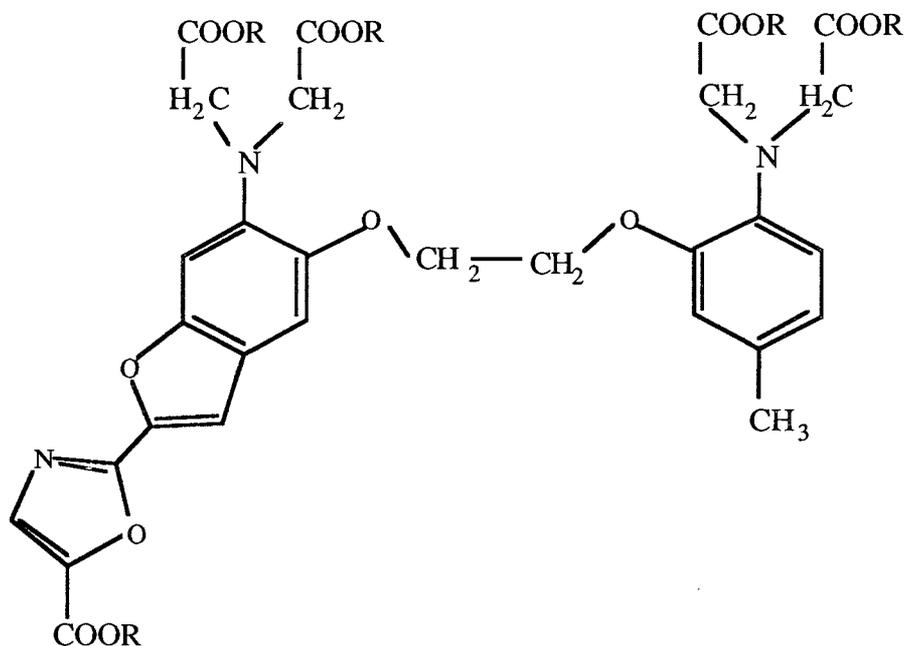


Figure 1.36. Structure chimique du fura-2 (R = H) et de sa forme ester acétoxyméthyl (R = CH₂COOCH₃).

La fluorescence maximale, à l'excitation, du fura-2 est déplacée à une longueur d'onde plus faible lors de sa liaison avec le Ca²⁺ (Figure 1.37), avec un déplacement négligeable du maximum à l'émission. Ainsi, le fura-2 est excité à 2 longueurs d'onde, 340 et 380 nm, correspondant respectivement au complexe fura-2-Ca²⁺ et à la forme libre du fura-2 acide. Pour la détermination de la [Ca²⁺]_i, le rapport de ces deux fluorescences ($R = F_{340}/F_{380}$) mesurées à une longueur d'émission de 510 nm peut donc être employé. Le fura-2 est également caractérisé par le point isobestique à 360 nm, qui permet de mesurer une fluorescence indépendante du Ca²⁺ et de déceler l'effet de *quenching* d'ions de métal lourd.

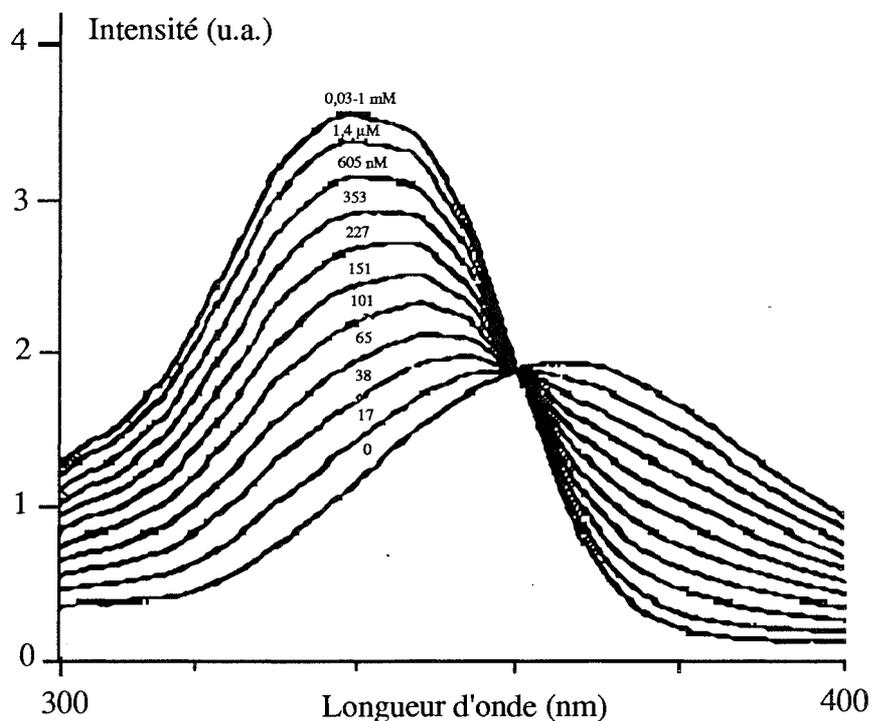


Figure 1.37. Spectres d'excitation d'une solution de fura-2 (1 μM) en présence de concentrations croissantes (de 0 à 1 mM) de calcium (u.a. = unité arbitraire). D'après Grynkiewicz et coll. (1985).

5.1. Incorporation intracellulaire du fura-2

Le fura-2 (poids moléculaire 751,5) existe sous forme d'ester acétoxyméthyl (fura-2 AM, poids moléculaire 1009,9) insoluble dans l'eau, mais soluble dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Ceci permet son incorporation non disruptive (Figure 1.35). Afin d'améliorer sa dispersion, il est recommandé d'ajouter de l'albumine sérique bovine (BSA). L'incorporation est favorisée par l'addition d'un agent dispersif non cytotoxique tel que le Pluronic F-127, un surfactant polyol non ionique (Kao et coll., 1989). La forme acide du fura-2 est ensuite libérée par action d'estérases cytosoliques. Pour éviter une hydrolyse précoce, il est préférable de répartir le fura-2 AM sous aliquots dans du DMSO anhydre et de le stocker au congélateur (-80°C). Il est également important de déterminer le temps d'incubation et la température pour obtenir des réponses en fluorescence maximales.

5.2. Calibration

Les mesures de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se basent sur un changement des propriétés fluorescentes après fixation du Ca^{2+} , permettant de donner le degré de saturation en Ca^{2+} de l'indicateur.

À l'équilibre, ceci est relié à la $[Ca^{2+}]_i$ libre en accord avec la loi d'action de masse :

$$K_d = ([X]_x[Ca^{2+}]) / [CaX] \quad \text{soit} \quad [Ca^{2+}] = K_d \times ([CaX] / [X])$$

où X est l'indicateur fluorescent libre auquel se fixe le Ca^{2+} pour former le complexe CaX avec une constante de dissociation K_d .

Pour le fura-2, le rapport de fluorescence à deux longueurs d'onde est directement lié à celui des deux formes de l'indicateur, et peut donc être utilisé pour calculer la $[Ca^{2+}]_i$. L'équation qui relie le rapport de fluorescence $R = F_{340}/F_{380}$ (fluorescence du fura-2 lié au Ca^{2+} (340 nm) / fluorescence du fura-2 libre (380 nm)) à $[Ca^{2+}]_i$ a été décrite par Grynkiewicz et coll. (1985), puis modifiée par Scanlon et coll. (1987) :

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)] \times \beta$$

où R_{max} et R_{min} sont les rapports de fluorescence à concentration saturante de Ca^{2+} et en absence de Ca^{2+} , respectivement. β est le rapport des fluorescences pour l'indicateur libre (380 nm) à concentration minimale sur concentration maximale de Ca^{2+} ($\beta = F_{min,380}/F_{max,380}$). Toutes ces valeurs, étant des rapports, sont sans unité et dépendent uniquement des propriétés chimiques de l'indicateur telles que l'affinité pour le Ca^{2+} et de la sensibilité de l'instrumentation. Les mesures de calibration sont nécessaires pour déterminer R_{max} , R_{min} et β . La méthode la plus utilisée est de faire varier le Ca^{2+} intracellulaire en gardant l'indicateur dans la cellule. La concentration saturante en Ca^{2+} peut être obtenue au moyen d'une solution enrichie en Ca^{2+} contenant un ionophore tel que l'ionomycine, et la concentration minimale en utilisant un chélateur du Ca^{2+} tel que l'EGTA.

5.3. Autofluorescence

Chaque tissu possède une fluorescence propre (autofluorescence, AF) qui ne s'annule pas dans l'équation précédente. Cette autofluorescence doit être appréciée séparément à chacune des longueurs d'onde, pour ensuite la soustraire de toutes les données.

Par exemple le rapport $R = F_{340} / F_{380}$ deviendra le rapport R' :

$$R' = (F_{340} - AF_{340}) / (F_{380} - AF_{380}) = F'_{340} / F'_{380}$$

Cette autofluorescence a été décrite dans la littérature comme provenant des nucléotides pyridiniques réduits (NADH, NADPH ; Chance et Jöbsis, 1959) et des flavoprotéines oxydées (Scholz et coll., 1969). Les premiers émettent une fluorescence bleue quand ils sont excités à 340 nm (pic d'émission à 470 nm), et les seconds une fluorescence jaune-vert quand ils sont excités à 430-470 nm (pic d'émission à 530 nm). De plus, le milieu extracellulaire, notamment l'élastine,

montre également des propriétés fluorescentes (résultats personnels). L'autofluorescence peut être mesurée sur l'échantillon avant la charge de l'indicateur fluorescent ou sur artère chargée par *quenching* par un autre ion (tel que le Mn^{2+}) formant avec le fura-2, après déplacement du Ca^{2+} , un complexe non fluorescent.

Ainsi, nous avons décrit les conditions principales de mesure du calcium intracellulaire par fluorescence, et précédemment, les propriétés élastiques de la paroi artérielle. La mesure du Ca^{2+} intracellulaire dans les cellules musculaires lisses vasculaires a généralement été appliquée à des préparations de cellules isolées ou en couche, d'anneau ou bande de vaisseau. D'une part, une technique de mesure de $[Ca^{2+}]_i$ sur artère entière perfusée a été récemment développée pour se rapprocher des conditions *in vivo* (Capdeville-Atkinson et coll., 1993). D'autre part, la compliance artérielle est un facteur important dans la compréhension des modifications fonctionnelles cardio-vasculaires survenant au cours du vieillissement et de diverses pathologies telles que l'hypertension, l'athérosclérose, *etc.* C'est à partir de toutes ces données que nous avons choisi d'étudier le rôle du Ca^{2+} intracellulaire dans la compliance artérielle et, de ce fait, de mettre au point une technique de mesure simultanée de $[Ca^{2+}]_i$ et de la compliance carotidienne à pression pulsée. Comme le souligne la Figure 1.38, l'augmentation de la rigidité des grosses artères de compliance au cours du vieillissement pourrait être modulée par le calcium, non seulement au niveau extracellulaire, mais aussi au niveau intracellulaire.

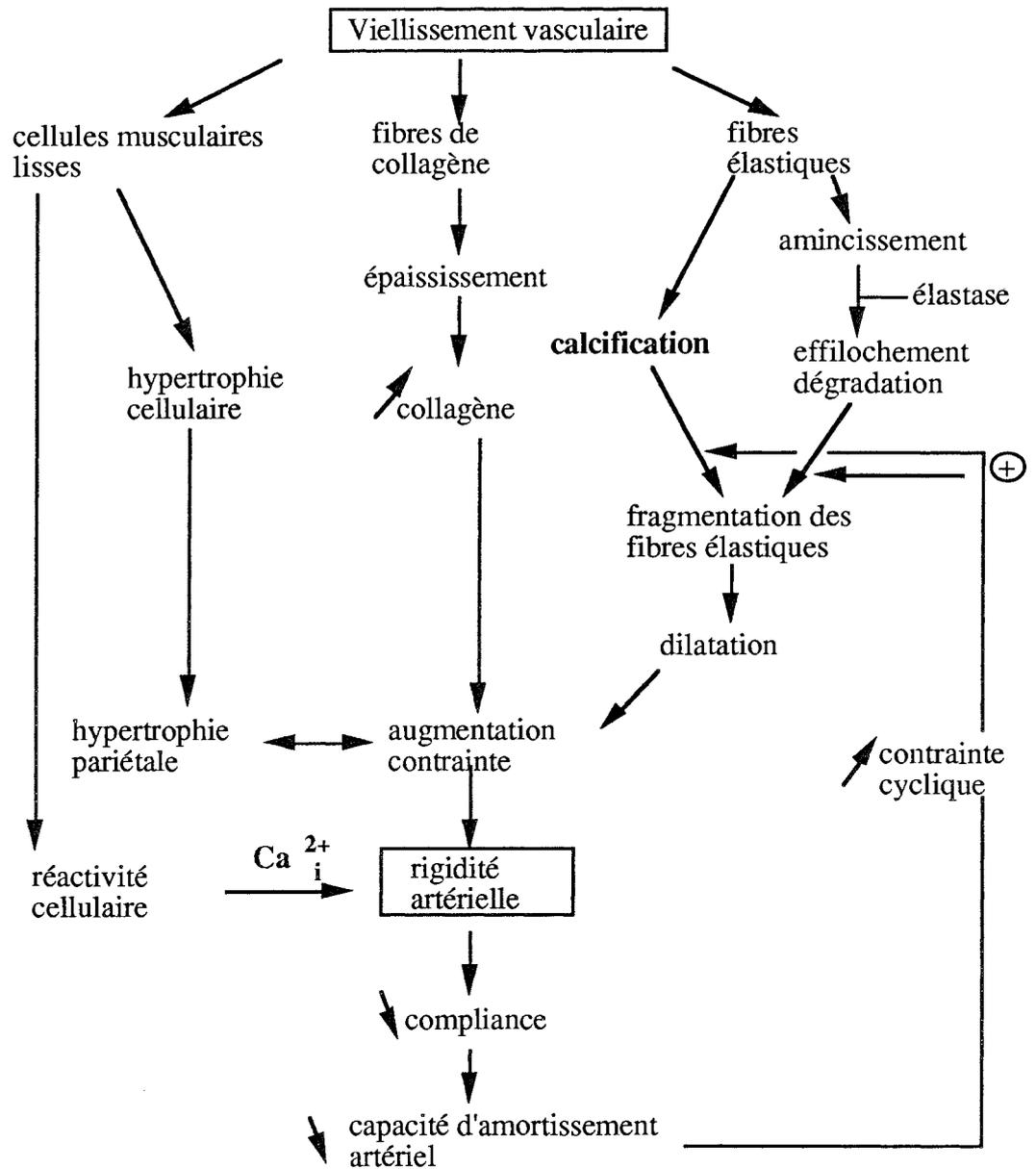


Figure 1.38. Composantes cellulaire et extracellulaire pouvant conduire à la rigidité artérielle au cours du vieillissement. Rôles pouvant être joués par le calcium, en gras.

CHAPITRE II

Mise au point de la technique de mesure simultanée du calcium intracellulaire et de la compliance artérielle à pression pulsée sur l'artère carotide de rat *in vitro*.

1. Introduction

Trois types fondamentaux de préparations vasculaires sont disponibles pour l'investigation des propriétés visco-élastiques de la paroi artérielle : les bandes, les anneaux artériels et le vaisseau cylindrique intact. Les deux premiers ne renseignent que faiblement sur la relation entre la pression et le rayon dans le vaisseau intact dont la paroi artérielle est soumise à des contraintes dans trois directions principales. *In vivo*, la paroi artérielle est soumise non seulement à une contrainte statique déterminée par la pression artérielle moyenne, mais également à des contraintes pulsées déterminées par une pression pulsée.

Cependant, la majorité des études de la compliance artérielle réalisées *in vitro* évaluent les propriétés mécaniques de la paroi artérielle à des niveaux différents de contrainte statique (Dobrin et Rovick, 1969 ; Cox, 1978a,b ; Lévy et coll., 1990 ; Caputo et coll., 1992 ; Girerd et coll., 1992). De plus, certaines techniques appliquant une perfusion pulsée d'un segment artériel ne font pas complètement abstraction du caractère de résistance. En effet, la diminution du diamètre peut entraîner des variations indirectes de la compliance de l'artère par la contraction des cellules musculaires lisses dans une direction radiale (Hongo et Chiba, 1983 ; Burger et coll., 1984) ou par la vasoconstriction d'artères collatérales (Crass et coll., 1988). A notre connaissance, peu d'études *in vitro* se sont intéressées à la compliance artérielle sous pression intraluminaire pulsée (Bergel, 1961a ; Bauer et Pasch, 1971 ; Callaghan et coll., 1986 ; Brant et coll., 1987), mais elles ne sont pas applicables à notre technique de mesure simultanée de $[Ca^{2+}]_i$. En effet, elles impliquent, soit la présence d'un appareillage dans le champ du faisceau lumineux pour les mesures de diamètres (Bergel, 1961a ; Bauer et Pasch, 1971 ; Brant et coll., 1987), soit une longueur trop importante de segment artériel (10 cm) par rapport à la chambre d'incubation du spectrofluorimètre et à la portion artérielle effectivement étudiée (Callaghan et coll., 1986).

Les propriétés visco-élastiques des artères de compliance sont principalement dues à l'élastine et au collagène (Wolinsky et Glagov, 1964), mais les cellules musculaires lisses, par leur activation ou inactivation, peuvent également modifier les propriétés mécaniques de la paroi artérielle (Cox, 1979 ; Lévy et coll., 1990). Le calcium étant le messager principal régulant la contraction des cellules musculaires lisses (Carafoli, 1987), il nous a paru important d'étudier le rôle que peut jouer le calcium dans la régulation de la compliance artérielle.

Tous ces éléments nous ont amené à développer une nouvelle méthode *in vitro* d'évaluation de l'élasticité artérielle par l'étude de la capacité de l'artère carotide à amortir un signal de pression pulsée. La paroi artérielle est soumise à des contraintes dépendantes de la pression artérielle (loi de Laplace) qu'il est plus facile de contrôler *in vitro* qu'*in vivo*. *In vivo*, la pression artérielle est généralement abaissée par un traitement pharmacologique hypotenseur. La pression artérielle différentielle est un paramètre important dans l'évaluation de la rigidité artérielle qui se manifeste par une modification de la compliance. Ainsi, au cours du vieillissement ou de pathologies telles que l'hypertension, la pression artérielle différentielle (différence entre les

pressions artérielles systolique et diastolique) est augmentée à la suite d'une rigidification de la paroi artérielle (Avolio et coll., 1985 ; Nichols et coll., 1985 ; Kelly et coll., 1989).

Des études cliniques ont montré que la circulation carotidienne est impliquée non seulement dans les mécanismes physiopathologiques d'une pression sanguine élevée, mais aussi dans la morbidité et la mortalité cardio-vasculaires de patients hypertendus par exemple. La circulation carotidienne contribue au flux sanguin cérébral. Des altérations de l'autorégulation de ce dernier peuvent être un facteur important de risque cérébro-vasculaire (Barry et Lassen, 1984). Le récent développement de méthodes ultrasoniques Doppler a permis d'évaluer directement sur les patients le diamètre et la vitesse du flux sanguin de l'artère carotide commune (Bouthier et coll., 1985). Ainsi, l'artère carotide est un modèle intéressant aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, chez l'Homme comme chez l'animal, pour évaluer les conséquences de la rigidité des gros troncs sur la circulation cérébrale et étudier la rigidité vasculaire en tant que telle.

Nous avons été amené à élaborer la technique d'estimation de la capacité d'une artère à amortir un signal de pression pulsée à partir de la littérature et de la configuration cardio-vasculaire *in vivo*. Comme nous allons le décrire en détail dans le paragraphe 2.1.1, le cœur sera représenté par une pompe péristaltique destinée à générer des ondes de pression sinusoïdales. Le système se divisera ensuite en deux circuits, l'un représentant l'aorte et les résistances périphériques et l'autre la voie carotidienne. En nous basant sur les travaux de Halpern et Kelley (1991), un capteur de pression a été positionné de chaque côté du segment artériel, celui placé avant l'artère servant de référence pour l'amplitude du signal sinusoïdal. Afin d'isoler les propriétés de compliance, nous nous sommes rapprochés des modèles de Cox (1977) et de Lévy et coll. (1990) où le circuit au-delà du segment artériel est fermé. Cette utilisation de deux capteurs de pression pour détecter les variations d'amplitude du signal de pression engendrées par la présence du segment artériel nous permettra de garder ce dernier libre de tout appareillage environnant et donc de mesurer simultanément le calcium intracellulaire par fluorescence. Nous comparerons nos résultats de mesure de l'élasticité carotidienne avec ceux déjà décrits dans la littérature, ces derniers étant obtenus par l'utilisation de techniques que nous avons également répétées sur notre préparation pour validation. La technique de mesure du calcium intracellulaire par fluorescence avec le fura-2 a déjà été décrite sur l'artère caudale de rat (Capdeville-Atkinson et coll., 1993) et sera adaptée à cette même mesure sur l'artère carotide de rat soumise à une pression pulsée.

Nous allons tout d'abord décrire en détail le système de mesure de la capacité d'amortissement artériel et la technique nous permettant de mesurer simultanément les variations de calcium intracellulaire, avant de déterminer les différents paramètres de nos études.

2. Description des appareillages de mesure de l'élasticité carotidienne et du calcium intracellulaire, et études préliminaires

2.1. Description des appareillages

2.1.1. Système de pression pulsée et de mesure de la compliance artérielle (Figure 2.1)

Quand le robinet à 2 voies est en position ouverte (Figure 2.1, c), l'artère carotide est perfusée avec une solution de Krebs au moyen d'une pompe péristaltique (p1) (Modèle Perpex, Werner Meyer, Luzern, Suisse) dont la fréquence est similaire au rythme cardiaque du rat (360 pulsations par minute) ; le débit en sortie d'artère est ainsi de 3 ml/min. La pression intraluminaire moyenne (PIM) est de $10,7 \pm 0,4$ mmHg ($n=32$) dans ces conditions. Le segment artériel est continuellement superfusé grâce à une pompe péristaltique (p2) à un débit de 1,5 ml/min. Les solutions de perfusion (s) et de superfusion (t) proviennent de la même solution de Krebs originelle (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1,2 mM, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 1 mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2,5 mM, $NaHCO_3$ 25 mM et glucose 10 mM, pH $7,4 \pm 0,1$) et sont oxygénées par le mélange 95% O_2 -5% CO_2 et maintenues à 37°C.

Quand le robinet à 2 voies est fermé, le liquide de perfusion ne traverse que la résistance (r). Cette résistance consiste en un segment de tube en silicone d'une longueur de 2 cm (diamètres interne 1 mm et externe 3 mm ; Novosil®, Bioblock Scientific, Illkirch, France), comprimé par une vis micrométrique afin d'augmenter la PIM.

Un capteur de pression de faible volume (World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, USA) est connecté à une égale distance à chaque extrémité de l'artère. Ces deux capteurs (Figure 2.1, a et b) sont couplés à un système MacLab/Transbridge (AD Instruments Ltd., Castle Hill, Australie) pour la conversion analogique numérique et le traitement mathématique des signaux de pression. Ainsi, la PIM dans le segment carotidien est calculée comme la moyenne des pressions moyennes enregistrées par les deux capteurs ($PIM = (PIMa + PIMb)/2$, mmHg). L'amplitude de chacun des signaux de pression (PPa et PPb, mmHg) est également calculée. Le rapport de ces deux amplitudes ($=PPb/PPa$) est considéré comme un indice d'amortissement du signal de pression pulsée par l'artère carotide. Ainsi, l'amortissement sera nul quand le rapport PPb/PPa est égal à 1 et maximal quand PPb/PPa tend vers 0.

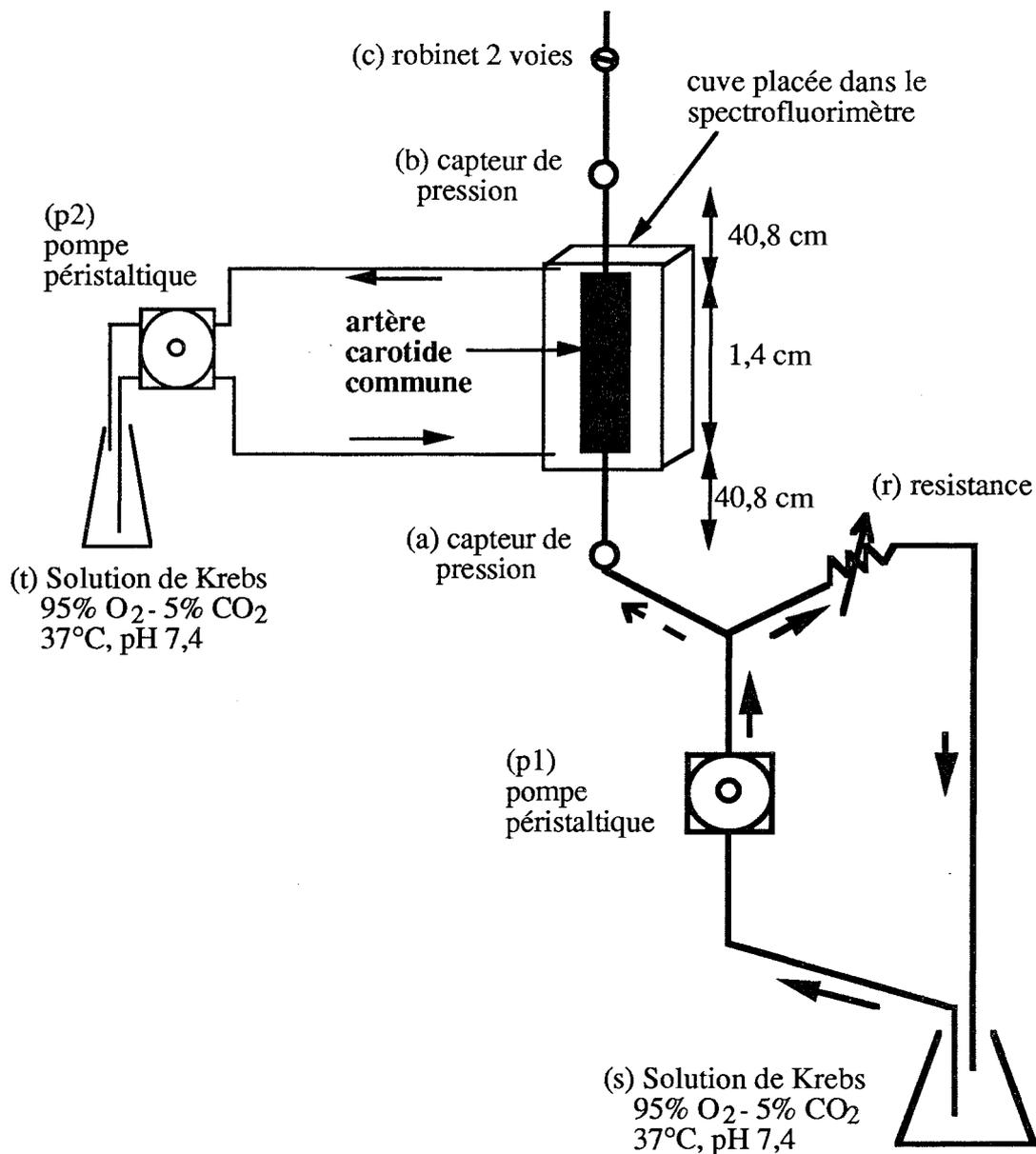


Figure 2.1. Schéma représentant le système d'évaluation de la capacité d'amortir un signal de pression pulsée de l'artère carotide de rat.

2.1.2. Système de mesure du calcium intracellulaire par fluorescence (Figure 2.2)

Le spectrofluorimètre (Figure 2.2 ; modèle Fluorolog F1T11, Spex Industries Inc., Edison, N.J., USA) comporte plusieurs modules dont une source lumineuse, un diviseur de faisceau lumineux, deux monochromateurs d'excitation, un système permettant une transmission alternée plus ou moins rapide des deux longueurs d'onde d'excitation, une chambre d'incubation et un monochromateur d'émission.

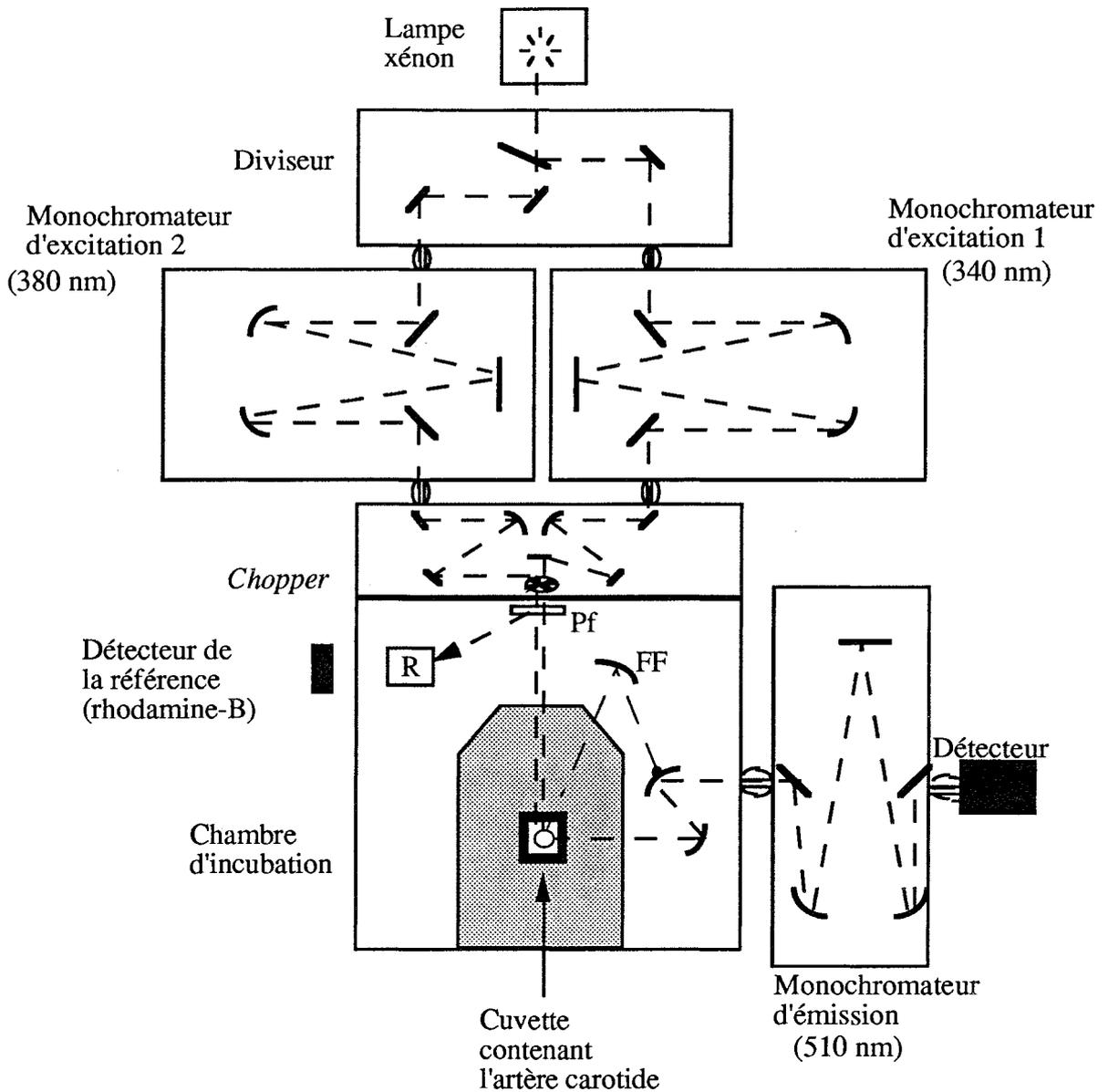


Figure 2.2. Schéma représentant le spectrofluorimètre (modèle Fluorolog F1T11, Spex) pour la mesure du calcium intracellulaire avec la sonde fluorescente, le fura-2, par excitation alternée à 340 et 380 nm et mesure de la fluorescence émise à 510 nm. R=solution de référence, Pf=porte-filtre, FF=front face.

2.1.2.1. La source lumineuse

Le Fluorolog possède une lampe xénon 450 Watts qui produit un spectre plus uniforme qu'une lampe à vapeur de mercure. Aux longueurs d'onde d'excitation du fura-2 (335-345 et 375-385 nm) l'intensité lumineuse émise par une lampe xénon est suffisante pour des mesures de fluorescence.

La puissance de la lampe xénon de 450 Watts est principalement utilisée pour d'autres applications telles que la microscopie de fluorescence. Dans le cas présent une puissance plus faible est suffisante pour diminuer les risques de dégradation photonique de la sonde. Ainsi des filtres neutres peuvent être placés sur la voie de l'excitation (Figure 2.2 : Pf).

2.1.2.2. Diviseur

La lumière émise par la lampe xénon est divisée en deux faisceaux d'énergie identique qui sont transmis en parallèle vers les monochromateurs d'excitation.

2.1.2.3. Monochromateurs d'excitation

Les deux monochromateurs d'excitation sont équipés d'une sélection automatique de la longueur d'onde avec un domaine d'excitation possible de 0 à 1000 nm. Pour le fura-2, les longueurs d'onde retenues sont 340 et 380 nm. La largeur de la bande passante est choisie par ajustement bilatéral des fentes à l'entrée et à la sortie de chacun des monochromateurs. Celle-ci peut varier par unité de 100 μm de 100 μm à 8 mm correspondant respectivement à des bandes passantes de $\pm 0,4$ nm à ± 30 nm. Une ouverture de 3 mm correspond à une bande passante de 11 nm et conduit à un faisceau d'excitation de 3 mm de largeur, nettement supérieure au diamètre maximal de l'artère à haute pression (1,6 mm ; voir nos résultats).

2.1.2.4. Système permettant l'excitation alternée par deux longueurs d'onde ("chopper")

Ce système se compose d'une roue vide comportant quatre palettes réfléchissantes régulièrement espacées. Quand le faisceau de lumière provenant du monochromateur 1 passe à travers l'espace vide entre deux palettes, celui provenant du monochromateur 2 est bloqué par le dos d'une palette. Au temps suivant, le *chopper* est dans une position telle que le faisceau provenant du monochromateur 2 est réfléchi par l'une des palettes, puis concentré par un miroir sur l'échantillon. La vitesse de rotation du *chopper* détermine la rapidité d'alternance des deux longueurs d'onde, celle-ci pouvant aller de la milliseconde à plusieurs secondes.

2.1.2.5. Porte-filtre et filtres

Afin de réduire l'intensité de la lumière d'excitation, sans modifier la longueur d'onde choisie, il est possible de placer un filtre neutre sur la trajectoire de la lumière après le *chopper* (Figure 2.2 : Pf).

2.1.2.6. Volet automatique

Ce volet se situe juste avant la chambre d'incubation. Quand les données ne sont pas collectées, le volet est automatiquement mis en place sur la voie du faisceau lumineux. Ceci permet d'éviter une illumination inutile de l'échantillon.

2.1.2.7. Système de référence

La référence utilisée est une solution de rhodamine-B (8 g/l d'éthylène glycol), placée dans une cuve en amont de la chambre d'incubation. Une fois le *chopper* passé, une portion de la lumière (10%) est dirigée vers la référence. Les signaux de fluorescence émis par l'échantillon peuvent être rapportés au signal émis par la rhodamine-B ; celui-ci est mesuré par le détecteur propre à la référence, lui-même relié à un photomultiplicateur (Hamamatsu R508). La rhodamine-B fluoresce en proportion directe à l'énergie (quanta) de la lumière incidente de façon indépendante de la longueur d'onde (de 200 à 600 nm). Ce compteur de référence est utilisé pour les raisons suivantes :

- compenser les fluctuations résiduelles de l'intensité de la source lumineuse et le vieillissement de la lampe,
- compenser la dépendance de la longueur d'onde associée à la sortie de lumière de la lampe au xénon,
- corriger les spectres : ainsi les spectres obtenus sont indépendants des caractéristiques de l'instrument, permettant une mesure plus précise.

2.1.2.8. Chambre d'incubation

Le porte-cuve, à double paroi, permet une circulation d'eau préchauffée pour maintenir constante la température (37°C dans notre cas). Le préchauffage de l'eau se fait grâce à un bain-marie relié au porte-cuve.

La fermeture supérieure de la chambre est équipée d'une ouverture spéciale permettant l'accès sans perturbation du signal.

2.1.2.9. Monochromateur d'émission

Le monochromateur d'émission possède les mêmes caractéristiques que les monochromateurs d'excitation. La longueur d'onde est fixée à 510 nm pour le fura-2 avec une bande passante de ± 15 nm. Ce monochromateur est relié à un photomultiplicateur et à un détecteur du signal d'émission (Hamamatsu R928).

2.1.2.10 Mesure en angle droit ou en "front-face"

La fluorescence est typiquement collectée à un angle de 90° par rapport au faisceau d'excitation afin de minimiser les interférences venant de la lumière transmise. Pour des échantillons très absorbants, la majorité de la lumière émise est réabsorbée avant que la fluorescence n'ait pu être mesurée. Dans ce cas, la détection en *front-face* (22,5°) est idéale et est effectuée par ré-orientation d'un miroir (Figure 2.2 : FF).

2.2. Expériences préliminaires

2.2.1. Préparation du segment artériel

2.2.1.1. Animaux utilisés

Les animaux utilisés sont des rats mâles Wistar non consanguins (Ico:WI IOPS AF/Han) (Iffa Credo, L'Arbresle, France), âgés de 12 mois et pesant 325 ± 20 g (n=7).

Ils sont stabulés à l'animalerie (22°C) où la lumière est présente de 6h à 18h pendant le cycle jour/nuit (12/12 heures). Ils reçoivent *ad libitum* de la nourriture standardisée (AO4 ; UAR, Epinay-sur-Orge, France, contenu en calcium : 150 mmol/kg), ainsi que de l'eau adoucie par osmose inverse (Aqua Clear, Culligan International Company, Northbrook, USA). La composition de l'eau est la suivante (μM) : calcium 28, magnésium 7, sodium 4, chlorure 28, sulfate 6 et nitrate 64.

2.2.1.2. Prélèvement de l'artère carotide commune

Les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (50 mg/kg, Sanofi S.A., Paris, France). La trachée est ensuite intubée et le rat est placé sous respiration artificielle (50 coups par minute, 10 ml/kg). La cage thoracique est ouverte par section médiane du sternum afin d'accéder à l'origine de l'artère carotide commune gauche. Celle-ci est soigneusement dégagée des tissus environnants sur une longueur d'environ 23 mm. Deux ligatures sont réalisées, l'une à l'extrémité distale de l'artère (proche de la bifurcation carotidienne) et l'autre à l'extrémité proximale (proche de l'aorte). Une longueur L est ainsi déterminée entre les deux ligatures. L'artère est sectionnée en amont de la ligature distale, la libérant de toute contrainte longitudinale. La longueur L_0 est mesurée entre l'extrémité libre de l'artère et la ligature proximale. Le rapport L/L_0 correspond au coefficient de rétractation longitudinale de l'artère. En aval de celle-ci, l'artère est coupée, le segment artériel ainsi prélevé est transféré dans la solution physiologique de Krebs oxygénée (95% O₂-5% CO₂) dont la composition a été décrite précédemment (paragraphe 2.1.1).

L'endothélium est impliqué, d'une part, dans la libération de facteurs de relaxation ou de contraction et, d'autre part, dans la contraction du muscle vasculaire lisse. Afin d'obtenir un signal calcique ne provenant que des cellules musculaires lisses, l'endothélium est retiré mécaniquement à l'aide d'une tige métallique d'un diamètre de 0,4 mm. L'absence d'endothélium a été vérifiée par histologie (voir paragraphe 2.2.2). Le segment d'artère carotide est cathétérisé à ses deux extrémités (cathéters de polyéthylène ; diamètres interne de 0,58 mm et externe de 0,96 mm ; Jencons, Leighton Buzzard, Bedfordshire, Royaume-Uni). Les cathéters ont été préalablement fixés sur un support (Figure 2.3) conçu dans notre laboratoire pour être placé dans une cuve de spectrofluorimètre et permettre la perfusion et la superfusion du segment artériel. La longueur *in vivo* de ce dernier est restituée. Le support est introduit dans la cuve, de verre spécial (Hellma, Paris, France), et le tout placé dans la chambre d'incubation thermostatée (37°C) du spectrofluorimètre. Le segment artériel est ensuite relié au système de pression pulsée décrit précédemment (voir paragraphe 2.1.1).

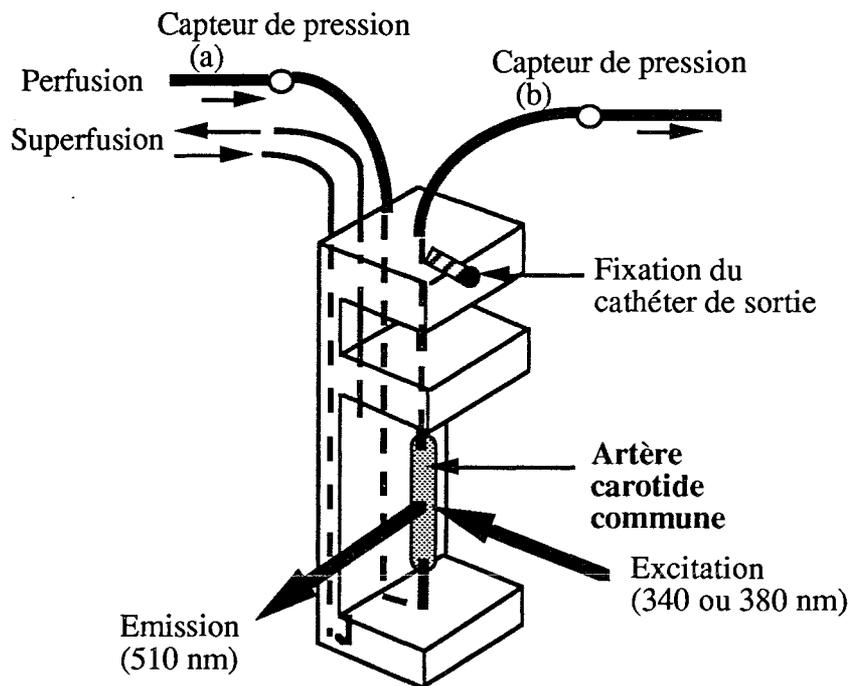


Figure 2.3. Schéma représentant le support sur lequel le segment de l'artère carotide est fixé et la direction relative des faisceaux lumineux d'excitation et d'émission.

2.2.2. Vérification histologique de l'absence de l'endothélium

La méthode utilisée dérive des travaux de Caplan et coll. (1974). Le segment artériel est découpé longitudinalement à l'aide de ciseaux ophtalmiques (Moria, Paris, France) et est fixé à ses quatre extrémités par des aiguilles sur une plaque de liège, immergée dans une solution de

Krebs. L'artère est ensuite plongée dans une série de solutions, à l'abri de la lumière :

- Solution d'HEPES (20 mM) et de glucose (260 mM), pH 7,4, pendant 150 sec,
- Solution de glucose (2,3 mM) et de nitrate d'argent (24 mM), pendant 120 sec,
- Solution de glucose (260 mM), pendant 60 sec,
- Solution de cacodylate de sodium (113 mM) et de saccharose (219 mM).

L'artère est ensuite montée entre lame et lamelle, l'adventice face à la lame, avec du baume d'inclusion Eukitt (Kindler GmbH, Freiburg, Allemagne) et révélée à la lumière pendant 15 min. Le segment est observé en immersion sous microscope optique ($\times 100$, Dialux 20 Leitz, Wetzlar, Allemagne).

2.2.3. Détermination de l'absorbance de l'artère carotide

Un fragment de 1 cm de l'artère carotide, chargée ($n=7$) ou non ($n=7$) avec le fura-2, est coupé longitudinalement et étalé dans une solution de Krebs entre lame et lamelle. Cette préparation est placée verticalement dans la chambre d'un spectrophotomètre (UV 1205, Shimadzu Co., Kyoto, Japon). L'absorbance est mesurée à des longueurs d'onde de 300 à 500 nm. La même mesure est réalisée sur un échantillon témoin ne contenant que la solution de Krebs. Une baisse de la quantité de lumière transmise peut être due à un phénomène d'absorbance ou de diffusion de la lumière de la part de l'échantillon. La diffusion potentielle de la lumière est mesurée en plaçant l'échantillon en deux positions, l'une proche, et l'autre éloignée de la cellule de mesure. Ainsi une absorbance plus faible en position éloignée indique une diffusion de la lumière par l'artère.

2.2.4. Etude préliminaire de la mesure de l'indice d'amortissement carotidien en fonction de la pression intraluminale

Une fois le segment carotidien ($n=5$) relié au système de pressurisation pulsée, il est perfusé pendant 30 min. Les segments sont ensuite pressurisés par fermeture du robinet (Figure 2.1 : c). Les segments sont soumis à des cycles lents de pressurisation-dépressurisation par augmentation et diminution de la PIM, respectivement. La pressurisation s'effectue par palier de 25 mmHg d'une durée de 1 min chacun, ceci de 25 à 150 mmHg. A 150 mmHg, les segments subissent une dépressurisation par paliers identiques (25 mmHg, 1 min chacun) jusqu'à 25 mmHg. Ce cycle lent de pressurisation-dépressurisation est répété 2 fois avec un intervalle de temps de 15 min entre chaque cycle.

2.2.5. Détermination des paramètres d'incorporation du fura-2

La validation de la mesure de $[Ca^{2+}]_i$ par le fura-2, sur un segment cylindrique d'artère a déjà été publiée (Capdeville-Atkinson et coll., 1993), et certains paramètres ont été adaptés pour les mesures sur l'artère carotide.

2.2.5.1. Préparation de la solution de fura-2 AM

La concentration de 5 μ M fura-2 AM a été conservée (Capdeville-Atkinson et coll., 1993). Le fura-2 AM est dissous dans du DMSO, puis réparti en aliquots de 10 μ l immédiatement congelés à -80°C . Le jour de la manipulation, un aliquot est décongelé et la solution finale de Krebs (2 ml) contenant le fura-2 AM est la suivante : 5 μ M fura-2 AM, 0,06% Pluronic F-127 (dissous dans le DMSO), 0,75% DMSO et 0,10% de BSA (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA).

2.2.5.2. Durée de la charge du fura-2 AM

Un premier spectre d'excitation est réalisé entre 300 à 400 nm sur le segment non chargé ($n=7$). Celui-ci est ensuite perfusé avec la solution de fura-2 AM. Afin de suivre l'incorporation de l'indicateur, des spectres d'excitation sont effectués régulièrement toutes les 15 min jusqu'à la 150^{ème} min. Ceci permet de déterminer le temps nécessaire pour obtenir une incorporation maximale indiquée par une fluorescence maximale. Afin d'éliminer le fura-2 AM excédentaire resté dans le milieu extracellulaire et d'optimiser l'hydrolyse de l'indicateur, le segment est perfusé avec une solution de Krebs seule pendant 35 min. Durant cette période, des spectres d'excitation sont réalisés toutes les 5 min afin de déterminer le temps nécessaire pour obtenir un spectre d'excitation stable.

2.3. Résultats des études préliminaires permettant la détermination des paramètres de base

2.3.1. Vérification histologique de l'absence de l'endothélium

Les coupes en présence d'endothélium présentent un tapis continu de cellules endothéliales jointives bien individualisées. Après destruction mécanique de l'endothélium, toutes les cellules endothéliales et la membrane limitante basale ont disparu. Les cellules musculaires lisses sont nettement visibles et paraissent intactes.

2.3.2. Détermination de l'absorbance de l'artère carotide

L'absorbance de l'artère non chargée est négligeable quelle que soit la longueur d'onde étudiée, en particulier aux longueurs d'onde utilisées dans cette étude (Figure 2.4). L'absorbance

n'est pas modifiée par l'incorporation du fura-2 (test t de Student pour séries non appariées). Ces deux résultats sont vérifiés quelle que soit la position de l'artère par rapport à la cellule réceptrice. Les valeurs mesurées en position éloignée sont plus élevées, mais non significativement différentes de celles mesurées dans l'autre position (Figure 2.4 ; Tableau 5.1 en annexe).

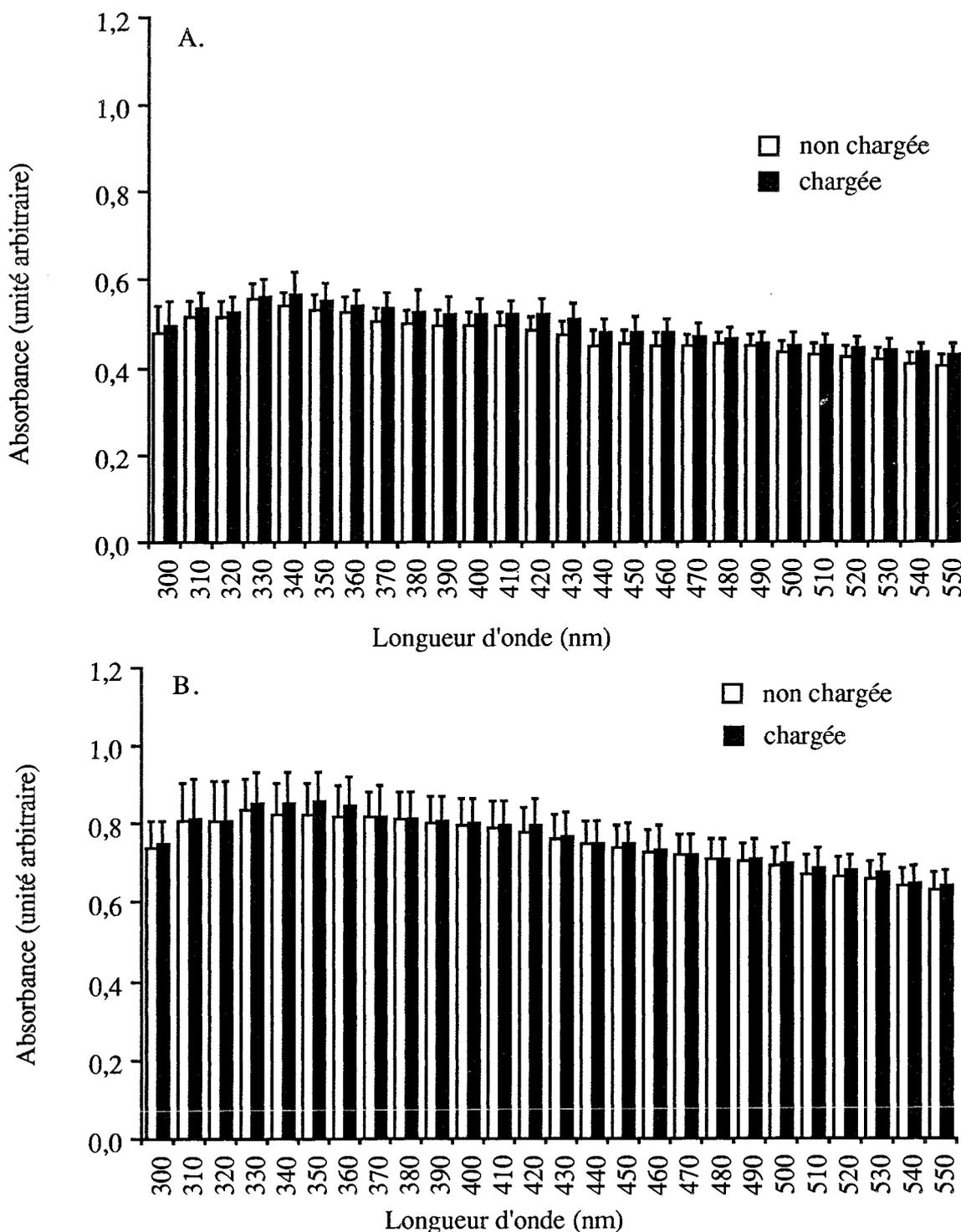


Figure 2.4. Absorbance (unités arbitraires ; $m\pm sm$) de l'artère carotide non chargée (n=7) ou chargée (n=7) en fonction de la longueur d'onde soit en position proche (A), soit en position plus éloignée (B) de la cellule réceptrice.

2.3.3. Mesure de l'indice d'amortissement carotidien en fonction de la pression intraluminale

Au cours de la première pressurisation du segment carotidien, la valeur ($m \pm esm$) de PPb/PPa s'élève, passant de $0,370 \pm 0,012$ (50 mmHg) à $1,014 \pm 0,016$ (150 mmHg). Ainsi, la capacité d'amortissement artériel est maximale pour les faibles pressions (25-50 mmHg) et minimale à partir de 100 mmHg (Figure 2.5 ; Tableau 5.2 en annexe).

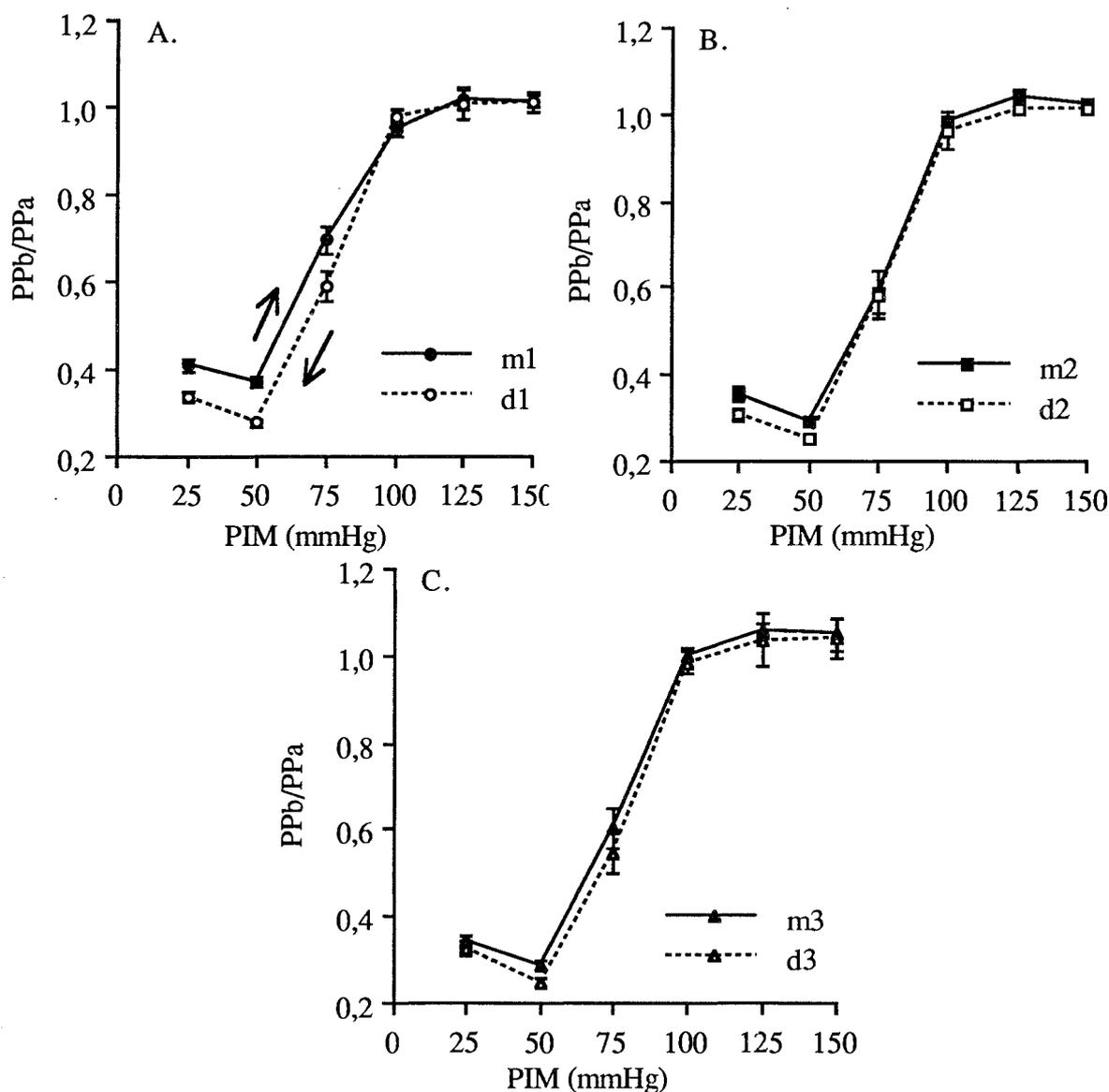


Figure 2.5. Effets de 3 cycles de pressurisation (m) - dépressurisation (d) consécutifs sur la capacité d'amortissement carotidien (PPb/PPa ; $m \pm esm$). **A** : premier cycle, **B** : second cycle, **C** : troisième cycle.

La courbe de la première dépressurisation ressemble à celle de la première montée en pression. Cependant, elle est décalée vers des valeurs plus faibles de PPb/PPa aux faibles pressions (Figure 2.5A). A 50 mmHg, cette valeur de PPb/PPa est égale à $0,278 \pm 0,008$ alors

qu'elle est de $0,370 \pm 0,012$ ($P < 0,05$) lors de la montée en pression (Figure 2.5A). Au cours des 2 cycles suivants de pressurisation-dépressurisation, les différences entre montée et descente en pression disparaissent (Figure 2.5B,C). A l'exception du premier cycle de pressurisation, les courbes suivantes sont toutes similaires quel que soit le niveau de pression intraluminale (Figure 2.6 ; Tableau 5.2 en annexe).

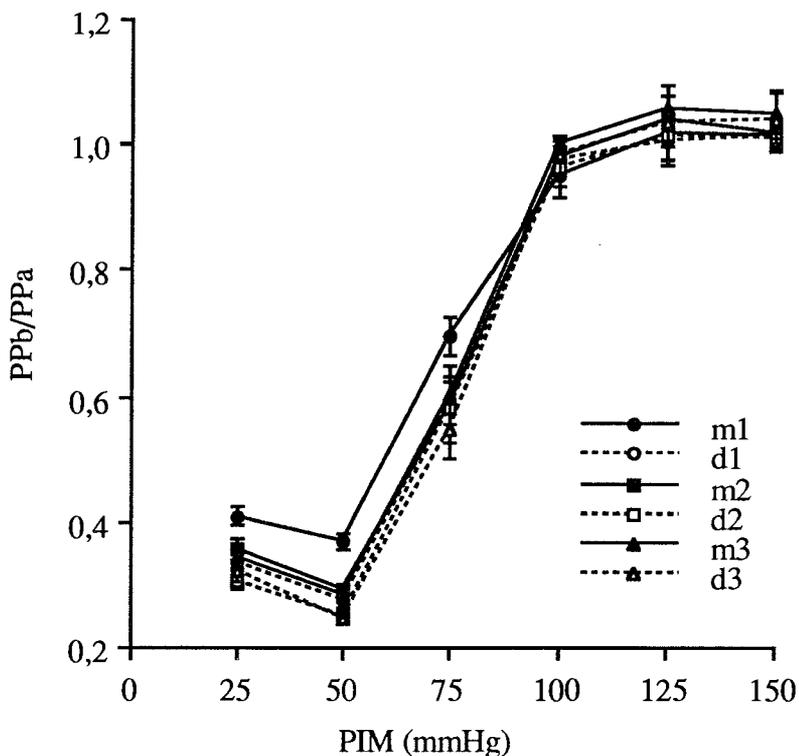


Figure 2.6. Evolution de la capacité d'amortissement carotidien (PPb/PPa ; $m \pm esm$) au cours de 3 cycles (1,2,3) de pressurisation(m)-dépressurisation(d) consécutifs. Figure regroupant l'ensemble des courbes de la Figure 2.5.

2.3.4. Durée de la charge du fura-2 AM

2.3.4.1. Temps de la charge

Les signaux fluorescents mesurés à des longueurs d'onde de 340, 360, 380 nm augmentent linéairement jusqu'à 90 min de charge environ pour atteindre un niveau maximal de fluorescence à 105 min (Figure 2.7 ; Tableau 5.3 en annexe).

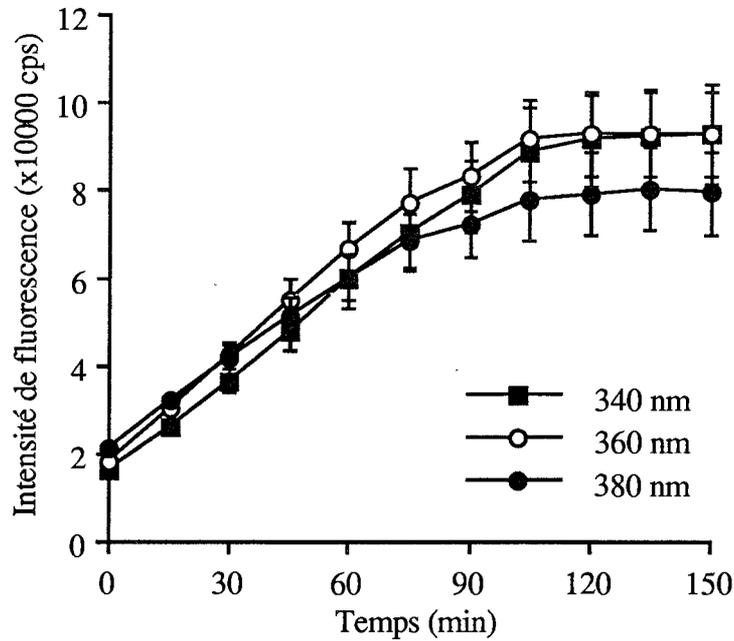


Figure 2.7. Evolution au cours du temps de la fluorescence ($m \pm esm$) aux longueurs d'onde d'excitation 340, 360 et 380 nm (longueur d'onde d'émission 510 nm) pendant la période d'incorporation du fura-2 AM.

2.3.4.2. Temps d'hydrolyse

Après la période d'incorporation du fura-2 AM, le segment est "lavé" avec une solution de Krebs simple pendant 35 min. Les fluorescences émises correspondantes aux trois longueurs d'onde d'excitation 340, 360 et 380 nm diminuent progressivement jusqu'à 30 min, temps à partir duquel les spectres d'excitation deviennent parfaitement reproductibles (Figure 2.8 ; Tableau 5.4 annexe).

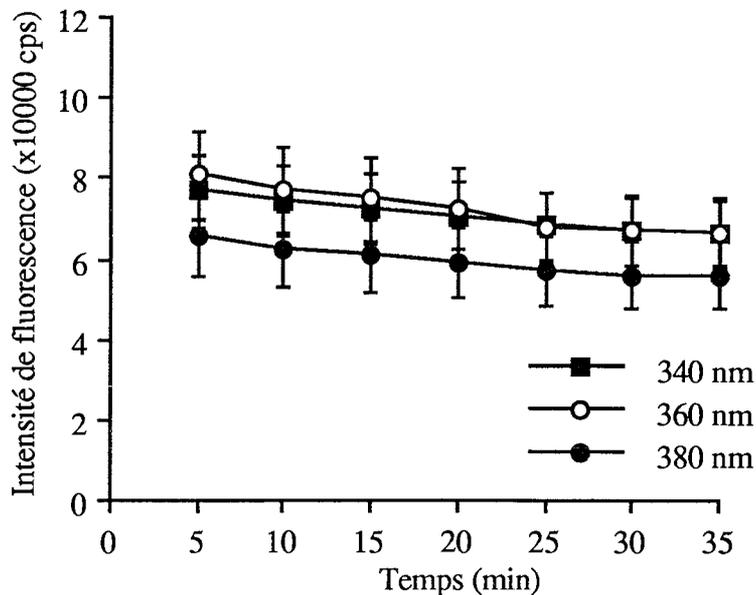


Figure 2.8. Evolution au cours du temps de la fluorescence ($m \pm esm$) aux longueurs d'onde d'excitation 340, 360 et 380 nm (longueur d'onde d'émission 510 nm) pendant la période de "lavage" du segment à la suite de la charge du fura-2 AM.

2.4. Conclusions sur les paramètres d'étude

Ces résultats préliminaires indiquent un comportement artériel différent suivant le niveau de pression intraluminale. A de faibles pressions (25-50 mmHg), l'artère carotide montre une capacité maximale d'amortir un signal de pression pulsée tandis qu'à partir de 100 mmHg, l'indice d'amortissement artériel étant égal à 1, elle perd cette capacité. Nous expliquerons plus en détail ce phénomène dans les paragraphes suivants. Les cycles successifs de pressurisation-dépressurisation mettent en évidence la présence d'un phénomène d'hystérésis, durant les premières montée et descente en pression ; ce phénomène s'amenuise après plusieurs cycles. Une telle propriété a déjà été décrite sur des artères soumises à des cycles de pressurisation associés à des plateaux de pression statique (Bergel, 1961b). Dans ces conditions, nous avons été amenés à effectuer des cycles initiaux de pressurisation-dépressurisation rapides pour minimiser l'hystérésis et obtenir des résultats reproductibles.

Après minimisation du phénomène d'hystérésis, les courbes de montée et de descente en pression sont similaires. Nous avons donc décidé d'étudier l'élasticité artérielle uniquement lors de pressurisations intraluminales, c'est-à-dire lors des montées en pression intraluminale de 25 à 150 mmHg.

Dans cette étude préliminaire, chaque plateau de pression était maintenu pendant 1 min. Mais afin de déceler des variations telles que le *creep* - observé par Lévy et coll. (1990) dans les mesures de diamètre à des niveaux de pression statique -, et la relaxation à la contrainte - observée par Zatzman et coll. (1954) lors de l'apposition d'une contrainte rapide -, chaque plateau de pression sera maintenu pendant 5 min au cours des cycles de pressurisation intraluminale.

Lors de la période d'incorporation du fura-2 AM à l'intérieur des cellules musculaires lisses, les signaux de fluorescence à 340, 360 et 380 nm sont stables à partir de 105 min et, lors de la période d'hydrolyse, ils se stabilisent à partir de la 30^{ème} min. De plus, le taux de charge de la sonde - à une concentration de 5 μ M - déterminé par le rapport des fluorescences avant et après charge est comparable à celui obtenu sur l'artère caudale à cette même concentration (Capdeville-Atkinson et coll., 1993). Nous avons donc choisi un temps de charge de la sonde (5 μ M) de 105 min suivi de 30 min d'hydrolyse afin d'obtenir des spectres d'excitation stables.

Ces paramètres ayant été définis pour chacune des techniques (amortissement artériel et calcium intracellulaire), nous allons nous intéresser à la relation calcium intracellulaire-compliance artérielle par la mesure simultanée de la capacité d'amortissement artériel et de $[Ca^{2+}]_i$.

3. Etude *in vitro* de la capacité de l'artère carotide à amortir un signal de pression pulsée

Nous avons évalué l'évolution de la capacité d'amortissement du signal de pression pulsée à différentes pressions intraluminales et recherché la relation entre la $[Ca^{2+}]_i$ et cette capacité d'amortissement. Afin de valider notre technique de mesure, nous avons comparé l'indice PPb/PPa à des mesures du diamètre artériel et du volume intraluminal que nous avons réalisées sur notre préparation. Nous avons également étudié les effets de l'activation des cellules musculaires lisses par l'utilisation d'un ionophore du calcium ou de la noradrénaline, et de leur inactivation par l'utilisation (1) d'un chélateur du calcium, (2) d'une solution fixatrice, ou (3) de l'association cyanure de potassium et dinitrophénol.

3.1. Matériel et méthodes

Les segments carotidiens, issus de rats mâles Wistar (âgés de 10 à 12 mois, Iffa Credo), sont prélevés et traités selon la technique décrite précédemment. Le coefficient de rétractation longitudinale L/L_0 est de $1,47 \pm 0,02$ ($n=32$; $m \pm esm$) ; la longueur du segment après restitution de sa longueur *in vivo* est de $1,38 \pm 0,03$ cm ($n=32$; $m \pm esm$).

3.1.1. Cycles de pressurisation intraluminaire

Les segments carotidiens sont initialement perfusés pendant 15 min. Afin de minimiser le phénomène d'hystérésis et d'obtenir une réponse stable pour PPb/PPa, les segments sont soumis à 5 cycles rapides de pressurisation intraluminaire après fermeture du robinet à 2 voies. Chaque cycle consiste en une montée progressive et continue de la PIM, de la pression de base jusqu'à 150 mmHg, suivie d'un retour de la PIM à son niveau de base. Chacun de ces cycles dure 5 min. Les valeurs de PIM et de PPb/PPa sont mesurées avant le premier cycle et à la fin de chaque cycle.

Le segment artériel est ensuite soumis à un cycle lent de pressurisation intraluminaire qui consiste en une augmentation de PIM de 25 à 150 mmHg, par palier de 25 mmHg durant chacun 5 min. A la fin des 5 min à 150 mmHg, la PIM retourne à sa valeur basale par ouverture du robinet à 2 voies et de la résistance. Ce cycle lent de pressurisation intraluminaire a été effectué 2 à 3 fois selon le protocole (voir ci-dessous).

Dans une expérience contrôle sur la reproductibilité de la mesure de PPb/PPa au cours de cycles lents de pressurisation intraluminaire, les segments carotidiens ($n=5$) sont soumis à 3 de ces cycles espacés chacun d'une période de perfusion de 10 min avec la solution de Krebs. Les valeurs de PIM et de PPb/PPa sont mesurées en continu tout au long de ce protocole.

A la fin de l'expérience, le poids frais du segment carotidien est mesuré (PF, g). Le segment est ensuite déshydraté jusqu'à l'obtention d'un poids sec constant (PS, g ; environ 12 heures à 110°C). Le rapport PF/PS est calculé et comparé à ce même rapport déterminé sur un segment de l'artère carotide droite, prélevé sur le même animal, mais n'ayant pas été soumis au protocole de cycles de pressurisation intraluminale. Ceci permet de déterminer si les cycles de pressurisation intraluminale entraînent un œdème de la paroi artérielle.

3.1.2. Comparaison de l'indice d'amortissement artériel avec d'autres paramètres

3.1.2.1. Mesure du diamètre externe

Les conditions expérimentales sont identiques à celles déjà décrites. La cuve contenant le segment n'est pas placée dans le spectrofluorimètre, mais dans un système d'analyse d'images. PIM et PPb/PPa sont mesurés en continu au cours de cycles lents de pressurisation intraluminale (n=17) comme précédemment décrit. En parallèle, les dimensions du segment artériel sont mesurées grâce à une caméra CCD (1 pixel = 2,3 µm ; modèle XC77, Sony, Tokyo, Japon) et un programme algorithmique Optilab (Graftek, Meudon-la-Forêt, France) : diamètre externe moyen D_e , et variations de ce diamètre induites par les pulsations de pression (ΔD_e = différence entre les diamètres maximal et minimal durant chaque pulsation). Cet appareillage a été gracieusement mis à notre disposition par l'unité INSERM U308 (Professeur C. Burlet, U308, rue Lionnois, Nancy, France). En estimant que la paroi artérielle est incompressible (Carew et coll., 1968 ; Girerd et coll., 1992) et que la longueur du segment reste constante, le rayon interne (R_i) a été calculé :

$$R_i = (R_e^2 - L(r_e^2 - r_i^2)/L_0)^{1/2} \quad (\mu\text{m})$$

où L/L_0 est le coefficient de rétraction longitudinale, R_e le rayon externe, R_i le rayon interne. Les valeurs de rayons externe et interne, r_e et r_i respectivement, sont déterminées séparément sur une coupe transversale d'épaisseur 20 µm de segment non pressurisé par histomorphométrie.

A partir des valeurs de R_i , la compliance déterminée par coupe transversale (nl/mmHg/mm segment) est calculée pour chaque palier de PIM.

Certains segments (n=4) sont stimulés par superfusion d'un agoniste α_1 -adrénergique, la noradrénaline (10 µM) pendant 10 min. PPb/PPa, PIM, D_e et ΔD_e sont mesurés avant et tout au long de cette stimulation (voir paragraphe 3.1.4).

A partir des valeurs de R_e mesurées et de R_i calculées, l'épaisseur (h) de la paroi artérielle est calculée. Ceci nous permet de représenter l'évolution de cette épaisseur au cours du cycle lent de pressurisation intraluminale.

Nous avons également calculé plusieurs paramètres largement utilisés dans la littérature tels que :

(1) le module élastique de pression (E_p ; Peterson et coll., 1960) :

$$E_p = (PI_{\max} - PI_{\min}) \times D_{i,\min} / (D_{i,\max} - D_{i,\min}) \quad (\text{dyne/cm}^2)$$

où pour chaque pulsation de pression, PI_{\max} et PI_{\min} sont les pressions intraluminales maximale et minimale, $D_{i,\max}$ et $D_{i,\min}$ sont les diamètres internes correspondants respectivement,

(2) le module élastique incrémental (E_{inc} ; Cox, 1978a),

(3) la tension pariétale moyenne à chaque palier de pression ($T_m = PIM \times R_i/h$) et la variation relative de la tension pariétale pour chaque pulsation de pression :

$$\Delta T\% = [(T_{\max} - T_{\min}) / T_{\min}] \times 100$$

où T_{\max} et T_{\min} sont les tensions pariétales maximale et minimale correspondantes à PI_{\max} et PI_{\min} pour chaque pulsation de pression.

3.1.2.2. Mesure du volume intraluminal

Les variations de volume intraluminal pendant un cycle lent de pressurisation intraluminaire ($n=5$) sont mesurées en appliquant la méthode décrite par Lévy et coll. (1990). Les conditions expérimentales sont similaires à celles déjà décrites. PIM et PPb/PPa sont mesurés en continu comme indiqué précédemment. En parallèle, une bulle d'air (volume inférieur à 0,5 μl) est introduite dans le système au niveau du cathéter de polyéthylène en amont du premier capteur (a). Un déplacement de 1 mm de cette bulle dans le cathéter correspond à la variation d'un volume de 0,58 μl . A chaque palier de PIM, de 25 à 150 mmHg, la position de la bulle est relevée pendant les dix premières secondes et ensuite chaque minute pendant les 5 min que dure chaque palier de PIM. L'augmentation du volume ($\mu\text{l}/\text{mm}$ segment) est représentée en fonction du temps et, comme nous le verrons dans les résultats, comporte deux phases à chacun des paliers de pression. La compliance carotidienne ($\text{nl}/\text{mmHg}/\text{mm}$ segment) est calculée selon la méthode de Lévy et coll. (1990) : le rapport de la variation extrapolée de volume intraluminal sur l'élévation de PIM imposée. L'augmentation de volume est définie comme l'intersection des tangentes de chacune des deux phases de l'augmentation de volume (Lévy et coll., 1990).

3.1.3. Détermination de la $[Ca^{2+}]_i$ et relation pressurisation intraluminale- $[Ca^{2+}]_i$

La fluorescence (F_y) est mesurée à une longueur d'onde de 510 ± 15 nm après excitation aux longueurs d'onde de 340 ± 11 ($F_{y=340}$) et 380 ± 11 nm ($F_{y=380}$). Nous avons étudié la relation entre la $[Ca^{2+}]_i$ et (1) les variations pulsées de pression, (2) l'augmentation de la PIM par palier. Le temps d'alternance entre les deux longueurs d'onde d'excitation, 340 nm et 380 nm, et *vice versa* est de 10 msec dans le premier cas et de 90 msec dans le deuxième. Le segment artériel est soumis à un premier cycle lent de pressurisation intraluminale durant lequel PIM et PPb/PPa sont mesurés en continu. Un spectre d'excitation de 300 à 400 nm est effectué au retour de la PIM à sa valeur basale.

Le segment artériel est ensuite chargé avec le fura-2, par perfusion de la solution de fura-2 AM ($5 \mu\text{M}$, paragraphe 2.2.5.1) pendant 105 min. Après cette charge, la solution de Krebs seule est perfusée pendant 30 min.

Un second spectre d'excitation de 300 à 400 nm est effectué. Le degré de charge est déterminé par l'augmentation de fluorescence mesurée à 340 et 380 nm observée entre le premier et le second spectre d'excitation.

Afin de déterminer si l'autofluorescence varie au cours du temps et si le DMSO, le Pluronic F-127 et le BSA la modifient, le protocole décrit au-dessus est répété, à l'exception de l'omission du fura-2 dans la solution de perfusion, dans des expériences contrôles en respectant le temps ($n=6$).

Le segment artériel chargé est soumis à un cycle lent de pressurisation intraluminale pour étudier la relation entre la $[Ca^{2+}]_i$ et l'augmentation de PIM. La $[Ca^{2+}]_i$ est estimée à chaque palier de pression à partir du rapport de fluorescence $R'_{340/380}$ (Capdeville-Atkinson et coll., 1993) ; elle est aussi calculée (en nM) grâce à la formule de Grynkiewicz et coll. (1985) modifiée par Scanlon et coll. (1987), avec une valeur de K_d de 224 nM (Grynkiewicz et coll., 1985). R'_{\max} est déterminé par perfusion du segment pendant 7 min environ avec une solution de Krebs contenant $2 \mu\text{M}$ d'ionomycine et 4 mM de calcium jusqu'à l'obtention d'une fluorescence maximale. Les variations concomitantes de R' , PPb/PPa et PIM sont également utilisées pour l'évaluation de la relation entre le niveau intracellulaire de Ca^{2+} et la capacité d'amortissement artériel (voir paragraphe 3.1.4). R'_{\min} est déterminé par perfusion et superfusion du segment pendant 12 min environ par une solution de Krebs dépourvue de Ca^{2+} et contenant 5 mM d'EGTA et $2 \mu\text{M}$ d'ionomycine, jusqu'à l'obtention d'une fluorescence minimale. Les valeurs de PPb/PPa et PIM correspondantes sont aussi utilisées pour évaluer la relation entre la $[Ca^{2+}]_i$ et la capacité d'amortissement (voir paragraphe 3.1.5). Après la détermination de R'_{\max} et R'_{\min} , une seconde estimation de l'autofluorescence est obtenue par perfusion du segment par une solution de Krebs dépourvue de Ca^{2+} et contenant 1 mM de $MnCl_2$ et $2 \mu\text{M}$ d'ionomycine, pendant 2 min.

3.1.4. Effets de l'activation des cellules musculaires lisses sur $[Ca^{2+}]_i$ et PPb/PPa

Les effets de l'activation des cellules musculaires lisses ont été étudiés de trois façons dans différentes expériences.

Premièrement, comme cité précédemment lors de la calibration de fluorescence, les variations de $[Ca^{2+}]_i$ et de PPb/PPa sont évaluées à la suite de la stimulation artérielle, à PIM basale, par l'ionophore du Ca^{2+} , l'ionomycine.

Deuxièmement, les segments artériels sont stimulés, avant et après la charge du fura-2, par la noradrénaline (NA, tartrate, Merck, Darmstadt, Allemagne) à PIM basale. La NA (10 μ M) est superfusée pendant 10 min. Les variations induites par cette stimulation sont évaluées par le calcul du pourcentage de variation relative

$$(1) \text{ du rapport } R' (= F'_{340} / F'_{380}) \text{ soit } \Delta R'\% = [(R'_{NA} - R'_{basal}) / R'_{basal}] \times 100,$$

$$(2) \text{ de PPb/PPa soit } \Delta PPb/PPa\% = [PPb/PPa_{NA} - PPb/PPa_{basal}] / PPb/PPa_{basal} \times 100.$$

Troisièmement, dans les expériences de mesure du diamètre artériel (paragraphe 3.1.2.1), à la suite du cycle lent de pressurisation intraluminale, certains segments (n=4 sur 17) sont stimulés à une PIM basale par superfusion de NA (10 μ M) pendant 10 min. PPb/PPa, PIM, D_e et ΔD_e sont mesurés avant et tout au long de cette stimulation.

3.1.5. Effets de l'inactivation des cellules musculaires lisses sur $[Ca^{2+}]_i$ et PPb/PPa

Les effets de l'inactivation des cellules musculaires lisses ont été évalués de trois façons dans des expériences différentes.

Premièrement, comme cité précédemment lors de la calibration de fluorescence, les variations de $[Ca^{2+}]_i$ et de PPb/PPa sont mesurées en présence d'un chélateur du Ca^{2+} , l'EGTA, à PIM basale.

Deuxièmement, les variations de PPb/PPa sont mesurées sur un segment fixé par du formol. Après un premier cycle lent de pressurisation intraluminale, la superfusion de Krebs est remplacée par une solution saline tamponnée de 10% (v/v) de formol (NaCl 120 mM, KCl 2,7 mM dans un tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 à 37°C) pendant 90 min. Après cette fixation, les segments sont soumis à un deuxième cycle lent de pressurisation intraluminale toujours en présence de la solution de formol. A titre de comparaison, dans une expérience séparée, le segment carotidien est remplacé par un cathéter de polyéthylène rigide (0,58 mm diamètre interne et 0,96 mm diamètre externe ; Jencons, Leighton Buzzard, Bedfordshire, Royaume-Uni) de même longueur que le segment artériel. Des cycles lents de pressurisation par augmentation de la PIM sont réalisés comme précédemment décrit.

Troisièmement, l'inactivation des cellules musculaires lisses est induite par l'association cyanure de potassium et dinitrophénol. Le protocole est similaire à celui décrit pour la fixation par le formol à l'exception de deux points : (1) une solution de Krebs dépourvue de Ca^{2+} et de

glucose mais contenant du cyanure de potassium (160 mg/l, Prolabo, Paris, France) et du dinitrophénol (36,8 mg/l, Fluka Chemie AG, Buchs, Suisse) est superfusée en remplacement de la solution de formol, et (2) cette solution inhibitrice est présente aussi bien intra- qu'ab-luminalement. Une telle solution doit produire une inhibition complète du métabolisme de la cellule musculaire lisse (Lévy et coll., 1990).

3.1.6. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-standard à la moyenne ($m \pm esm$). Les différentes moyennes ont été comparées à l'aide du test t de Student pour séries appariées ou d'une analyse de variance ANOVA, associée au test de comparaison multiple de Scheffé. L'hypothèse nulle est rejetée à un niveau de probabilité $P < 0,05$.

3.2. Résultats

3.2.1. Cycles rapides de pressurisation intraluminale

A la suite du troisième cycle rapide de pressurisation intraluminale, PPb/PPa devient stable (Figure 2.9). La valeur initiale de PPb/PPa, de $0,618 \pm 0,033$, diminue jusqu'à $0,340 \pm 0,019$ après le cinquième cycle rapide. La PIM reste stable : sa valeur initiale est de $17,7 \pm 1,5$ mmHg et celle obtenue après le cinquième cycle rapide de pressurisation de $18,7 \pm 1,1$ mmHg ($P > 0,05$) (Figure 2.9 ; Tableau 5.5 en annexe).

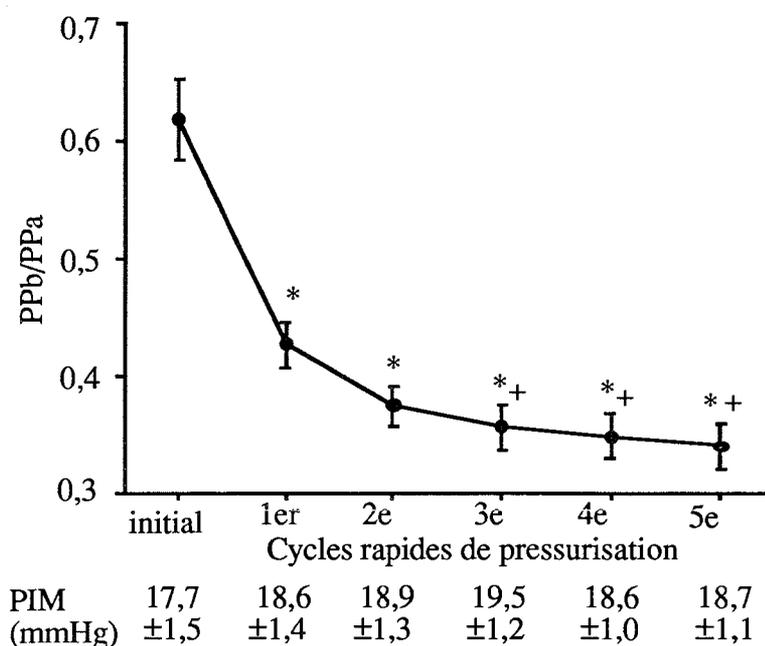


Figure 2.9. Indice de capacité d'amortissement artériel (PPb/PPa) avant et à la suite de 5 cycles rapides de pressurisation intraluminale. Les valeurs de pression intraluminale moyenne (PIM) correspondantes sont indiquées. (*) $P < 0,05$ par rapport à la valeur initiale, (+) par rapport à la valeur après le premier cycle.

3.2.2. Cycles lents de pressurisation intraluminale et reproductibilité de la mesure

Un enregistrement représentatif des variations de pression mesurées par le capteur de pression "a" et par le capteur de pression "b" (amplitudes de pression à chaque pulsation de pression PPa et PPb, respectivement) au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale est montré sur la Figure 2.10. A des valeurs de PIM supérieures ou égales à 100 mmHg, l'amplitude PPb est similaire à celle de PPa. A des valeurs plus faibles, l'amplitude PPb est nettement inférieure à celle de PPa. Ce phénomène est également illustré sur la Figure 2.11 qui représente les profils des signaux de pression enregistrés par les deux capteurs de pression à 25 et à 150 mmHg. Le rapport des amplitudes, PPb/PPa, déterminant l'indice d'amortissement artériel, est faible aux PIMs basses et indique une capacité d'amortissement maximale. PPb/PPa augmente pour des PIMs plus élevées (> 50 mmHg) et atteint une valeur non significativement différente de 1 à des PIMs supérieures ou égales à 100 mmHg. La plus grande variation de PPb/PPa s'observe lors de l'augmentation de la PIM de 75 à 100 mmHg (Figure 2.10 et Tableau 5.6 en annexe).

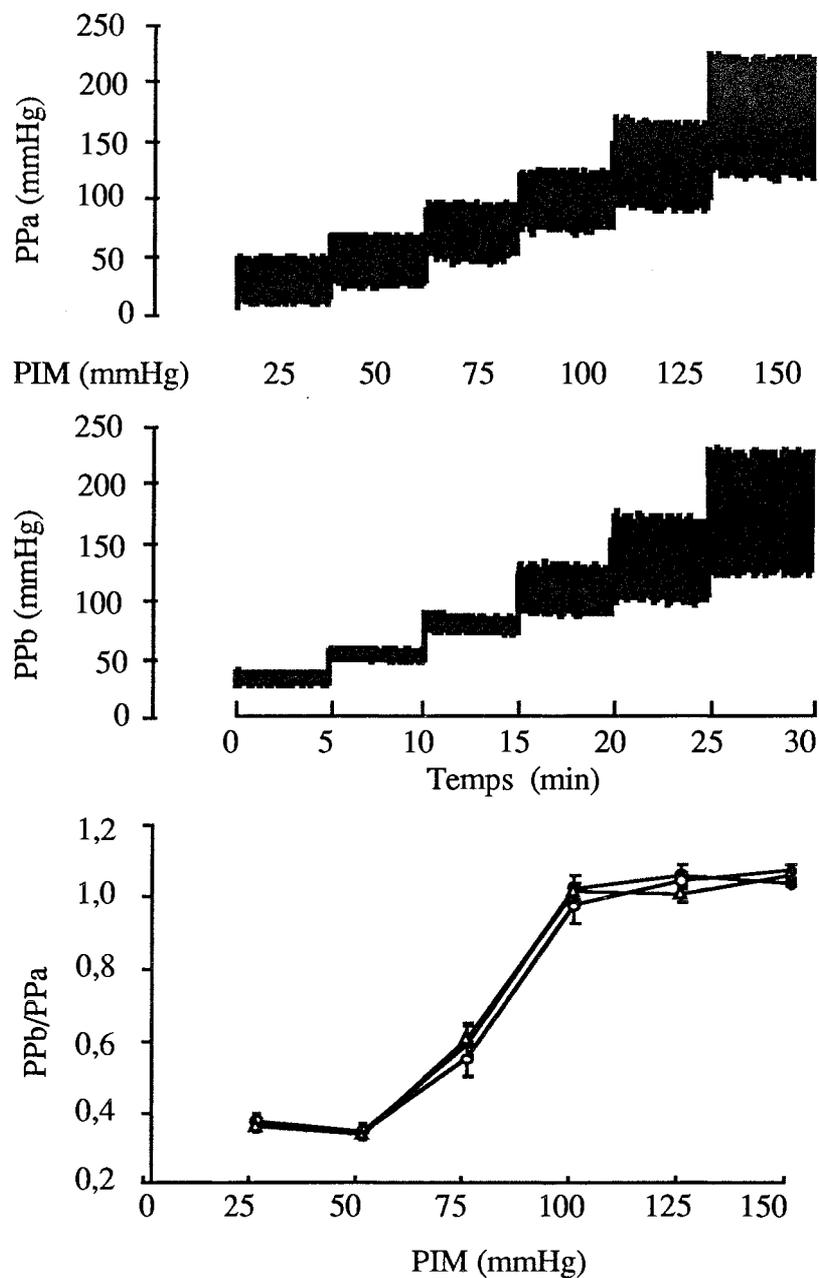


Figure 2.10. Enregistrements représentatifs des signaux de pression mesurés par les deux capteurs "a" et "b" (haut et milieu) durant un cycle lent de pressurisation intraluminale. La partie inférieure représente la moyenne des résultats (n=5) de la capacité d'amortissement artériel (PPb/PPa) durant 3 cycles consécutifs de pressurisation intraluminale ● : premier, ○ : deuxième, et ▲ : troisième.

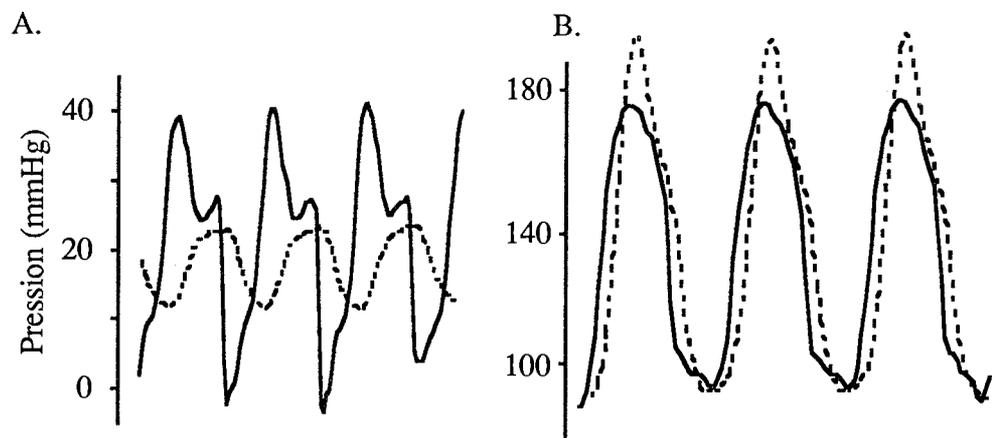


Figure 2.11. Profils des pulsations de pression enregistrées par les deux capteurs de pression "a" (avant le segment carotidien, trait continu) et "b" (après le segment carotidien, trait pointillé) à 25 mmHg (A) et 150 mmHg (B)

Les valeurs de PPb/PPa ne sont pas significativement différentes entre trois cycles consécutifs de pressurisation intraluminale (Figure 2.10 ; Tableau 5.6 en annexe). De plus, les valeurs de PIM, PPa, PPb et PPb/PPa restent stables tout au long des 5 min de chacun des paliers de pression (Figure 2.12 ; Tableau 5.7 en annexe).

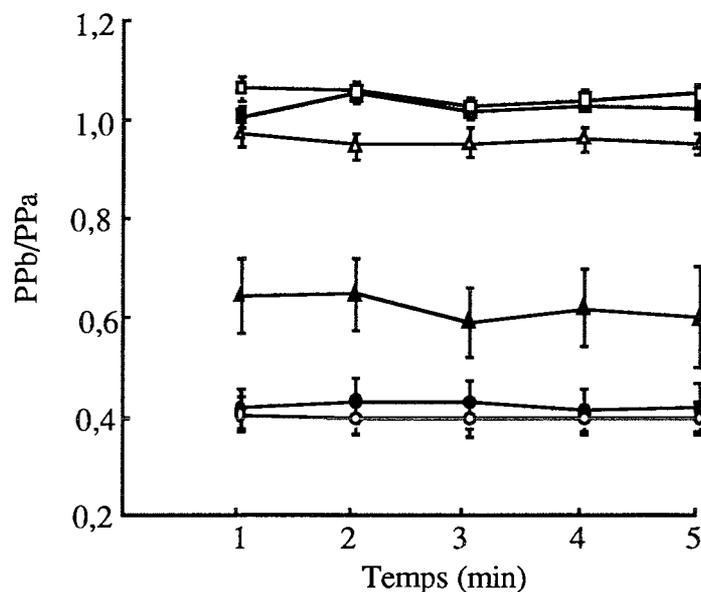


Figure 2.12. Stabilité de PPb/PPa durant chaque palier de pression de 5 min au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale (n=10) : à 25 mmHg (●), 50 mmHg (○), 75 mmHg (▲), 100 mmHg (△), 125 mmHg (■) et 150 mmHg (□).

Les rapports PF/PS du segment carotidien gauche ($0,303 \pm 0,017$, n=9) soumis aux cycles de pressurisation intraluminale ne sont pas significativement différents de ceux du segment carotidien droit ($0,292 \pm 0,022$, n=9) non soumis à ces cycles.

3.2.3. Relation diamètre externe-PPb/PPa

La lente pressurisation intraluminale du segment carotidien induit, d'une part, une augmentation du diamètre externe (D_e), forte aux faibles PIMs et de plus en plus faible à partir de 100 mmHg (Figure 2.13 haut et Tableau 5.8 en annexe), et, d'autre part, une diminution simultanée de ΔD_e (Figure 2.14 haut et Tableau 5.9 en annexe). Ces valeurs de D_e et ΔD_e sont stables au cours de chaque palier de pression (résultats non présentés). De plus, durant un cycle de pressurisation, l'épaisseur de la paroi artérielle diminue fortement jusqu'à 75 mmHg, puis plus faiblement et est finalement stable à 150 mmHg (Figure 2.14 bas ; Tableau 5.9 en annexe).

La compliance carotidienne calculée à partir des valeurs de D_i est maximale aux faibles PIMs et minimale à partir de 100 mmHg (Figure 2.13 bas ; Tableau 5.8 en annexe).

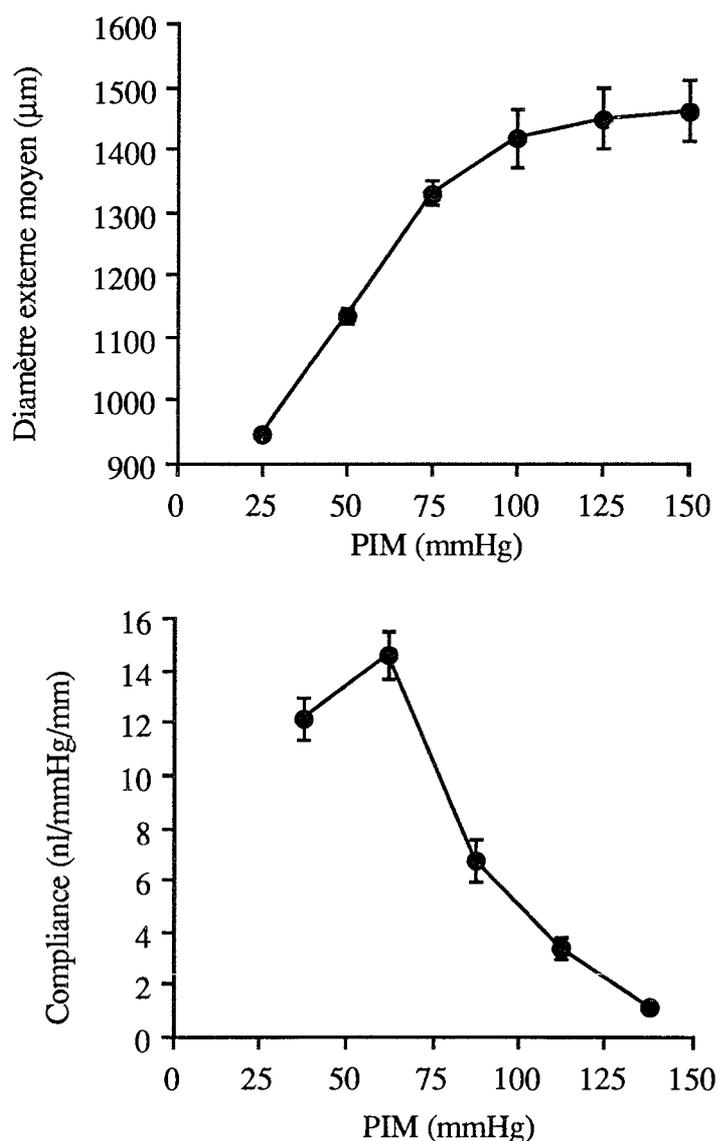


Figure 2.13. Variations du diamètre externe (D_e , haut) et de la compliance artérielle correspondante (bas), durant un cycle lent de pressurisation intraluminale (n=17).

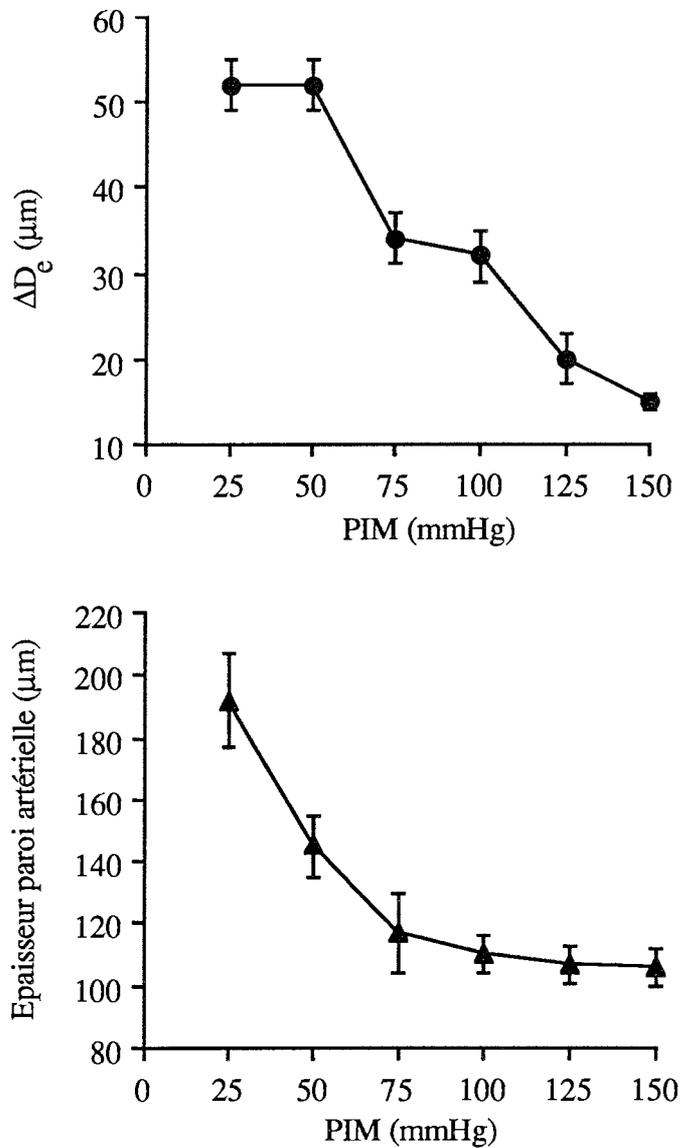


Figure 2.14. Evolution de la variation relative du diamètre externe ($\Delta D_e\%$, haut) et de l'épaisseur de la paroi artérielle (bas) durant un cycle lent de pressurisation intraluminale (n=17).

Le module élastique de pression s'accroît au cours du cycle de pressurisation intraluminale, de façon plus importante aux PIMs élevées (Figure 2.15 ; Tableau 5.10 en annexe). De 25 à 75 mmHg, E_p passe de $1,2 \pm 0,1 \times 10^5$ à $7,3 \pm 1,2 \times 10^5$ dynes/cm², tandis qu'à 150 mmHg il est de $64,4 \pm 5,8 \times 10^5$ dynes/cm².

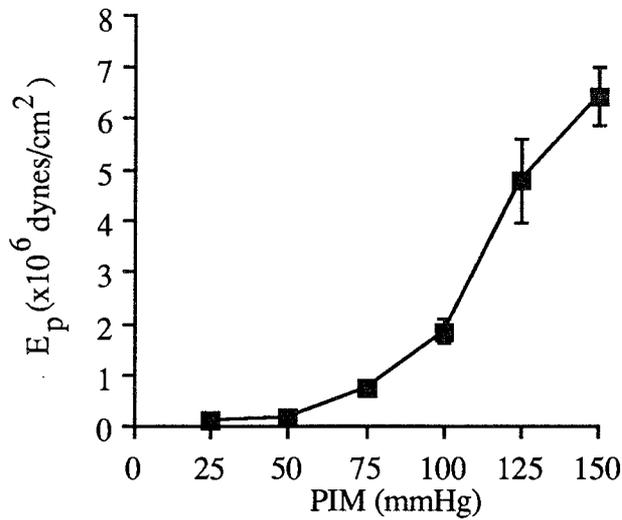


Figure 2.15. Relation entre le module élastique de pression (E_p) et la pression intraluminale moyenne (PIM) au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale.

La tension pariétale moyenne (T_m) s'élève continuellement au cours d'un cycle de pressurisation intraluminale et ceci de façon linéaire à partir de 50 mmHg (Figure 2.16 ; Tableau 5.11 en annexe). La variation relative de la tension pariétale pour chaque pulsation de pression ($\Delta T\%$) est élevée à 25 mmHg ($195 \pm 12\%$), mais à partir de 50 mmHg reste dans un domaine de valeurs de 34-52% avec un minimum égal à $34 \pm 2\%$ à 75 mmHg (Figure 2.16 ; Tableau 5.11 en annexe).

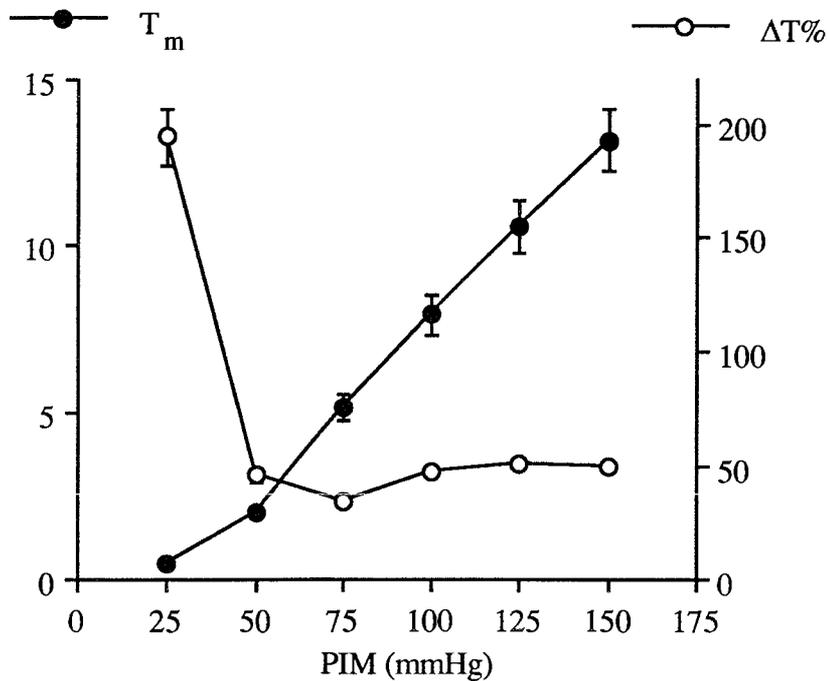


Figure 2.16. Relation entre la tension pariétale moyenne (T_m , $\times 10^5$ dynes/cm²) et la variation relative de la tension pariétale à chaque pulsation de pression ($\Delta T\%$) avec la pression intraluminale moyenne (PIM) au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale.

3.2.4. Relation volume intraluminal-PPb/PPa

La Figure 2.17 (haut) représente l'augmentation du volume intraluminal dans le segment carotidien au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminaire (Tableau 5.12 en annexe). Il est à noter que l'augmentation de ce volume pour chaque palier de pression comporte deux phases : une forte augmentation initiale suivie d'une augmentation progressive linéaire.

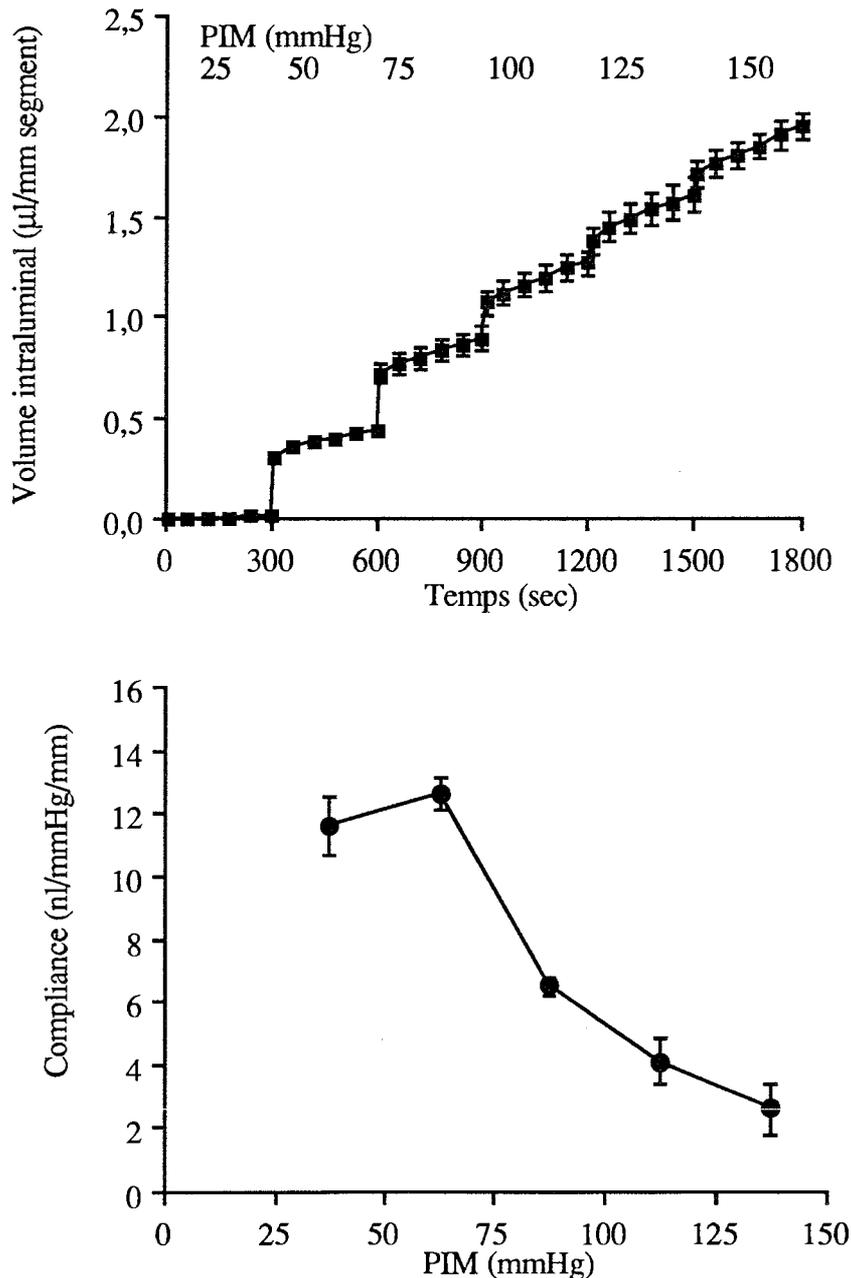


Figure 2.17. Variations du volume intraluminal dans l'artère carotide (haut) et de la compliance correspondante (bas) durant un cycle lent de pressurisation intraluminaire (n=5).

La variation maximale de volume dans la phase initiale apparaît à de basses PIMs. A partir de 100 mmHg, cette phase initiale est beaucoup plus faible ; elle est suivie d'une augmentation de volume plus importante qu'aux faibles PIMs lors de la deuxième phase. A la fin des 5 min du plateau à 150 mmHg, le volume est de $1,94 \pm 0,07$ $\mu\text{l}/\text{mm}$ de segment. Lors du retour de la PIM à sa valeur basale (25 mmHg), le volume intraluminal s'abaisse, mais la bulle ne retrouve pas sa position initiale indiquant un volume de $+0,94 \pm 0,11$ $\mu\text{l}/\text{mm}$ segment par rapport au départ.

La compliance carotidienne, basée essentiellement sur la phase initiale, est maximale aux faibles PIMs ; à partir de 100 mmHg, elle est significativement réduite (Figure 2.17 bas ; Tableau 5.12 en annexe).

L'évolution de cette compliance carotidienne au cours du cycle lent de pressurisation intraluminale est similaire à celle observée à partir de la mesure du diamètre.

Le Tableau 2.1 montre une corrélation linéaire significative entre les valeurs de l'indice PPb/PPa et celles de ΔD_e et de compliance calculées auparavant.

Tableau 2.1. Relations entre PPb/PPa et ΔD_e (n=17) et la compliance calculée à partir du volume intraluminal évalué par le déplacement d'une bulle (n=5) ou par les variations de diamètre externe (n=17).

Paramètres	Pente	Abscisse à l'origine	Corrélation (r)
ΔD_e	$46,2 \pm 4,6$	$66,2 \pm 4,9$	$0,92 \pm 0,02$ ($P < 0,05$)
Compliance (méthode bulle)	$-15,0 \pm 0,5$	$19,8 \pm 0,2$	$0,95 \pm 0,02$ ($P < 0,05$)
Compliance (méthode diamètre)	$-17,0 \pm 1,0$	$19,4 \pm 1,2$	$0,95 \pm 0,01$ ($P < 0,05$)

3.2.5. Relation pressurisation intraluminale et $[\text{Ca}^{2+}]_i$

La Figure 2.18 représente les spectres d'excitation de l'artère carotide effectués avant la charge de la sonde et après cette dernière suivie de la période d'hydrolyse. Le degré de charge du fura-2, déterminé par le rapport des fluorescences avant et après la période de charge, à 340 et à 380 nm, est de $3,88 \pm 0,62$ et $2,42 \pm 0,39$ (n=7), respectivement. Dans les expériences contrôles où le fura-2 AM avait été omis dans la solution de perfusion de charge, ces rapports sont de $1,15 \pm 0,04$ à 340 nm et $1,12 \pm 0,03$ à 380 nm (n=6). En fin d'expérience, le rapport $R'_{\text{max}}/R'_{\text{min}}$ est de $8,53 \pm 0,56$ et B' de $1,18 \pm 0,56$ pour les artères chargées (n=7).

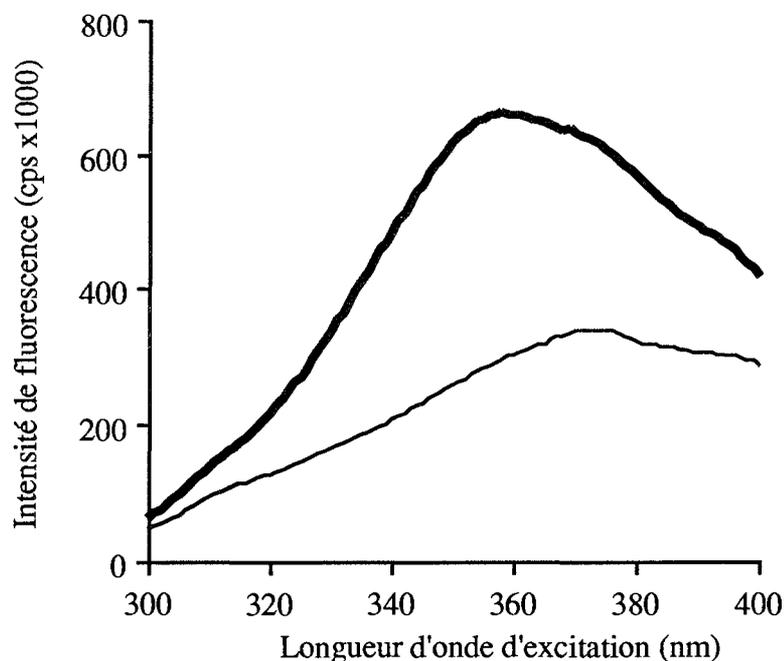


Figure 2.18. Spectres d'excitation de l'artère carotide avant l'incorporation du fura-2 AM (=autofluorescence, trait fin), et après la charge et la période d'hydrolyse (trait épais).

La perfusion de la solution de charge avec ou sans fura-2 AM ne modifie pas la capacité d'amortissement du segment artériel (Figure 2.19A ; Tableau 5.13 en annexe). La $[Ca^{2+}]_i$ de base est de 98 ± 5 nM ($n=7$) à PIM basale. La $[Ca^{2+}]_i$ diminue progressivement au cours du cycle lent de pressurisation intraluminale jusqu'à une valeur de 37 ± 11 nM à 150 mmHg (Figure 2.19B ; Tableau 5.14 en annexe).

La $[Ca^{2+}]_i$ reste stable durant chaque palier de pression. Aucune variation de $[Ca^{2+}]_i$ de type oscillatoire, qui pourrait être concomitante des variations de pression de chaque pulsation, n'a été observée, quelle que soit la rapidité d'alternance d'excitation entre 340 et 380 nm.

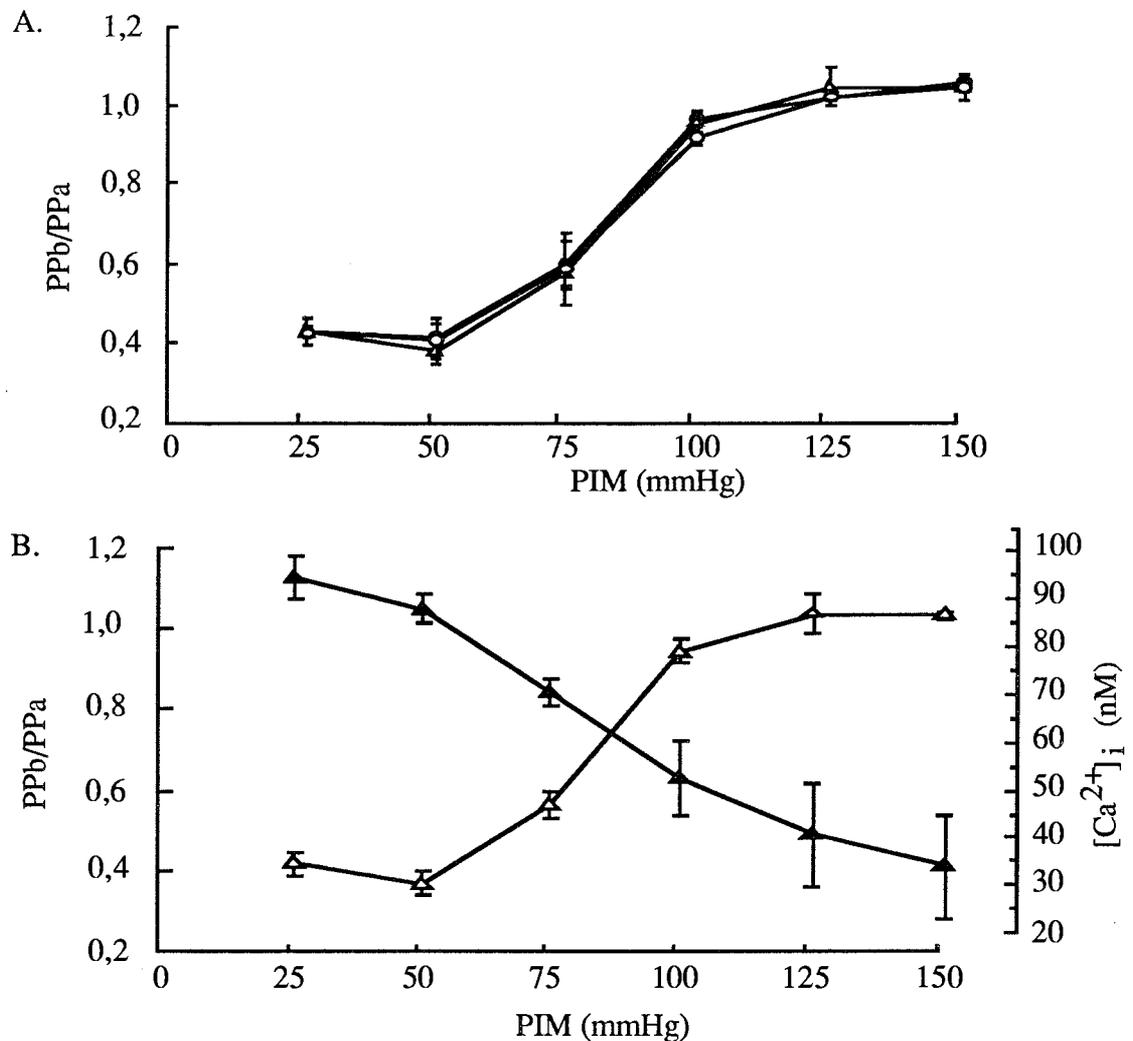


Figure 2.19. **A** : PPb/PPa au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminaire avant (●, n=14) et après perfusion de la solution de charge contenant (▲, n=7) ou non (○, n=6) le fura-2 AM. **B** : Effets d'un cycle lent de pressurisation intraluminaire sur PPb/PPa (▲) et [Ca²⁺]_i (▲) (n=7).

3.2.6. Effets de l'activation des cellules musculaires lisses sur [Ca²⁺]_i et PPb/PPa

3.2.6.1. Effets de l'ionomycine

L'ionomycine induit une élévation de la fluorescence à 340 nm (F₃₄₀) et une diminution de la fluorescence à 380 nm (F₃₈₀), indiquant une augmentation importante du taux de Ca²⁺ cytosolique (Figure 2.20, IM/+Ca). Parallèlement, PPb/PPa s'accroît tandis que la PIM reste inchangée, indiquant une diminution de la capacité d'amortissement du signal de pression (Figure 2.20, IM/+Ca).

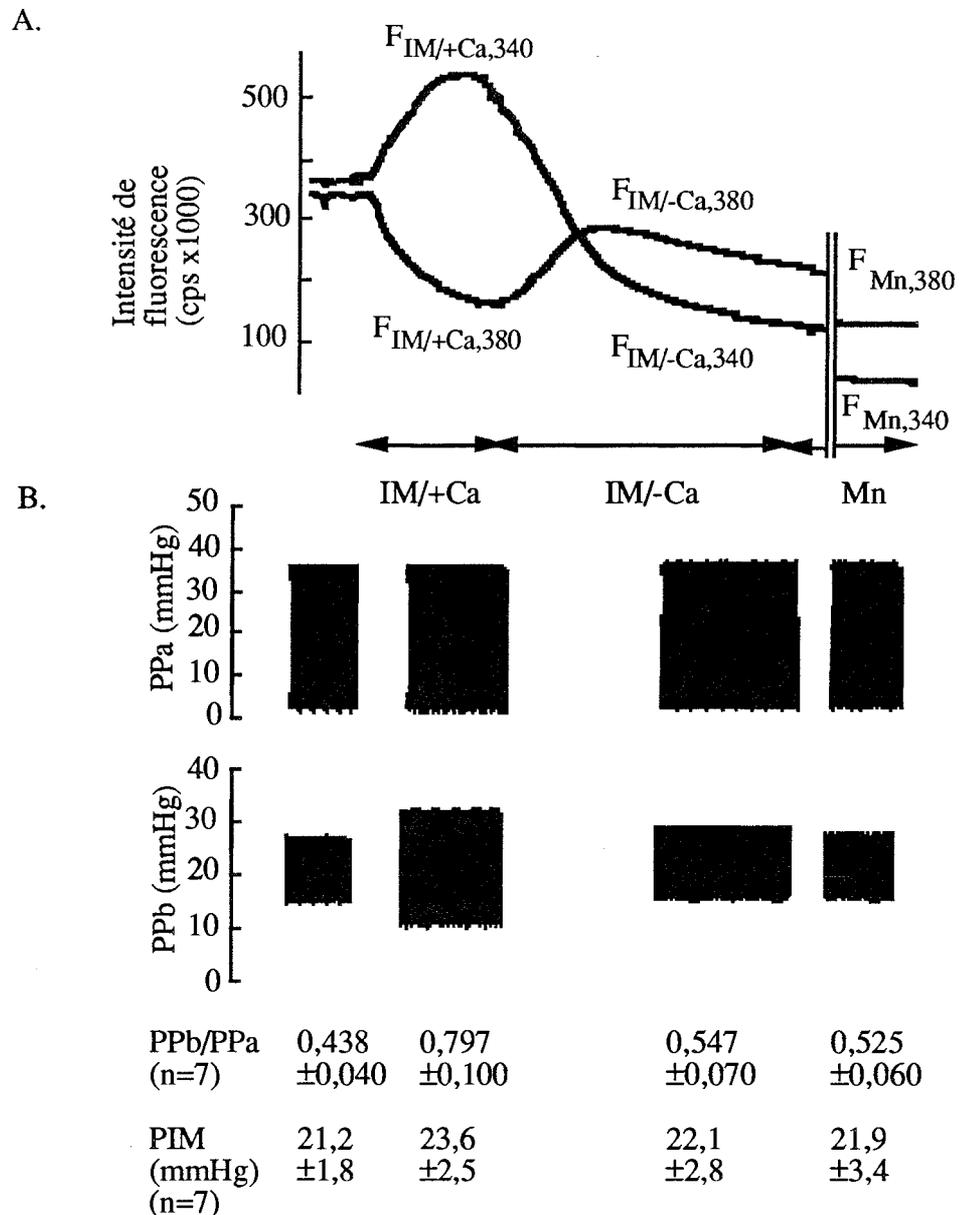


Figure 2.20. **A** : Signaux fluorescents à 340 (F_{340}) et 380 nm (F_{380}), et **B** : Signaux de pression enregistrés par les deux capteurs de pression "a" et "b", au cours du protocole de calibration de la fluorescence. Effets d'un ionophore du Ca^{2+} , l'ionomycine (IM/+Ca), suivi d'un chélateur du Ca^{2+} , l'EGTA (IM/-Ca) et finalement de la solution de *quenching* (Mn).

3.2.6.2. Effets de la noradrénaline

La superfusion de NA (10 μ M) du segment artériel non chargé augmente significativement PPb/PPa de $42 \pm 5\%$. Parallèlement, l'auto fluorescence est inchangée. Cette majoration de PPb/PPa est similaire dans le segment chargé ou non.

Sur segment artériel chargé, la valeur basale de $[Ca^{2+}]_i$ est de 82 ± 15 nM (n=6). La NA induit une élévation de F_{340} et une diminution simultanée de F_{380} , résultant en un accroissement de $R'_{340/380}$ de $24 \pm 5\%$ et de $[Ca^{2+}]_i$ de $74 \pm 15\%$ (Figure 2.21). PPb/PPa s'élève de $42 \pm 11\%$,

tandis que la PIM n'est pas modifiée (Figure 2.21). Le retrait de la NA entraîne un retour de PPb/PPa et de la $[Ca^{2+}]_i$ à leurs valeurs basales.

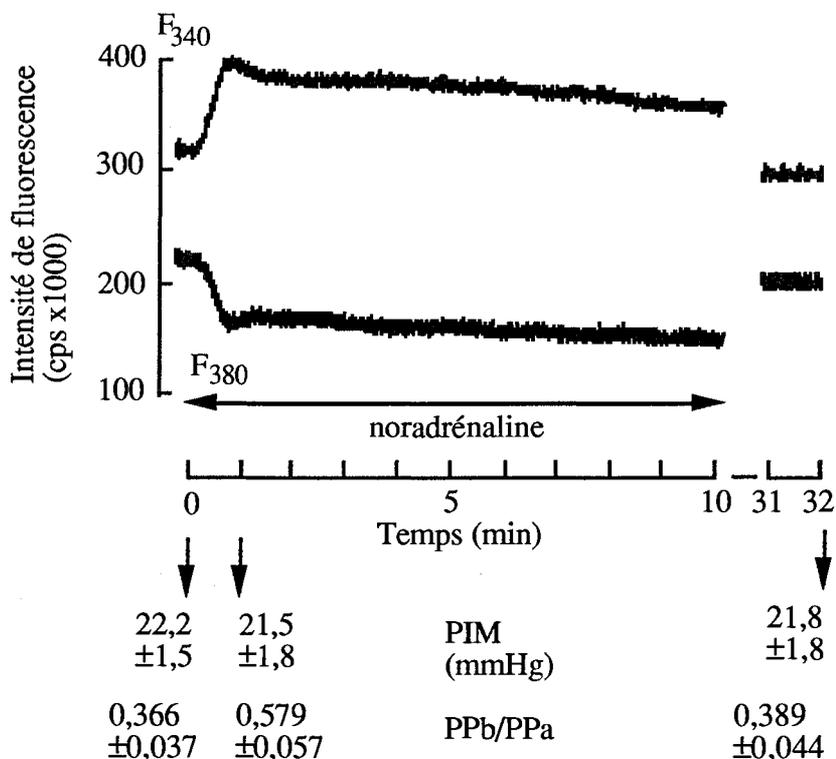


Figure 2.21. Enregistrement représentatif des effets de la superfusion de noradrénaline (10 μ M) sur les signaux fluorescents à 340 (F₃₄₀) et 380 nm (F₃₈₀). Les valeurs moyennes de PIM et PPb/PPa sont également indiquées (n=6).

Dans les expériences de mesure du diamètre externe (D_e), la superfusion de NA (10 μ M) augmente comme précédemment PPb/PPa ($0,478 \pm 0,045$ par rapport à sa valeur basale $0,389 \pm 0,031$, n=4, P=0,01, test t de Student pour séries appariées) sans variation de PIM (16 ± 2 par rapport à 17 ± 2 mmHg, P>0,05). La stimulation par la NA ne modifie pas significativement le D_e , mais tend à diminuer ΔD_e ($53,6 \pm 3,4$ par rapport à $49,6 \pm 3,9$ μ m, P>0,05).

3.2.7. Effets de l'inactivation des cellules musculaires lisses sur $[Ca^{2+}]_i$ et PPb/PPa

3.2.7.1. Effets de l'EGTA

L'inactivation des cellules musculaires lisses par le retrait du Ca^{2+} extracellulaire et la présence d'EGTA abaisse F₃₄₀ et accroît F₃₈₀ indiquant une diminution du Ca^{2+} cytosolique (Figure 2.20, IM/-Ca). Ceci est associé à une diminution de PPb/PPa, annulant les effets préalables de l'ionomycine, tandis que la PIM n'est pas modifiée (Figure 2.20). Le manganèse (Figure 2.20, Mn) réduit légèrement les deux signaux de fluorescence F₃₄₀ et F₃₈₀, sans modification supplémentaire de PPb/PPa.

3.2.7.2. Effets de la fixation au formol

La superfusion de la solution fixatrice de formol élève progressivement PPb/PPa sans modifier la PIM (Figure 2.22 ; Tableau 5.15 en annexe). L'effet de la fixation se manifeste rapidement dès la première minute et après 90 min, PPb/PPa n'est plus significativement différent de 1. En effet, après fixation, PPb et PPa sont similaires, et ceci est également vrai tout au long d'un cycle lent de pressurisation intraluminale où PPb/PPa reste approximativement égal à 1 (Figure 2.23 ; Tableau 5.16 en annexe).

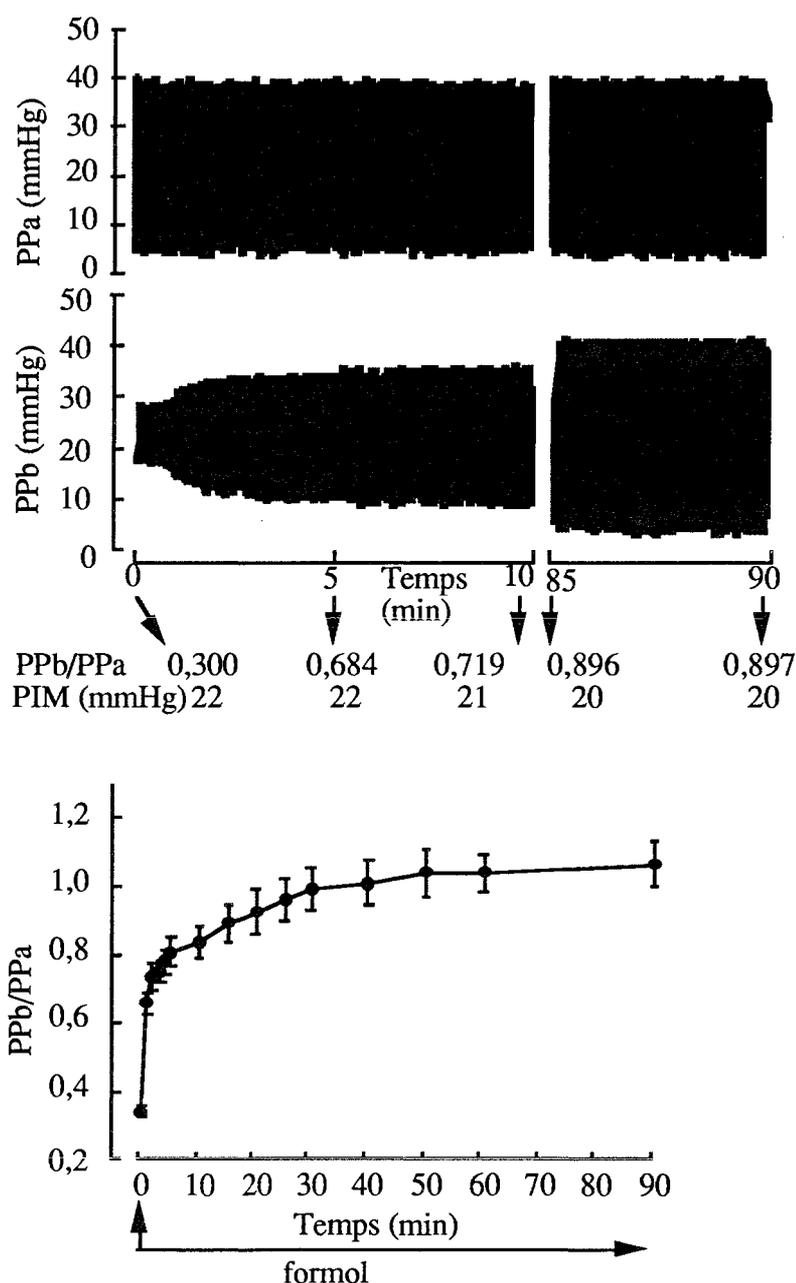


Figure 2.22. Enregistrement typique des signaux de pression détectés par les deux capteurs de pression "a" et "b" lors de 90 min de fixation au formol du segment carotidien carotidien (haut). Valeurs moyennes de PPb/PPa correspondantes, pour 4 segments carotidiens (bas).

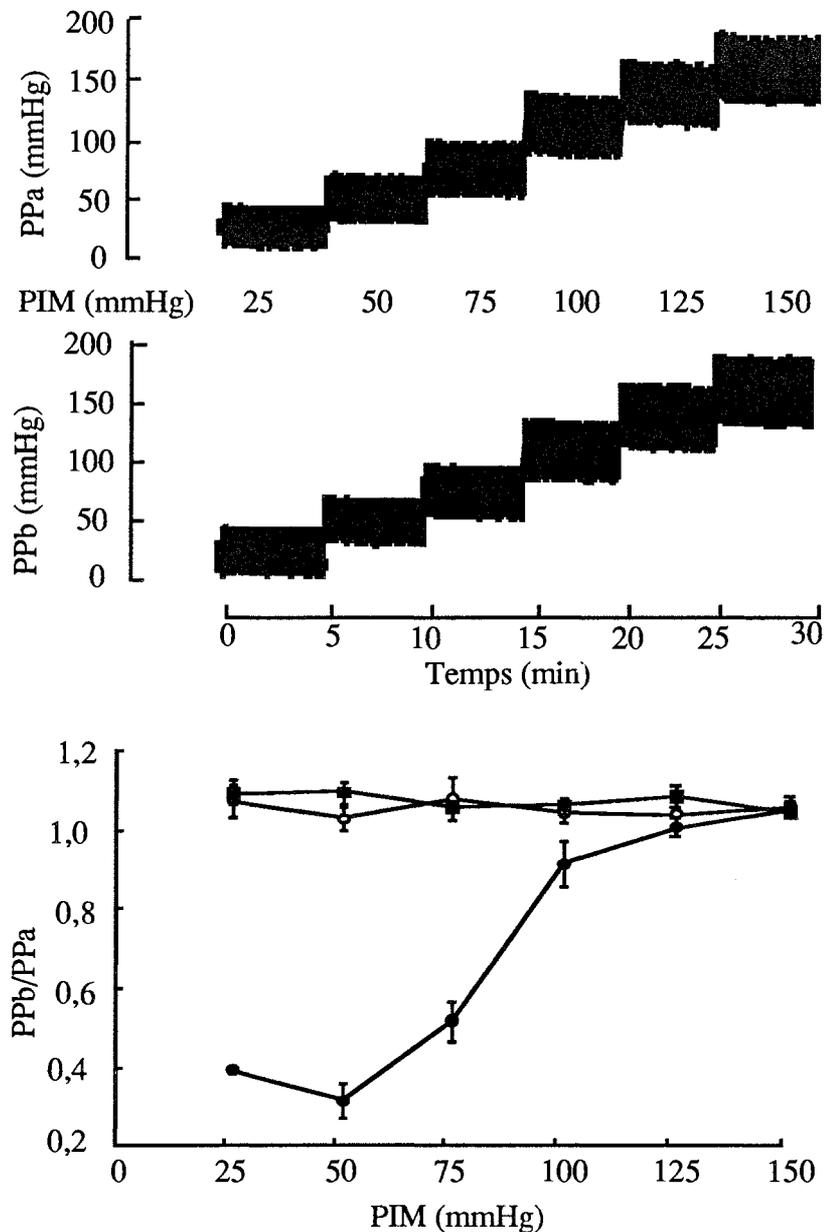


Figure 2.23. Enregistrement typique des signaux de pression par les deux capteurs de pression "a" et "b" au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale (haut). Effets d'un cycle lent de pressurisation intraluminale sur PPb/PPa avant (●, n=4) et après (○, n=4) fixation au formol du segment carotidien, et dans le cas où le segment est remplacé par un cathéter rigide (■, n=7) (bas).

Lorsque le segment carotidien est remplacé par un cathéter rigide de même longueur, PPb et PPa sont similaires à toutes les PIMs ; PPb/PPa est ainsi non significativement différent de 1 à tous les paliers de pression d'un cycle lent de pressurisation intraluminale (Figure 2.23).

3.2.7.3. Effets du cyanure de potassium plus dinitrophénol

Les perfusion et superfusion du segment carotidien avec la solution de cyanure de potassium et de dinitrophénol n'ont pas d'effet significatif sur PPb/PPa à sa valeur basale, ni sur son évolution au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale. Les valeurs de PPb/PPa à 25 et 150 mmHg sont respectivement de $0,380 \pm 0,023$ et $1,078 \pm 0,052$.

4. Discussion

Ce Chapitre décrit une nouvelle méthode de mesure simultanée des variations de $[Ca^{2+}]_i$ et de compliance artérielle de l'artère carotide. Ainsi, par une telle méthode il est possible d'évaluer l'importance des variations de $[Ca^{2+}]_i$ sur la régulation de la compliance artérielle.

La méthodologie de mesure de la $[Ca^{2+}]_i$ sur l'artère carotide est basée sur celle développée pour l'artère caudale dont la validation a déjà été publiée en détail (Capdeville-Atkinson et coll., 1993). L'application de cette méthodologie nous a amené à adapter quelques paramètres tels que les durées de charge (105 min au lieu de 90 min) et d'hydrolyse (30 min au lieu de 20 min) afin d'obtenir des signaux fluorescents de base stables et maximaux. Le Tableau 2.2 permet de comparer les critères de succès de la méthode sur l'artère caudale (Capdeville-Atkinson et coll., 1993) et l'artère carotide (présente étude).

Tableau 2.2. Critères de succès de l'utilisation du fura-2 comme indicateur de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les artères caudale et carotide de rat.

<u>Critère</u>	<u>Artère caudale</u> (Capdeville-Atkinson et coll., 1993)	<u>Artère carotide</u> (présente étude)
<u>Efficacité de charge :</u>		
F ₃₄₀ /AF ₃₄₀	2,4±0,2	3,9±0,6
F ₃₈₀ /AF ₃₈₀	2,0±0,3	2,4±0,4
<u>Importance des métabolites du fura-2 insensibles au calcium :</u>		
AF ₃₄₀ /F _{Mn,340}	1,06	1,11
AF ₃₈₀ /F _{Mn,380}	1,06	1,13
<u>Efficacité de charge et sensibilité intracellulaire :</u>		
R' _{max} /R' _{min}	8,4±0,6	8,5±0,6
<u>Sensibilité à la noradrénaline (10 µM) :</u>		
basal $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	72±5	82±15
ΔR' %	25±3*	24±5
(*résultat personnel, n=8)		

Les critères retenus sont similaires dans les deux artères ; par conséquent, la méthodologie est tout à fait applicable à l'artère carotide. Ces différents critères sont (1) l'efficacité de charge déterminée par le rapport des fluorescences avant / après la charge du fura-2 (F_y/AF_y), (2) l'importance des métabolites du fura-2 insensibles au calcium déterminée par le rapport de la fluorescence avant l'incorporation du fura-2 à celle mesurée en fin d'expérience après perfusion de Mn ($AF_y/F_{Mn,y}$), (3) la sensibilité intracellulaire par le calcul du rapport R'_{max}/R'_{min} , et (4) la sensibilité à la noradréline par mesure des variations de fluorescence ($\Delta R'\%$) (Tableau 2.2).

Pour l'estimation de l'élasticité artérielle, les difficultés sont apparues lors de tentatives d'appliquer des techniques déjà publiées de mesure de la compliance artérielle (faisant intervenir des contraintes essentiellement circonférentielles) plutôt que celles utilisées pour des mesures de résistance (faisant intervenir des forces radiales). En effet, les méthodes actuellement disponibles pour la mesure *in vitro* de la compliance artérielle sur des segments artériels entiers sont incompatibles avec la technique de fluorescence utilisée pour la mesure de $[Ca^{2+}]_i$. Comme mentionné dans le Chapitre I, ces méthodes utilisent soit des techniques électriques, optiques ou ultrasoniques qui impliquent la présence d'un appareillage de mesure à proximité de la paroi artérielle, ce qui est incompatible avec l'utilisation des faisceaux fluorescents dans la technique de mesure de $[Ca^{2+}]_i$. Nous avons donc été amené à développer une méthode simple de mesure de l'élasticité artérielle basée sur la capacité de la paroi artérielle à amortir les pulsations d'un signal de pression. Un nouvel index de compliance, PPb/PPa, a ainsi été défini. Cette méthode a été validée par comparaison avec celles de mesure du diamètre externe ou du volume intraluminal. Nous avons ainsi observé une excellente corrélation entre les valeurs de compliance correspondantes et celles de PPb/PPa (Tableau 2.1).

Dans une préparation cylindrique comme la nôtre, les variations de contrainte imposées par celles de pression peuvent théoriquement induire des déformations dans les trois directions : circonférentielle, radiale et longitudinale. Cette dernière a été minimisée en restaurant au segment carotidien sa longueur *in vivo* et en la maintenant par la fixation des deux extrémités. En effet, plusieurs auteurs ont montré que ce non respect de longueur pouvait entraîner des variations dans le comportement élastique de l'artère (Bergel, 1961b ; Dobrin et Doyle, 1970 ; Lewis et coll., 1991). *In vivo*, les variations dans la direction longitudinale au cours du cycle cardiaque sont négligeables (Dobrin, 1978). Pendant le prélèvement du segment artériel, nous n'avons maintenu ni la pression intraluminal physiologique, ni la longueur du segment comme dans certaines études (Caputo et coll., 1992 ; Baldwin et Wilson, 1993). Le coefficient de rétractation longitudinale de l'artère carotide mesuré dans ce travail est de $1,47 \pm 0,02$ ($n=32$), valeur comparable à celle de la littérature (Dobrin, 1978 ; Lee et Haut, 1992). Nos résultats montrent, comme ceux d'autres travaux (Bergel, 1961b ; Cox, 1977), la nécessité d'effectuer plusieurs cycles de pressurisation avant le début de chaque expérience afin de minimiser le phénomène d'hystérésis. Ceci n'est apparemment pas uniquement dû à la technique de prélèvement, car même

si ce dernier est effectué à pression et longueur physiologiques, il est nécessaire de soumettre l'artère à plusieurs montées et descentes en pression intraluminale pour obtenir des réponses mécaniques ultérieures stables (Baldwin et Wilson, 1993).

Les valeurs minimales de PPb/PPa, correspondant à une capacité maximale d'amortir le signal de pression, sont observées à des PIMs inférieures à 100 mmHg. De même, la compliance carotidienne calculée à partir de la mesure du diamètre externe ou du volume intraluminale (présente étude) est maximale à des pressions de 40-80 mmHg comme dans le cas de variations maximales de diamètre (Wolinsky et Glagov, 1964 ; Dobrin et Rovick, 1969 ; Cox, 1978b). Au-delà de 100 mmHg, la compliance et la capacité d'amortissement artériel sont minimales. A notre connaissance, peu d'études montrent une compliance maximale à 100 mmHg par mesure soit de diamètre (Caputo et coll., 1992) soit de volume intraluminale (Lévy et coll., 1990). Nous n'avons pas d'explication pour ce paradoxe. Lors de la mesure du diamètre ou de PPb/PPa, les valeurs sont stables durant chaque palier de pression ; dans le cas de la mesure du volume intraluminale, les variations de volume sont nettement biphasiques. La deuxième phase pourrait être due à une filtration de liquide à travers la paroi artérielle (Lévy et coll., 1990). Ceci peut être appuyé par le fait, d'une part, qu'aucun œdème n'apparaît après les cycles de pressurisation, et d'autre part, que la bulle ne revient pas à sa position initiale après un retour à la PIM de base, en l'absence de variation du diamètre initial, pouvant ainsi indiquer un passage de liquide du milieu intraluminale vers le milieu extérieur (présente étude).

In vivo, les artères de grand diamètre sont soumises à des contraintes statiques et dynamiques dépendantes les unes des autres. L'hystérésis de la relation pression-diamètre de chaque cycle cardiaque doit être extrêmement faible puisque la paroi artérielle est continuellement déformée par la pression intraluminale moyenne. De plus, la paroi artérielle étant soumise à des oscillations rapides du diamètre dues à la pulsativité de la pression, ce système de charges statique et dynamique devrait éviter des phénomènes tels que la relaxation à la contrainte et le *creep* pour lesquels la durée de chaque cycle cardiaque est trop courte. Nous avons essayé de reproduire ces conditions *in vitro* ; en effet, la variation de PPb/PPa est rapide à la suite de l'augmentation de PIM et reste stable durant les 5 min de chaque palier de pression au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale. Ainsi, notre index de capacité d'amortissement artériel permet d'évaluer la relation entre la compliance artérielle et la pression intraluminale qui est similaire à celle décrite par la majorité des études *in vitro*.

Le but principal initial de cette étude n'est pas d'extrapoler directement nos résultats obtenus *in vitro* sur un segment artériel non perfusé à ceux *in vivo*. En effet, une telle variation de PPb/PPa entre 50 et 100 mmHg avec une perte de 40% de la capacité d'amortissement artériel à 75 mmHg pour un segment d'une longueur de 1,4 cm seulement n'est pas observée *in vivo*. Cependant, cette difficulté d'extrapolation n'est pas propre à notre méthode. Elle est rencontrée dans la presque totalité des méthodes sur segments non perfusés.

Puisque l'estimation de la compliance artérielle par l'indice PPb/PPa donne des résultats très satisfaisants comparés à ceux d'autres méthodes, nous avons pu poursuivre vers notre

principal objectif : l'évaluation de la relation entre la $[Ca^{2+}]_i$ et la compliance artérielle.

Même si la nature de la relation entre la compliance et la pression intraluminale est principalement déterminée par les propriétés visco-élastiques des composants de la paroi artérielle (Wolinsky et Glagov, 1964 ; Cox, 1978b ; Dobrin, 1978), des évidences indirectes montrent que l'activation ou l'inactivation des cellules musculaires lisses, accompagnée d'augmentation ou de diminution de $[Ca^{2+}]_i$, peut être également importante (Yin et coll., 1983 ; Safar et coll., 1989 ; Lévy et coll., 1990).

A faible contrainte, c'est-à-dire à faibles pressions intraluminales (< 100 mmHg), la principale composante de la paroi artérielle impliquée serait l'élastine (Wolinsky et Glagov, 1964 ; Dobrin, 1978). Lorsque la pression et donc la contrainte augmente, la charge est transférée de l'élastine vers le collagène qui est peu extensible (Wolinsky et Glagov, 1964). Certains de nos résultats confirment ce concept largement répandu. De plus, la fixation de la paroi artérielle et donc des fibres élastiques et des cellules musculaires lisses par le formol induit une perte de la capacité d'amortissement artériel à une valeur de PIM inférieure à 100 mmHg. Le segment artériel se comporte comme un cathéter de polyéthylène inerte et rigide. Ainsi, l'intervention sur les éléments responsables de l'élasticité artérielle permet de modifier le comportement visco-élastique de la paroi artérielle.

Aucune variation de $[Ca^{2+}]_i$ concomitante du signal de pression pulsée n'a été détectée quel que soit le niveau de pression intraluminale. Un tel phénomène est peut-être indétectable dans nos conditions expérimentales : la contrainte pulsée appliquée sur une préparation multicellulaire n'est probablement pas appliquée de façon synchrone à toutes les cellules musculaires lisses du segment.

Au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale, une baisse, et non une augmentation, du taux de calcium intracellulaire est observée. Ce résultat peut paraître surprenant puisque, d'une part, une réponse myogénique - c'est-à-dire une contraction cellulaire consécutive à une augmentation de pression - est décrite sur des artères musculaires, et d'autre part, l'existence de canaux de déformation peut permettre un influx de calcium à la suite d'une déformation (Henrion et coll., 1992). Ainsi, la baisse du taux de calcium intracellulaire pourrait n'être qu'un artefact statistiquement significatif par un hasard de probabilité (erreur de seconde espèce). Williams et coll. (1990) ont en effet montré que pour des variations de $[Ca^{2+}]_i$ dans la zone de 100 à 30 nM (correspondants à des pCa de 7 à 7,4) les variations de rapports de fluorescence peuvent être faibles. Pour écarter l'hypothèse d'un artefact, deux points sont à considérer. Premièrement, la largeur du faisceau d'excitation est de 3 mm, c'est-à-dire supérieure au diamètre maximal du segment à haute pression (1,6 mm) ; ceci évite un débordement du vaisseau par dilatation hors du faisceau, l'axe de l'artère restant à la même position. Deuxièmement, nous avons vérifié que le segment, dont l'axe principal peut se déplacer par courbure sous l'effet de la pression pulsée, ne sort pas du faisceau. Cependant, d'autres arguments nous laissent penser que cette diminution du taux de calcium intracellulaire est réelle. Dans des expériences récentes, une diminution significative de PPb/PPa, c'est-à-dire un accroissement significatif de la capacité d'amortissement

artériel, est mesurée lors de stimulations noradrénergiques à des PIM de 75 ou 100 mmHg (résultats non présentés). Ce résultat préliminaire est à compléter par la mesure de $[Ca^{2+}]_i$; il indique cependant qu'une vasoconstriction peut améliorer l'amortissement artériel. Par extrapolation, la vasodilatation (avec une baisse supposée du taux de calcium intracellulaire) pourrait majorer la rigidité pariétale. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Cox (1977) et de Dobrin et Rovick (1969). D'après ces auteurs, une stimulation par la noradrénaline conduit à des valeurs de module élastique plus faibles en fonction de la pression que celles obtenues sur des artères ayant subi une inhibition métabolique. Ainsi, l'activation cellulaire induirait une amélioration de l'élasticité artérielle. Cependant, à 25 mmHg, la stimulation par la noradrénaline ou l'ionomycine décroît la capacité d'amortissement, de façon simultanée à l'élévation du taux de calcium intracellulaire. Ainsi, des mécanismes différents pourraient intervenir en fonction du niveau de pression. Au contraire, Lévy et coll. (1990) décrivent une amélioration de la compliance artérielle après inhibition métabolique par le cyanure de potassium à des niveaux de pression de 75-100 mmHg. Des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider ce paradoxe.

De plus, l'absence d'activation du muscle lisse par la pression est confirmée par le manque d'effets d'une inactivation métabolique par le cyanure de potassium et le dinitrophénol. Cette observation peut paraître en désaccord avec d'autres études qui rapportent une augmentation de la compliance de segments artériels après inactivation métabolique (Lévy et coll., 1990). Il est à remarquer que cet effet est généralement faible (Mourlon-Le Grand et coll., 1992) et ne semble exister qu'en présence de l'endothélium chez les rats normotendus (Lévy et coll., 1990).

Cependant, l'activation des cellules musculaires lisses peut jouer un rôle dans la relation entre la capacité d'amortissement artériel et la PIM par réajustement de cette relation à un niveau différent. Ainsi, la noradrénaline augmente la $[Ca^{2+}]_i$ et diminue la capacité d'amortissement artériel sans modification de PIM. D'autres travaux ont montré, à faibles pressions, des augmentations de diamètre inférieures lors de cycles de pressurisation après stimulation par la noradrénaline, à celles obtenues après un traitement par le cyanure de potassium (Dobrin et Rovick, 1969), indiquant ainsi une plus grande compliance dans le deuxième cas. De même, l'ionomycine accroît le taux de Ca^{2+} cytosolique et PPb/PPa - d'où la rigidité supérieure observée - sans changement de PIM. Cet effet peut être annulé par un chélateur du Ca^{2+} , l'EGTA.

En conclusion, nos résultats suggèrent que la méthodologie employée permet d'évaluer et de confirmer les propriétés visco-élastiques des composantes de la paroi artérielle. L'intervention sur le matériel élastique, par fixation au formol, montre le rôle primordial de ce dernier dans la capacité d'amortissement artériel aux faibles pressions intraluminales. L'activation des cellules musculaires lisses conduisant à une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ est capable de réajuster la relation compliance-pression intraluminale à un niveau de compliance plus faible.

Notre travail s'est ensuite focalisé sur les modifications du contrôle de la compliance artérielle par des variations de $[Ca^{2+}]_i$, mais aussi par des altérations du tissu élastique. Parmi les facteurs physiologiques ou pathologiques susceptibles de modifier cette compliance, nous nous sommes plus particulièrement intéressé aux effets du vieillissement vasculaire (Milnor, 1989). En effet, au cours de celui-ci apparaissent des modifications fonctionnelles : une baisse de la compliance se manifeste, consécutive à une rigidification de la paroi artérielle, et provient non seulement d'une altération fonctionnelle des éléments élastiques, mais aussi d'un état contractile plus élevé des cellules musculaires lisses. Comme la perte des propriétés élastiques peut être due à un dépôt de calcium sur les fibres élastiques, nous avons étudié cet effet non seulement au cours du vieillissement, mais aussi dans un modèle de calcinose vasculaire accélérée. Dans les deux situations, nous avons recherché dans quelle mesure les cellules musculaires lisses peuvent jouer leur rôle de réajustement du niveau d'amortissement artériel.

CHAPITRE III

Rôle du calcium dans les effets de l'âge sur la capacité d'amortissement artériel

1. Introduction

Le vieillissement vasculaire se traduit par une rigidification de la paroi artérielle qui conduit à une diminution de la compliance artérielle (voir premier Chapitre). Chez l'Homme, les effets propres du vieillissement vasculaire sont difficilement dissociables de ceux induits par différents phénomènes pathologiques fréquemment associés tels que l'hypertension artérielle, des lésions dues à la formation de plaques d'athérome et des lésions artériosclérotiques de la média. Le rat, choisi dans notre étude, a l'avantage d'être peu susceptible de développer des plaques d'athérome (Gill et coll., 1989) et une hypertension artérielle avec l'âge (Lartaud et coll., 1994 ; Michel et coll., 1994). Cependant, vu l'élévation de son taux de calcium pariétal au cours du vieillissement - faible mais significative - il pourrait souffrir d'artériosclérose.

Lors du vieillissement, les altérations des propriétés fonctionnelles artérielles découlent de modifications structurales de la paroi artérielle telles qu'une dilatation et une augmentation de l'épaisseur pariétale progressives (Learoyd et Taylor, 1966 ; Michel et coll., 1994) avec effilochement et fragmentation des fibres élastiques. Le rapport du contenu en collagène sur celui en élastine s'accroît avec l'âge (Cox, 1977 ; Michel et coll., 1994). Mais, le vieillissement vasculaire semble être également associé à une hyporéactivité vasculaire (Docherty, 1988 ; Capdeville-Atkinson et coll., 1995). De ce fait, le niveau de Ca^{2+} intracellulaire pourrait jouer un rôle important dans la détermination de la compliance artérielle. Toutes ces modifications peuvent en effet altérer la compliance artérielle.

Nous avons étudié les effets du vieillissement vasculaire *in vitro* sur un segment d'artère carotide soumis à une pression pulsée grâce à la méthode décrite dans le Chapitre précédent. Ceci nous a permis d'analyser le rôle du Ca^{2+} intracellulaire dans la modulation de la capacité d'amortissement artériel, et les altérations de ce couplage au cours du vieillissement vasculaire.

2. Matériel et méthodes

2.1. Animaux

Les animaux utilisés sont des rats Wistar mâles (Iffa Credo) qui disposent *ad libitum* de nourriture et d'eau adoucie de composition identique à celle décrite précédemment. L'animalerie a une température maintenue à 22°C et est sous un cycle de 12/12 heures d'alternance lumière/obscurité. A leur arrivée, les rats sont âgés de 2 (n=7 ; 475±20 g), 12 (n=6 ; 606±19 g) ou 24 mois (n=6 ; 638±9 g) et sont laissés au repos pendant une semaine avant toute expérience.

2.2. Prélèvement de l'artère carotide

Le prélèvement du segment de l'artère carotide se fait dans les mêmes conditions que celles décrites dans le Chapitre précédent avec la détermination du coefficient de rétractation

longitudinale L/L_0 , le retrait mécanique de l'endothélium et la fixation du segment à sa longueur *in situ* dans le système de pressurisation.

2.3. Cycles rapides de pressurisation intraluminale

Les segments carotidiens sont initialement perfusés pendant 15 min. Afin de minimiser le phénomène d'hystérésis et d'obtenir une réponse stable pour PPb/PPa, les segments sont soumis à 5 cycles rapides de pressurisation intraluminale (voir Chapitre II, paragraphe 3.1.1). Les valeurs de PIM et PPb/PPa sont mesurées avant le premier cycle et à la fin de chaque cycle.

2.4. Cycles lents de pressurisation intraluminale

Après les cycles de pressurisation initiaux (voir ci-dessus), le segment est soumis à un cycle lent de pressurisation intraluminale qui consiste en une augmentation de PIM de 25 à 150 mmHg, par paliers de 25 mmHg de 5 min chacun. A la fin des 5 min à 150 mmHg, la PIM est abaissée à sa valeur basale (voir Chapitre II, paragraphe 3.1.1).

2.5. Charge du fura-2

L'incorporation de la sonde fluorescente (fura-2 AM, 5 μ M) s'effectue dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment dans le Chapitre II (paragraphe 3.1.3).

2.6. Effets de la noradrénaline

Les segments artériels sont ensuite stimulés après la charge du fura-2, avec de la noradrénaline (NA) à une PIM basale de 22-24 mmHg. La NA (10 μ M) est superfusée pendant 10 min. Les variations induites par cette stimulation sont évaluées par le calcul de $\Delta R\%$ et $\Delta PPb/PPa\%$ (Chapitre II, paragraphe 3.1.4). Les segments sont ensuite perfusés et superfusés avec la solution de Krebs dépourvue de NA pendant 10 min.

2.7. Effets d'un ionophore et d'un chélateur du calcium

En fin d'expérience, les variations de Ca^{2+} intracellulaire et de PPb/PPa sont évaluées à PIM basale à la suite de la perfusion de l'ionophore calcique, l'ionomycine, puis de la perfusion/superfusion d'un chélateur du Ca^{2+} , l'EGTA, et enfin de la perfusion de Mn (Chapitre II, paragraphe 3.1.3).

2.8. Calcium tissulaire total

Le dosage du calcium tissulaire total a été réalisé dans le Service du Professeur M. Hoffman (Pharmacie Centrale, Hôpital Central, Nancy) avec l'aide d'I. Lartaud-Idjouadiene (Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Nancy). La technique utilisée a été décrite par Henrion et coll. (1991a).

Des segments d'aorte thoracique, d'artères carotide et caudale, et de myocarde sont prélevés. Les échantillons sont déshydratés à l'étuve (110°C) jusqu'à l'obtention d'un poids constant (environ 48 heures) ; le poids sec est ainsi déterminé. Le tissu sec est ensuite mis en contact avec de l'acide nitrique 14 N (1 ou 3 ou 0,3 ml selon le volume des organes ; Merck) pour une digestion acide complète à température ambiante pendant 72 heures environ. L'échantillon est ensuite centrifugé à 2000xg pendant 10 min. A 0,2 ml de surnageant sont additionnés 3,8 ml de chlorure de lanthane 1 mM (Merck) permettant d'éliminer l'interférence de traces d'autres ions divalents. La détermination du taux calcique se fait par spectrophotométrie d'absorption atomique avec une flamme air-acétylène (modèle 2380 ; Perkin-Elmer, Norwalk, NJ, USA) à une longueur d'onde de 422,7 nm. La concentration tissulaire de calcium est exprimée en micromoles de calcium par gramme de tissu sec ($\mu\text{mol/g}$).

2.9. Masse cardiaque

Après prélèvement du cœur, une dissection est effectuée afin de ne conserver que les ventricules (VG+VD) dont le poids frais est mesuré. Une dissection supplémentaire permet d'isoler le ventricule gauche, le septum compris (VG), dont le poids frais est également mesuré. Par différence de ces deux poids, le poids du ventricule droit (VD) correspondant à sa paroi externe est calculé. Les résultats sont également exprimés en poids ventriculaire relatif, c'est-à-dire par le rapport du poids ventriculaire sur le poids corporel de l'animal.

2.10. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm sm ($m \pm sm$). L'effet de l'âge sur les différents paramètres est déterminé par une ANOVA à 1 facteur associée au test de comparaison multiple de Scheffé. L'hypothèse nulle est rejetée au niveau de probabilité $P < 0,05$.

3. Résultats

3.1. Coefficient de rétractation

L'âge a un effet significatif sur le coefficient de rétractation longitudinale (Figure 3.1 ; $F=16,5$, $P=0,0001$; Tableau 6.1 en annexe). A 24 mois, ce coefficient est diminué de 10,5% et de 9,8% par rapport à celui des artères carotides des rats de 2 et 12 mois, respectivement.

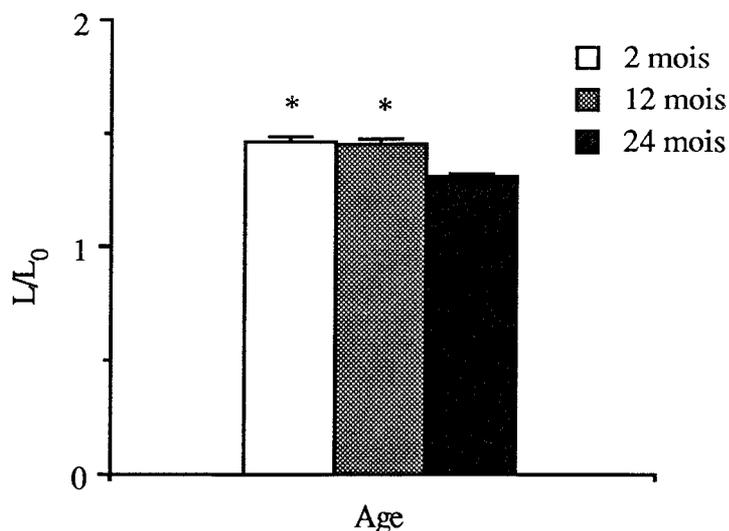


Figure 3.1. Coefficient de rétraction longitudinale (L/L_0) de l'artère carotide. (*) $P < 0,05$ par rapport à l'âge de 24 mois.

3.2. Cycles rapides de pressurisation intraluminale

Initialement, les segments carotidiens de rats âgés (24 mois) ont un indice d'amortissement artériel PPb/PPa plus faible que celui des rats plus jeunes (Figure 3.2 ; Tableau 6.2 en annexe). La réalisation de 5 cycles rapides de pressurisation intraluminale induit une baisse de PPb/PPa qui se stabilise à partir du 4^{ème} cycle effectué indiquant ainsi une plus grande élasticité artérielle (Figure 3.2 ; Tableau 6.2 en annexe). Les valeurs de PPb/PPa des rats âgés de 2 mois restent cependant plus élevées après cette série de cycles que celles de rats âgés de 12 et 24 mois. PPb/PPa, mesuré à 2 mois, est significativement supérieur celui évalué à 24 mois ($P < 0,05$).

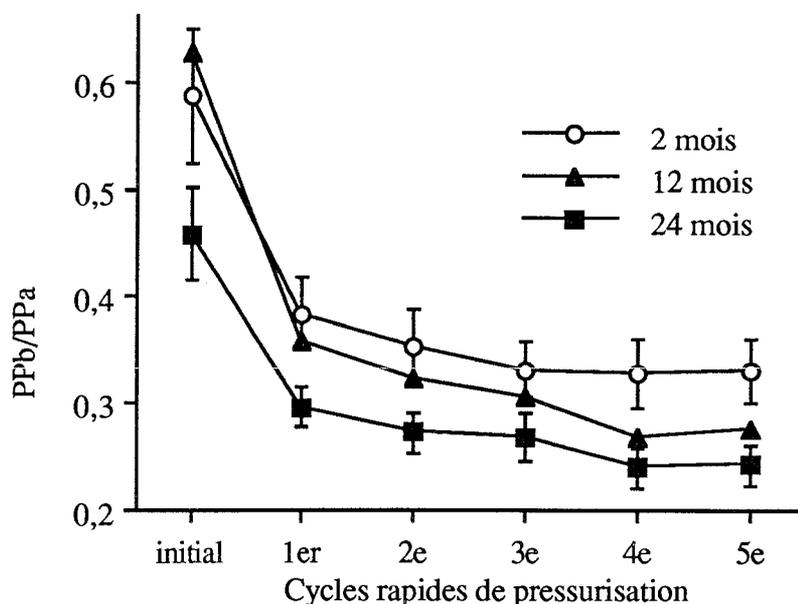


Figure 3.2. Effets de l'âge au cours de 5 cycles rapides de pressurisation intraluminale sur l'indice d'amortissement artériel (PPb/PPa).

Une ANOVA à 2 facteurs (cycle et âge) révèle un effet "cycle" dont la valeur F est égale à 26,1 (P=0,0001) et un effet âge de valeur F=9,9 (P=0,0001) sans interaction entre les deux (F=0,6 ; P=0,8313). De plus, la PIM n'est pas modifiée par les cycles successifs (P>0,1 pour les effets âge et cycle).

3.3. Effets de l'âge sur un cycle lent de pressurisation intraluminale

Les variations de PPb/PPa en fonction de la PIM sont similaires à celles déjà observées dans le Chapitre précédent (Figure 3.3 ; Tableau 6.3 en annexe). A 25 mmHg, l'indice PPb/PPa est plus élevé chez les rats âgés de 2 mois que celui des rats de 24 mois. A 75 mmHg, il est supérieur chez ces derniers à celui des rats de 12 mois, indiquant une capacité plus faible à amortir un signal de pression pulsée. Aux pressions plus élevées, à partir de 100 mmHg, les segments carotidiens des différents rats se comportent de la même manière : l'indice d'amortissement artériel PPb/PPa est environ égal à 1.

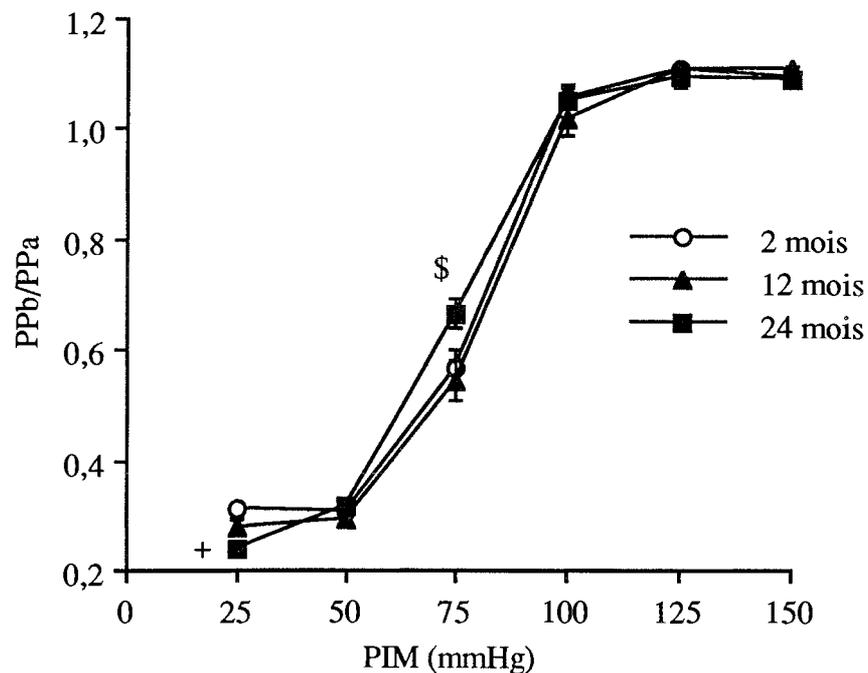


Figure 3.3. Effets d'un cycle lent de pressurisation intraluminale sur l'indice d'amortissement artériel (PPb/PPa). ANOVA (effet âge) à 25 mmHg (+) P<0,05 24 par rapport à 2 mois, et à 75 mmHg (\$) 24 par rapport à 12 mois.

3.4. Paramètres de fluorescence

L'autofluorescence des segments carotidiens mesurée avant l'incorporation du fura-2 AM augmente avec l'âge aux longueurs d'onde 340, 360 et 380 nm (Figure 3.4 ; Tableau 6.4 en annexe). Elle s'accroît de 42-45% et de 26-29% entre 2 et 12 mois et entre 12 et 24 mois, respectivement, pour les trois longueurs d'onde. Ceci correspond à une majoration de 80-84% entre les âges de 2 et 24 mois.

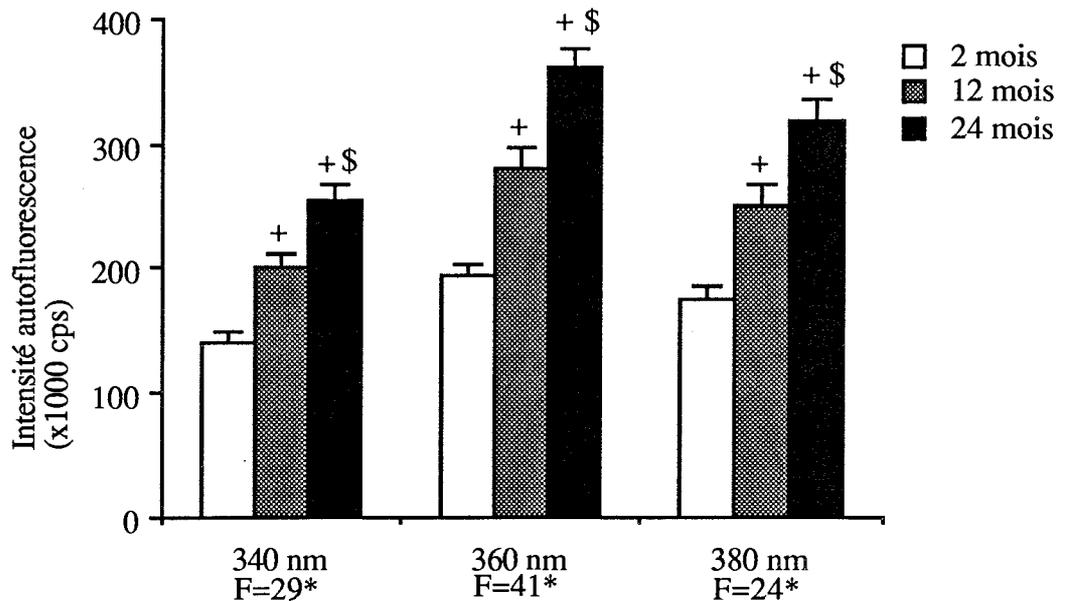


Figure 3.4. Fluorescence du segment carotidien non chargé (autofluorescence) aux trois longueurs d'onde d'excitation (340, 360 et 380 nm) avec les valeurs F de l'ANOVA, (*) $P < 0,05$ pour l'effet âge. (+) $P < 0,05$ par rapport à 2 mois, (\$) $P < 0,05$ par rapport à 12 mois.

Les rapports de charge du fura-2 tendent à diminuer de 18-22% avec l'âge quelle que soit la longueur d'onde (Figure 3.5 ; Tableau 6.5 en annexe). L'âge n'a pas d'effet significatif, mais il est à noter que les différences sont proches du niveau de probabilité $P=0,05$.

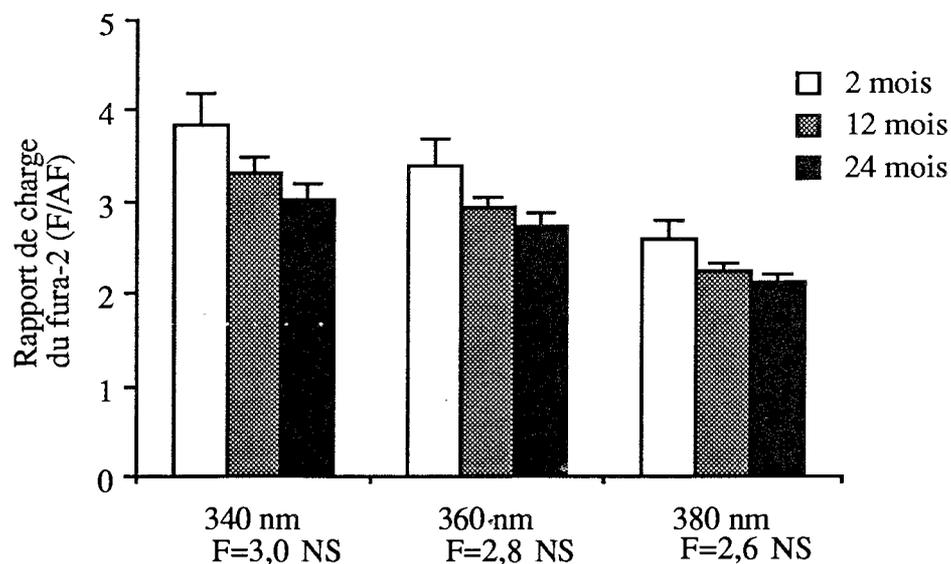


Figure 3.5. Rapport de charge du segment carotidien par le fura-2 (fluorescence mesurée après la charge du fura-2 sur autofluorescence mesurée avant la charge = F/AF). Les valeurs F de l'ANOVA sont indiquées pour chaque longueur d'onde. NS = non significatif.

L'âge n'a pas d'effet sur les valeurs du pourcentage de l'autofluorescence dans les signaux de fluorescence mesurés après les périodes de charge et d'hydrolyse du fura-2 AM, (Figure 3.6 ; Tableau 6.6 en annexe). Ce pourcentage, de 30-35% à 340 nm et de 34-39% à 360 nm, est plus élevé à 380 nm (43-49%).

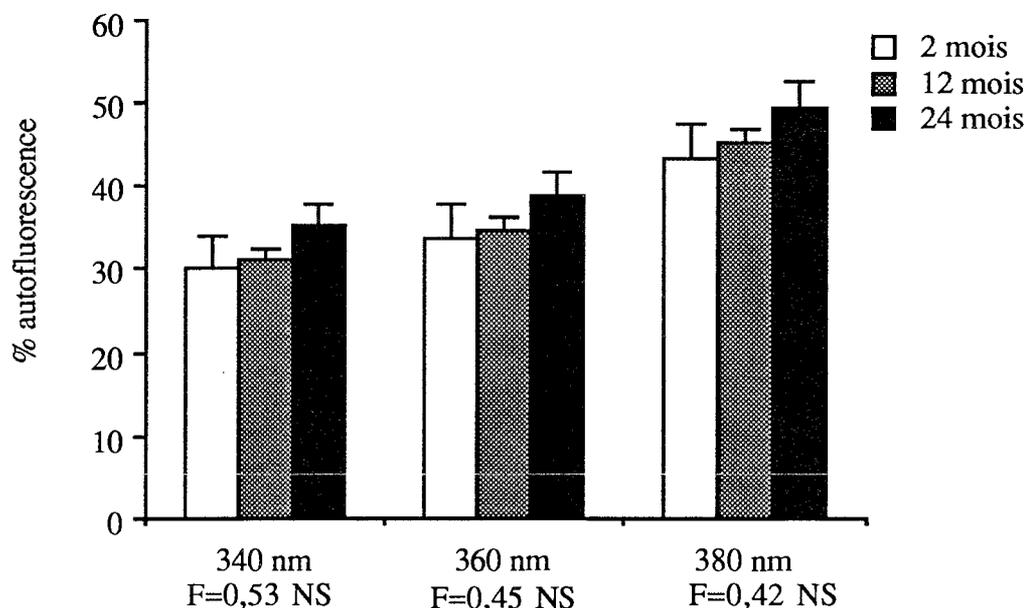


Figure 3.6. Pourcentage de l'autofluorescence dans les signaux de fluorescence obtenus après la charge du segment carotidien par le fura-2. Les valeurs F de l'ANOVA sont indiquées (effet âge), NS = non significatif.

Les valeurs des paramètres de fluorescence sont similaires pour les trois âges (Figure 3.7 ; Tableau 6.7 en annexe). Le niveau de Ca^{2+} intracellulaire mesuré par le rapport R' ou $[\text{Ca}^{2+}]_i/K_d$ est également proche dans les trois groupes. A titre indicatif, les valeurs de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sont de $44,1 \pm 5,2$ nM à 24 mois, $56,9 \pm 7,4$ nM à 12 mois et de $53,1 \pm 9,1$ nM à 2 mois (effet âge : $P > 0,05$).

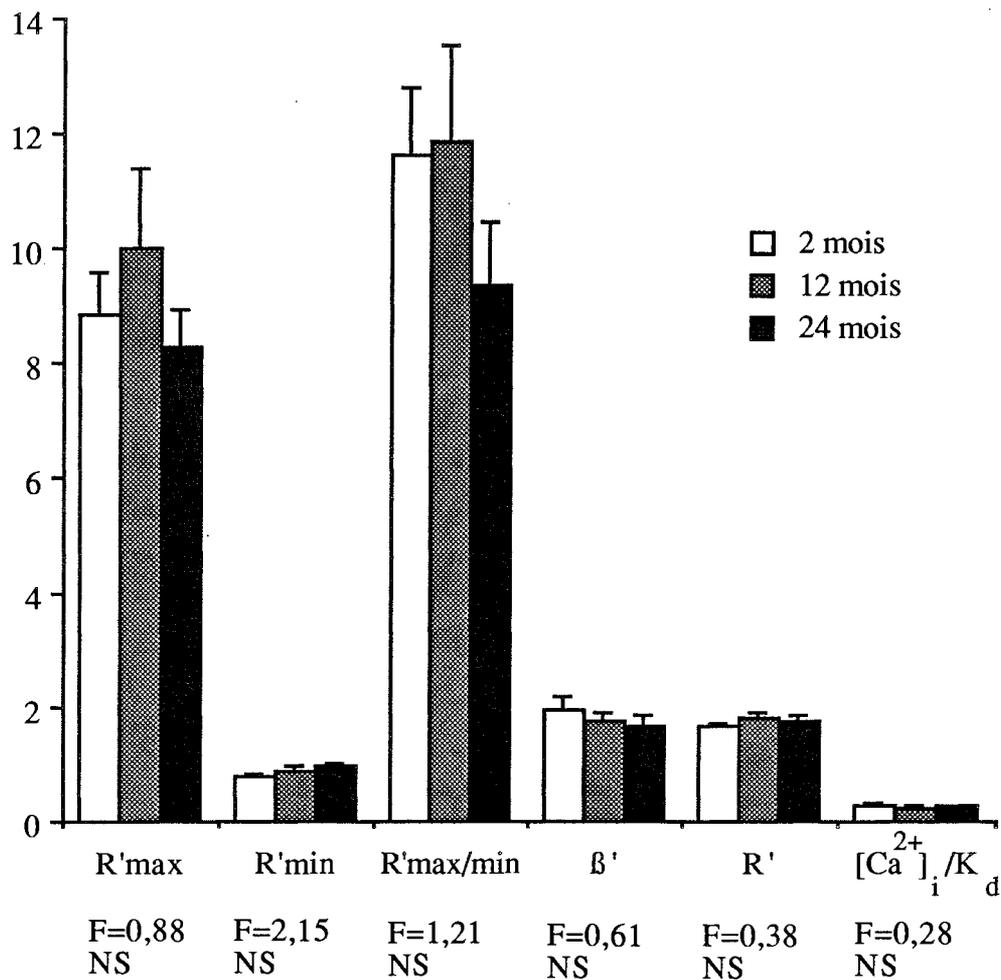


Figure 3.7. Effets de l'âge sur les paramètres de fluorescence. Les valeurs F de l'ANOVA sont indiquées. NS = non significatif.

3.5. Effets de la noradrénaline

La superfusion de NA (10 μM) suscite des élévations de PPb/PPa et de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ plus importantes à 12 et 24 mois qu'à 2 mois (Figure 3.8 ; Tableau 6.8 en annexe). L'augmentation de PPb/PPa traduit une plus faible capacité d'amortir un signal de pression pulsée en présence de NA. De même, l'accroissement de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, observé sous NA, est nettement plus faible à 2 mois que dans les deux autres groupes.

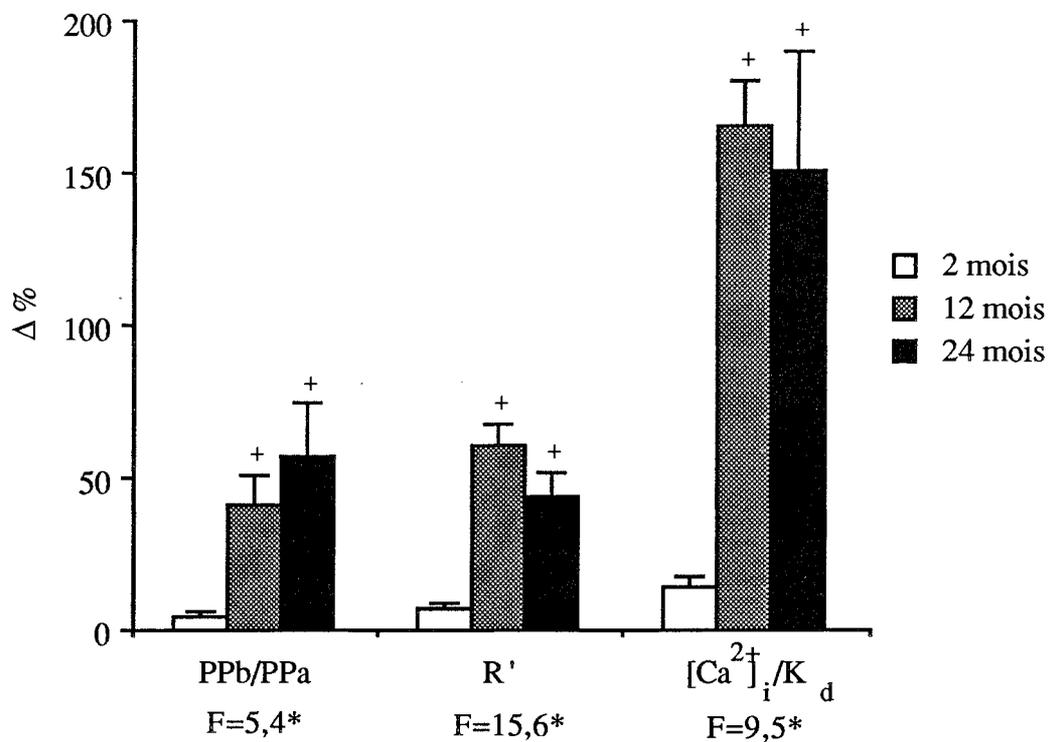


Figure 3.8. Effets de la superfusion de noradrénaline (10 μM) sur l'indice d'amortissement artériel (PPb/PPa) et sur le taux de Ca^{2+} intracellulaire. Les valeurs F de l'ANOVA sont indiquées, (*) $P < 0,02$ (effet âge). (+) $P < 0,05$ par rapport à 2 mois.

Les valeurs de PIM sont inchangées par la stimulation noradrénergique dans les trois groupes ; elles sont stables à leur niveau basal (environ 23 mmHg).

3.6. Effets d'un ionophore et d'un chélateur du calcium

En présence d'ionomycine, une variation similaire de PPb/PPa de l'ordre de +90 à +100% survient dans les trois groupes d'âge (Figure 3.9 et Tableau 6.9 en annexe ; Figure 3.10 et Tableau 6.10 en annexe). De même, le niveau de Ca^{2+} intracellulaire, indiqué par $\Delta R'\%$, est largement augmenté dans les trois groupes (Figure 3.9 ; Tableau 6.9 en annexe). L'âge est dépourvu d'effet significatif sur ces deux paramètres.

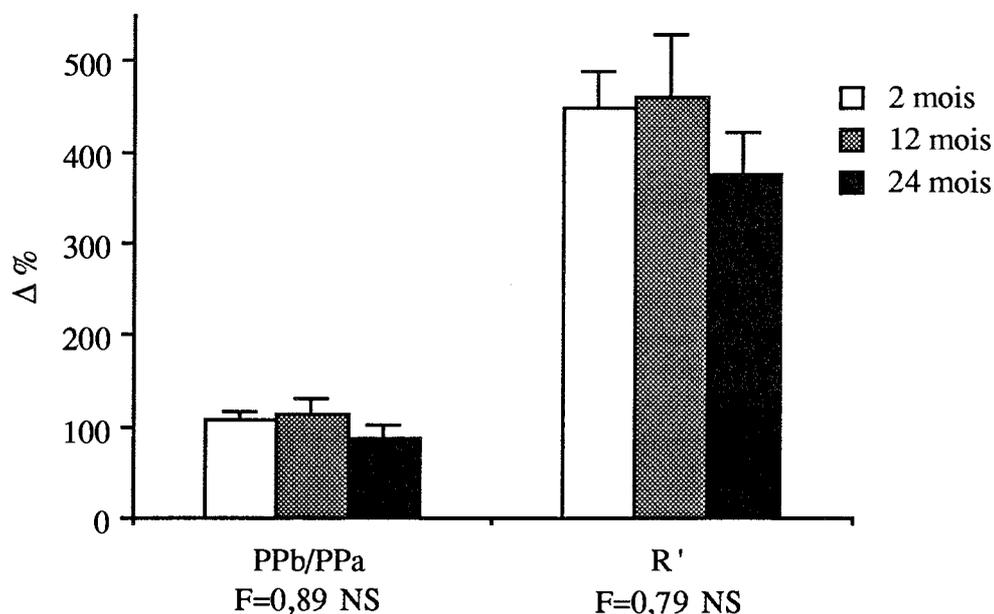


Figure 3.9. Effets de l'ionomycine sur l'indice d'amortissement artériel (PPb/PPa) et sur le taux de Ca^{2+} intracellulaire. Les valeurs F de l'ANOVA sont indiquées. NS = non significatif.

Après stimulation par l'ionomycine, l'EGTA abaisse PPb/PPa indiquant un recouvrement de l'élasticité artérielle (Figure 3.10 ; Tableau 6.10 en annexe). Dans le groupe de rats âgés de 2 mois, la valeur de PPb/PPa reste cependant supérieure, d'une part, à celle des deux autres groupes et, d'autre part, à son niveau initial. Le Mn n'a pas d'effet supplémentaire. Les valeurs de PIM ne sont pas modifiées tout au long de ce protocole dans les trois groupes (environ 23 mmHg).

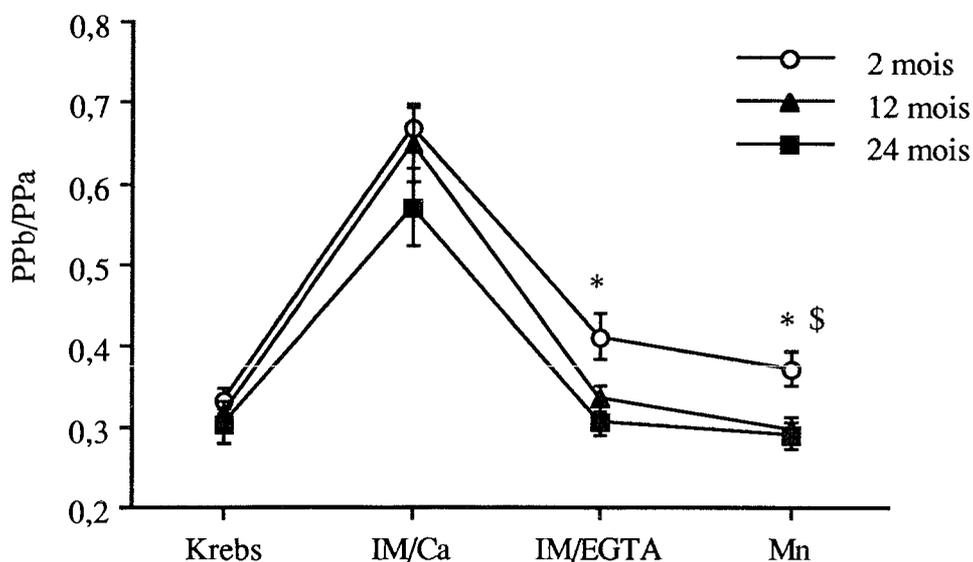


Figure 3.10. Variations de l'indice d'amortissement artériel (PPb/PPa) en présence d'ionomycine et de calcium (IM/Ca), puis d'EGTA (IM/EGTA) ou de manganèse (Mn). (*) $P < 0,05$ par rapport à 24 mois, (\$) $P < 0,05$ par rapport à 12 mois.

3.7. Calcium tissulaire total

Le vieillissement se caractérise par une augmentation significative du taux de calcium tissulaire total de l'artère carotide et de l'aorte thoracique et par une absence de changement de celui de l'artère caudale et du myocarde (Figure 3.11 ; Tableau 6.11 en annexe). A l'âge de 24 mois, la concentration de calcium tissulaire de l'aorte thoracique et de l'artère carotide est accrue respectivement de +29,8% et de +60,5% par rapport à celle observée à l'âge de 2 mois.

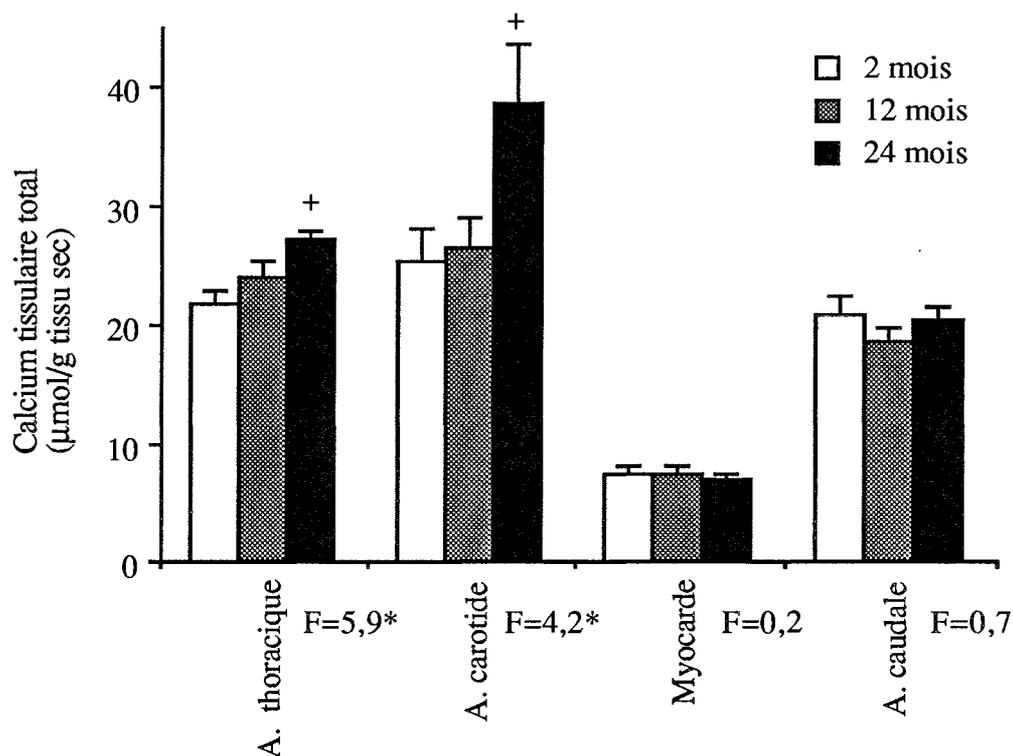


Figure 3.11. Concentrations de calcium tissulaire total de 3 artères et du myocarde. Les valeurs F de l'ANOVA sont indiquées, (*) $P < 0,05$ (effet âge). (+) $P < 0,05$ par rapport à 2 mois.

3.8. Masse cardiaque

La masse ventriculaire totale augmente significativement de 22,2% entre les âges de 2 et 12 mois, puis elle a tendance à se stabiliser, n'augmentant que de 5,9% entre 12 et 24 mois (Figure 3.12A ; Tableau 6.12 en annexe). Nous observons des accroissements similaires pour la masse ventriculaire gauche (24,0% et 7,6% respectivement), mais significatifs dans les deux cas. La masse ventriculaire droite est également plus élevée avec l'âge, que à celle des rats âgés de 2 mois (+15,5% à 12 mois et +14,0% à 24 mois).

Lorsque les masses ventriculaires sont rapportées au poids corporel, elles sont stables entre les âges de 12 et 24 mois (Figure 3.12B ; Tableau 6.12 en annexe). Par contre, elles sont significativement inférieures à celles des rats âgés de 2 mois.

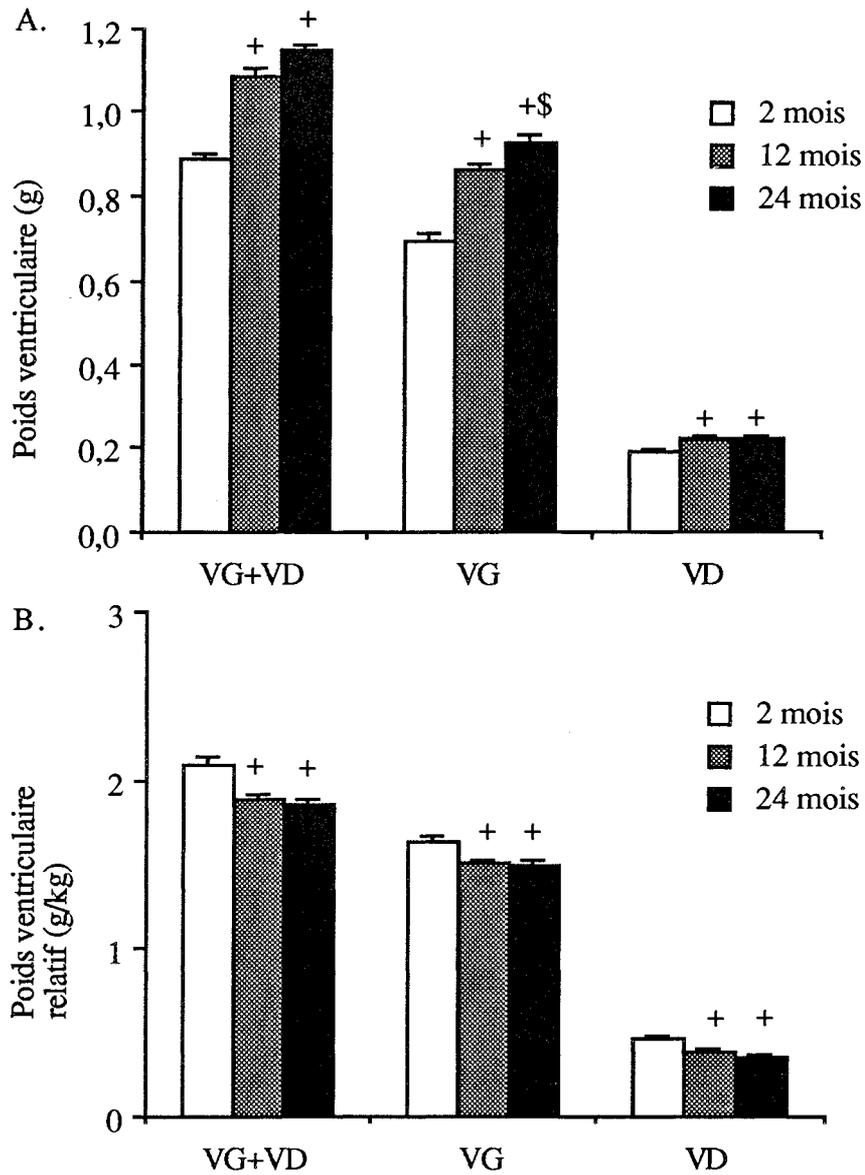


Figure 3.12. Effets de l'âge sur les masses ventriculaires totale (VG+VD), gauche (VG) et droite (VD). A : masses ventriculaires absolues, B : masses ventriculaires relatives rapportées au poids corporel. (+) $P < 0,05$ par rapport à 2 mois, (\$) $P < 0,05$ par rapport à 12 mois.

4. Discussion

Dans cette étude, nous nous sommes principalement intéressé aux effets du vieillissement sur la capacité artérielle d'amortir un signal de pression pulsée et au rôle que peut jouer le calcium intracellulaire dans les variations observées.

4.1. Effets mécaniques vasculaires du vieillissement

4.1.1. Coefficient de rétractation longitudinale

Le coefficient de rétractation longitudinale de l'artère carotide est diminué avec l'âge, principalement à celui de 24 mois (présente étude). Ce phénomène a été observé chez l'Homme par Learoyd et Taylor (1966) et chez l'animal par Bergel (1961b) et Band et coll. (1972). Ce résultat est certainement à mettre en relation avec l'élongation artérielle observée avec l'âge (Gerstenblith et coll., 1976).

4.1.2. Cycles de pressurisation intraluminale

L'âge n'affecte que faiblement l'indice d'amortissement artériel PPb/PPa de l'artère carotide de rat lors des cycles rapides et lents de pressurisation intraluminale. En effet, des différences significatives sont apparentes au cours d'un cycle lent de pressurisation à 25 mmHg (PPb/PPa à 2 mois > PPb/PPa à 24 mois) et à 75 mmHg (PPb/PPa à 24 mois > PPb/PPa à 12 mois). Ainsi, les artères carotides paraissent plus rigides chez des rats âgés de 24 mois à un niveau moyen de pression (75 mmHg). Mais, à faible pression (25 mmHg), la rigidité est plus marquée chez des rats âgés de 2 mois. Pour tenter d'expliquer cette différence en fonction du niveau de pression, nous allons considérer la tension pariétale circonférentielle qui tient compte non seulement de la pression intraluminale, mais aussi des dimensions artérielles.

A faible pression (PIM = 25 mmHg), l'âge entraîne une diminution de PPb/PPa (Figures 3.2 et 3.3), particulièrement entre 2 et 24 mois. A une pression aussi basse, deux facteurs peuvent intervenir : d'une part, un diamètre et un rapport h/D_i (épaisseur de la média / diamètre interne) plus faibles, et, d'autre part, une force de traction plus importante chez les rats de 2 mois - les deux extrémités du segment étant fixées pour maintenir une longueur constante. Bien que les dimensions artérielles n'aient pas été mesurées dans cette étude, une augmentation de h/D_i avec l'âge a été rapportée par Learoyd et Taylor (1966) et Michel et coll. (1994). Ainsi, une valeur de h/D_i plus faible à l'âge de 2 mois indiquerait un rapport R_i/h (rayon interne / épaisseur de la média) plus élevé, et à pression égale une tension pariétale circonférentielle correspondante plus grande. Cette tension pariétale supérieure, à l'âge de 2 mois, pourrait ainsi expliquer la plus forte rigidité à basse pression des rats.

A des pressions plus élevées, les trois groupes d'âge se comportent de façon similaire, à l'exception du niveau de pression 75 mmHg où l'indice PPb/PPa des rats âgés de 24 mois est plus élevé, de façon significative qu'à 12 mois. Afin d'obtenir des renseignements supplémentaires, les tensions pariétales circonférentielles T ont été calculées selon la formule $T = P \times (R_i / h)$ (Chapitre II ; P = pression artérielle, R_i = rayon interne, h = épaisseur de la média) à partir des valeurs de pression et de morphologie des artères carotides de rats âgés de 12 et 24 mois publiées par Michel et coll. (1994). A partir des valeurs du périmètre ($2,37 \pm 0,07$ et $2,47 \pm 0,14$ μm , respectivement ; moyenne \pm déviation standard), les rayons internes R_i ont une valeur respective de 37,72 et 39,31 μm . Le rapport R_i/h est ainsi de 10,66 et 9,56 et la tension pariétale de 1023 et 1004 dynes/cm² pour les pressions artérielles moyennes correspondantes, 96 et 105 mmHg, respectivement. Ainsi, le rapport R_i/h et la tension pariétale sont faiblement modifiés entre les âges de 12 et 24 mois. La valeur de la tension pariétale moyenne n'est donc pas à l'origine de la rigidification vasculaire observée à 75 mmHg chez les rats de 24 mois (présente étude). Par contre, la compliance carotidienne à 100 mmHg diminue de 39%, passant de $0,23 \pm 0,06$ à $0,14 \pm 0,02$ $\mu\text{l/mmHg}$ (moyenne \pm déviation standard, n=10) (Michel et coll., 1994).

Comme nous l'avons déjà souligné, le rapport h/D_i croît avec l'âge, mais h et D_i également en considérant un domaine d'âges étendu (de 6 à 30 mois ; Michel et coll., 1994) ; ceci indique une variation plus importante de h par rapport à celle de D_i . Des différences existent cependant entre plusieurs études, relatant des dimensions maximales, non vers l'âge de 30 mois (Michel et coll., 1994), mais vers celui de 8-16 mois (Fornieri et coll., 1992).

4.2. Effets structuraux vasculaires du vieillissement

4.2.1. Fibres élastiques

4.2.1.1. Aspect quantitatif

La dilatation artérielle observée pourrait être due à des altérations de la matrice extracellulaire, notamment une dégradation des fibres élastiques. L'évolution quantitative de l'élastine donne des résultats controversés selon les études et le mode d'expression de ceux-ci. En effet, le pourcentage d'élastine diminue avec l'âge (Cox, 1977 ; Fornieri et coll., 1992 ; Michel et coll., 1994) : le pourcentage maximal d'élastine se situe vers l'âge de trois semaines (Fornieri et coll., 1992). Au contraire, la quantité absolue d'élastine exprimée par aire de coupe transversale pariétale s'élève nettement jusqu'à l'âge de 2 mois (161% par rapport au 18^{ème} jour), puis régresse progressivement jusqu'à celui de 24 mois (57%, 53% et 43% par rapport à 2, 8 et 16 mois, respectivement) (Fornieri et coll., 1992). D'autres auteurs rapportent au contraire une augmentation continue avec l'âge dans l'aorte thoracique (30% entre 12 et 30 mois), et dans l'artère carotide une absence d'élévation significative (+16% entre 12 et 30 mois ; P=0,06 pour l'effet âge) (Michel et coll., 1994). L'accroissement de la quantité absolue d'élastine pourrait s'expliquer par le fait que des cellules musculaires lisses soumises à une déformation statique

augmentent leur production d'élastine soluble (Sutcliffe et Davidson, 1990). Cependant, les résultats sont très variables suivant l'origine artérielle de ces cellules (Sutcliffe et Davidson, 1990). Si certains travaux mettent en évidence un amincissement des fibres élastiques avec l'âge (Fornieri et coll., 1992), d'autres n'observent pas de différence (Michel et coll., 1994). Le nombre et le diamètre des fibres élastiques augmentent jusqu'à la maturité, puis s'abaissent et restent constants pour le reste de la vie, les fibres élastiques de vieux rats devenant irrégulières (Fornieri et coll., 1989). Ainsi, l'analyse quantitative des fibres élastiques ne semble pas expliquer à elle-seule de façon satisfaisante les modifications fonctionnelles de la paroi artérielle au cours du vieillissement.

4.2.1.2. Aspect qualitatif par rapport au calcium

Les modifications qualitatives de ces fibres avec l'âge sont également à prendre en considération. Nos résultats montrent que les concentrations de calcium tissulaire total sont plus élevées à l'âge de 24 mois dans l'aorte thoracique et l'artère carotide qu'à 2 et 12 mois. Le niveau de Ca^{2+} cytosolique des cellules musculaires lisses de l'artère carotide mesuré par le fura-2 semble ne pas varier en fonction de l'âge comme l'indiquent les valeurs de R' et $[\text{Ca}^{2+}]_i/K_d$. L'accroissement du calcium pariétal observé se situe probablement dans le milieu extracellulaire, la quantité de calcium lié à l'élastine s'élevant entre les âges de 12 et 30 mois (Michel et coll., 1994). Ceci pourrait entraîner des modifications qualitatives des fibres élastiques, en l'occurrence une majoration de leur module élastique, à l'origine de la perte de compliance artérielle. En effet, une forte accumulation de calcium dans la média décroît fortement la capacité d'amortissement artériel (voir Chapitre IV) et la compliance artérielle (Atkinson et coll., 1994a). De plus, la quantité de calcium lié à l'élastine au niveau de l'aorte de rats soumis à un exercice physique est inférieure à celle de rats sédentaires, et les dépôts calciques sur l'élastine sont positivement corrélés avec le module élastique incrémental (Matsuda et coll., 1993). Ceci indique que la distensibilité de l'aorte s'élève quand le contenu en calcium s'abaisse. Il est intéressant de noter, entre rats sédentaires et en exercice volontaire, qu'à quantité similaire d'élastine exprimée de façon absolue (mg/g de poids sec d'aorte) et associée à un dépôt calcique moindre dans le deuxième cas, une diminution du module élastique incrémental survient au niveau de l'aorte des rats en exercice (Matsuda et coll., 1993). Ceci souligne bien l'importance de l'état qualitatif des fibres élastiques dans la rigidité artérielle et le rôle du calcium dans sa modulation.

4.2.2. Collagène

D'après Cox (1977), l'augmentation âge-dépendante du rapport de la quantité de collagène à celle d'élastine pourrait être liée à la perte de l'élasticité artérielle. Ainsi, un autre composant de la média susceptible d'intervenir dans la rigidité artérielle est le collagène. Pour le collagène, les résultats semblent moins controversés que pour l'élastine : une augmentation plus importante de sa quantité absolue apparaît avec l'âge (Fornieri et coll., 1992 ; Michel et coll., 1994), son

pourcentage maximal étant observé vers le 8^{ème} mois (Fornieri et coll., 1992). Cependant, Yin et coll. (1983) ne mettent en évidence aucune variation des quantités absolues de collagène ou d'élastine avec l'âge, de même pour le rapport collagène/élastine. Ceci s'oppose à la majoration de ce rapport notée par Cox (1977) avec une baisse du pourcentage d'élastine et une élévation de celui du collagène. Comme nous l'avons décrit dans le Chapitre II, l'augmentation du collagène est concomitante de la rigidification de la paroi artérielle.

4.2.3. Cellules musculaires lisses

L'épaississement âge-dépendant de la média est principalement associé à une hypertrophie des cellules musculaires lisses (Michel et coll., 1994). De plus, l'effet du cyanure de potassium, à l'origine d'une élévation de la compliance carotidienne, s'amenuise avec l'âge ; cette donnée montre que la part contractile des cellules musculaires lisses diminue tandis que la part structurale, c'est-à-dire la matrice extracellulaire, augmente dans le contrôle du niveau de compliance artérielle (Michel et coll., 1994). Nous nous sommes donc intéressé à la participation des cellules musculaires lisses dans le contrôle de la compliance artérielle par la mesure de la $[Ca^{2+}]_i$ avec une sonde fluorescente spécifique du Ca^{2+} , le fura-2.

4.3. Rôle du calcium intracellulaire

Lors de la stimulation par la noradrénaline, la mobilisation de Ca^{2+} cytosolique est plus importante avec la maturation, plus particulièrement entre les âges de 2 et 12 mois, les valeurs de $\Delta R'\%$ et $\Delta[Ca^{2+}]_i/K_d\%$ étant similaires entre ceux de 12 et 24 mois. En parallèle, $\Delta PPb/PPa\%$ est plus élevé avec l'âge, plus particulièrement entre 2 et 12 mois, indiquant une baisse d'amortissement artériel (augmentation de PPb/PPa) supérieure avec la maturation. Ainsi, les effets dûs à la maturation sont à distinguer de ceux dûs au vieillissement proprement dit. Au cours de la maturation (entre 2 et 12 mois), l'amortissement carotidien est abaissé lors de la stimulation par la noradrénaline, tandis qu'au cours du vieillissement (12 et 24 mois) il est inchangé. Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs études, mais la littérature montre des réactivités variables au cours du vieillissement (Tableau 3.1).

La plus forte mobilisation de $[Ca^{2+}]_i$ - induite par la noradrénaline - avec la maturation peut provenir d'un influx majoré de Ca^{2+} à partir du milieu extracellulaire et/ou d'une libération de Ca^{2+} accrue à partir des réserves calciques cytoplasmiques. Le fait que la mobilisation calcique soit similaire dans le cas d'une stimulation non réceptorielle par l'ionophore calcique, l'ionomycine, indique que les modifications survenues avec l'âge pourraient être d'origine réceptorielle. Cependant, l'affinité des récepteurs alpha-adrénergiques vasculaires ne semble pas être modifiée avec l'âge (Wanstall et O'Donnell, 1988), mais les résultats demeurent très divergents (Tableau 3.1).

Tableau 3.1. Etudes sur les modifications de la réactivité artérielle avec l'âge.

Références	Sujets	Âges (mois)	Artère	Agoniste	effets maturation (M) / vieillissement (V)
McAdams et Waterfall (1986)	rat		aorte	NA	V↓
Carrier et coll. (1979)	rat S-D	2-2,5-9-14	aorte	NA	M↓ V↓
Tuttle (1966)	rat CFN	3-12-24	aorte	NA	M↑ V↓
Olah et Rahwan (1987)	rat F344	5-22	aorte	NA	M+V↑
Hayashi et Toda (1978)	lapin	2-12	aorte	NA	M↑
Hynes et Duckles (1987)	rat F344	1-6-12-20-27	aorte	NA MXA	M = V =
Cohen et Berkowitz (1976)	rat S-D	1-2-3-12	aorte	NA 5-HT	M↓
Emmick et Cohen (1986)	rat S-D	1-18	aorte, artère carotide	5-HT	M+V =
Wanstall et O'Donnell (1988)	rat Wistar	2-20	aorte	NA	M+V↓
Duckles et coll. (1985)	rat F344	6-12-20-27	artères carotide, fémorale	NA	M = V =
Oster (1991)	rat Wistar rat F344	2-24 2-24	artère caudale artère caudale	NA, 5-HT NA, 5-HT	M+V↓
Capdeville-Atkinson et coll. (1995)	rat WAG/Rij	6-12-24-30	artère caudale	NA 5-HT	M = V↓
Nyborg (1991)	rat	3-24	artère coronaire	5-HT	M+V↑
Hynes et Duckles (1987)	rat F344	1-6-12-20-27	artère caudale	NA MXA	M↑ V =
Duckles et coll. (1985)	rat F344	6-12-20-27	artère rénale	NA	M = V =
Fouda et Atkinson (1986)	rat Ivanos	6-16-30	artère caudale	NA	M↓ V =
Wanstall et O'Donnell (1988)	rat Wistar	2-20	artère pulmonaire	NA	M+V↓
Stevens et coll. (1982)	Homme	35 à 89 ans	artère digitale	NA	V =
Atkinson et coll. (1994b)	rat WAG/Rij	6-12-24-30	lit artériel mésentérique	NA	M↑ V =
Scott et Reid (1982)	Homme	30 à 83 ans		NA	V =
Hruza et Zweifach (1967)	rat Wistar	3-14		NA, Ad i.v.	M↑

(↓) diminution, (↑) augmentation de la sensibilité et/ou de la réponse maximale à l'agoniste, (=) sans effet. NA = noradrénaline, Ad = adrénaline, 5-HT = sérotonine, MXA = méthoxamine, S-D=rat Sprague-Dawley

Nos résultats s'opposent à ceux obtenus sur l'artère caudale de rat où les mobilisations calciques induites par la noradrénaline ou la sérotonine sont similaires entre 2 et 24 mois tandis que les réponses contractiles sont d'intensité moindre à 24 qu'à 2 mois (Oster, 1991), ou de 6 à 30 mois (Capdeville-Atkinson et coll., 1995), conduisant à une diminution du couplage calcium-vasoconstriction (Tableau 3.1). Des résultats semblables ont été observés sur l'artère caudale de rat Ivanos avec une baisse de la sensibilité entre 6 et 16, et 6 et 30 mois tandis que celle-ci est inchangée entre 16 et 30 mois (Fouda et Atkinson, 1986). La sensibilité à la noradrénaline du lit artériel mésentérique est réduite (en absence d'endothélium) ou au contraire majorée (en présence d'endothélium) entre les âges de 6 et 30 mois (Atkinson et coll., 1994b). De même, la sensibilité et la réponse maximale de l'artère coronaire à la sérotonine sont augmentées avec l'âge (Nyborg, 1991).

L'artère carotide étant une artère élastique, les interactions des cellules musculaires lisses avec leur milieu environnant sont certainement à prendre en compte dans nos résultats. En effet, des points d'attachement entre ces cellules musculaires lisses et les fibres d'élastine ont été décrits (Wolinsky et Glagov, 1964 ; Perdomo et coll., 1994). Ainsi, toute contraction de ces cellules dans un plan circonférentiel peut entraîner une rigidification artérielle, non seulement par un effet direct mais également indirect *via* une action sur les fibres élastiques. La capacité du système contractile de provoquer une rigidification de la paroi artérielle pourrait être amplifiée avec l'âge (Cox, 1977).

Cependant, la littérature est plus controversée. Certains auteurs rapportent une baisse de l'efficacité du système cardio-vasculaire en réponse à une stimulation noradrénergique (Lakatta, 1980) : une hyporéactivité vasculaire associée à une diminution de la sensibilité de l'aorte à la noradrénaline apparaît (McAdams et Waterfall, 1986 ; Docherty, 1988). D'autres relatent un état hyperadrénergique (Rowe et Troen, 1980) : les contractions à la noradrénaline de l'aorte de lapin sont supérieures avec l'âge (Hayashi et Toda, 1978) et la sensibilité à ce médiateur s'élève dans l'aorte de rats Fischer âgés de 22 mois (Olah et Rahwan, 1987) (Tableau 3.1). De la même façon, Tuttle (1966) observe une diminution de la réponse à la noradrénaline sur des bandes d'aorte, tandis que Hruza et Zweifach (1967) montrent une hyper-réactivité de la musculature vasculaire lisse après administration intra-veineuse de noradrénaline chez le rat (Tableau 3.1). Une diminution de la réponse maximale et de la sensibilité à la noradrénaline est mise en évidence chez des rats entre les âges de 2 et 12 mois, associée à une baisse (Carrier et coll., 1979) ou à une augmentation (Cohen et Berkowitz, 1976) de la dépendance au calcium extracellulaire avec l'âge. Une perte de réactivité est également observée sur l'artère pulmonaire (Wanstall et O'Donnell, 1988). Par contre, d'autres études n'ont décelé aucun effet de l'âge sur la sensibilité à la noradrénaline exogène dans l'artère carotide de rats Fischer 344 âgés de 6 à 27 mois (Duckles et coll., 1985 ; Hynes et Duckles, 1987), et dans des segments artériels humains (Scott et Reid, 1982 ; Stevens et coll., 1982) (Tableau 3.1). De même, la stimulation sérotoninergique de l'aorte ou de l'artère carotide de rat n'est pas influencée par l'âge (Emmick et Cohen, 1986).

4.4. Effets du vieillissement sur la masse cardiaque

Les modifications de la réactivité vasculaire observées au cours, soit de la maturation, soit du vieillissement (Tableau 3.1 ; présente étude) sont susceptibles de moduler l'élasticité artérielle. Une rigidité du système artériel pourrait entraîner une élévation de la post-charge et par conséquent une hypertrophie cardiaque. Cependant, les masses ventriculaires relatives (totale, gauche ou droite) sont inchangées chez le rat dans ce travail. Au contraire, par rapport aux rats non matures (2 mois), une baisse est observée. Des résultats similaires ont été décrits par Chillon (1991) et par Hardouin et coll. (1993) (Tableau 3.2). De plus, une grande disparité existe dans la littérature quant à l'apparition ou non d'une hypertrophie ventriculaire avec l'âge (Tableau 3.2).

Tableau 3.2. Evolution de la masse cardiaque chez le rat avec l'âge.

Références	Souche	Âges (mois)	PC	Poids VG	Poids VG relatif	Poids VD	Poids VD relatif
Cox (1983)	Fischer NIA	3-12-24	M↑ V↓	M↑ V↓	M↓ V=		
Hardouin et coll. (1993)	Wistar	2-22	M+V↑	M+V↑	M+V↓	M+V↑	M+V↓
Chillon (1991)	Wistar	2-24	M+V↑	M+V↑	M+V↓		
	F344	2-24	M+V↑	M+V↑	M+V↓		
Pfeffer et coll. (1979)	WKY	3-6-12-22	M↑ V↑	M↑ V=	M= V=	M↑V↑	M↓ V↓
	NWR		M↑ V↑	M↑ V↑	M↓ V=	M↑V↑	M↓ V↓
Pfeffer et coll. (1982)	NWR	12-24	V↓	V↑	V↓		
Yin et coll. (1982)	Wistar	5 à 28	M↑ V↓	M↑ V=	M= V↑	M=V=	M= V↑
Michel et coll. (1994)	WAG/Rij	6-12-24	M↑ V↓	M↑ V↓	M↓ V↑		
Conrad et coll. (1991)	WKY	12-18-	12-18 ↓	12-18↓	12-18 ↑	V=	V=
		24	18-24 ↑	18-24 ↑	18-24 ↓		

(↓) diminution, (↑) augmentation, (=) effet similaire. VG = ventricule gauche, VD = ventricule droit, PC = poids corporel.

D'après Yin et coll. (1982), une hypertrophie ventriculaire gauche - lorsque la masse ventriculaire est rapportée au poids corporel de l'animal - est observée à partir de 19 mois chez le rat Wistar. Cependant, le poids corporel s'abaisse à partir de 18 mois, pouvant accentuer une augmentation de masse cardiaque lorsque celle-ci est rapportée au poids corporel. Lorsque la masse ventriculaire est rapportée à la longueur du tibia, un paramètre plus stable que le poids corporel au cours de la sénescence dans cette étude (Yin et coll., 1982), elle n'est accrue que de 17% au lieu de 38% entre les âges de 6 et 24 mois. Une autre étude souligne également cette hypertrophie ventriculaire relative (masse relative au poids corporel) à partir de l'âge de 12 mois chez le rat WAG/Rij, la valeur obtenue à 6 mois étant supérieure à celle de rats de 12 mois (Michel et coll., 1994). Par contre, la masse ventriculaire gauche diminue chez des rats NWR entre 12 et 24 mois (Pfeffer et coll., 1982). De même, Hardouin et coll. (1993) et Chillon (1991) ont observé une réduction de la masse ventriculaire de rats Wistar âgés de 2 à 24 mois, et de rats Wistar et Fischer 344 entre 2 et 22 mois, respectivement (Tableau 3.2). Des valeurs stables de masse cardiaque ont été décrites par Pfeffer et coll. (1979) chez des rats WKY et NWR dont le poids corporel continue de croître avec l'âge. Quant à la masse ventriculaire droite, elle diminue avec la maturation entre 2 et 12 mois, mais demeure stable au cours du vieillissement entre 12 et 24 mois (présente étude). Des résultats similaires ont été obtenus par Pfeffer et coll. (1979) et Hardouin et coll. (1993). A l'inverse, Yin et coll. (1982) n'observent pas de variations jusqu'à 22 mois, mais une augmentation après cet âge, et Conrad et coll. (1991) une baisse à partir de 18 mois (Tableau 3.2).

En conclusion, les modifications de la capacité d'amortissement artériel associées à l'âge sont relativement modérées lorsque, mesurées par l'indice PPb/PPa, l'artère carotide est soumise à différents niveaux de pressurisation. Lors de la stimulation par la noradrénaline à un niveau de pression faible, la réactivité des artères carotides de rats non matures semblent plus faible que celle d'artères carotides de rats plus âgés. Les variations de $[Ca^{2+}]_i$ et d'indice d'amortissement artériel PPb/PPa sous cette stimulation sont moindres à l'âge de 2 mois. Par contre, aucune différence n'est observée au cours du vieillissement entre des rats âgés de 12 et 24 mois. Les différences d'élasticité artérielle observées entre les trois âges pourraient être liées à des variations de dimension - le diamètre s'accroît avec l'âge -, mais aussi à une calcification, bien que faible, des fibres élastiques de l'artère carotide - le taux de calcium est en effet augmenté à l'âge de 24 mois.

C'est dans le but de mieux analyser l'influence de cette calcification artérielle que nous avons réalisé une étude similaire sur des artères carotides de rats traités par l'association vitamine D₃ et nicotine (modèle VDN) conduisant à une hypercalcinoase vasculaire accélérée.

CHAPITRE IV

Modifications de l'élasticité de l'artère carotide liées au calcium dans un modèle de surcharge calcique vasculaire chez le rat : effets du traitement chronique par un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, le périndopril

1. Introduction

Le vieillissement vasculaire chez l'Homme se caractérise par une rigidification très importante du système artériel conduisant aux altérations hémodynamiques déjà citées (voir Chapitre précédent) telles que : diminution de la compliance artérielle, hypertension systolique isolée, augmentation de la vitesse de transmission de l'onde de pression, *etc.*

Chez l'animal, l'accroissement de la rigidité artérielle au cours du vieillissement est nettement moins prononcé que chez l'Homme ; il pourrait être lié dans les deux cas à une élévation du niveau de calcium pariétal. En effet, le taux de calcium total de l'aorte thoracique et de l'artère carotide de rat, est multiplié par 1,25 et par 1,49, respectivement entre les âges de 2 et 24 mois (Chapitre III). De plus, au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale, les artères carotides de rats âgés de 24 mois montrent une rigidité plus forte à 75 mmHg que celles de rats âgés de 2 ou 12 mois (Chapitre III). Comme nous l'avons vu précédemment, la rigidité vasculaire pourrait être due à une élastocalcinose plus faible chez les animaux que chez l'Homme au cours du vieillissement.

C'est dans le but d'analyser l'impact de l'élastocalcinose sur l'élasticité artérielle et aussi d'étudier l'une des modifications artérielles structurales et fonctionnelles du vieillissement vasculaire chez l'Homme, qu'a été développé un modèle animal de surcharge calcique vasculaire.

1.1. Modèle de surcharge calcique vasculaire chez le rat

La surcharge calcique vasculaire est induite chez des rats âgés de 2 mois par un seul jour de traitement consistant en l'administration de deux substances : la vitamine D₃ et la nicotine (modèle VDN ; voir Matériel et méthodes ; Atkinson, 1992).

1.1.1. Paramètres biologiques

A la suite du traitement vitamine D₃ et nicotine (VDN) suivi de 16 jours de repos, la calcémie est inchangée ($2,40 \pm 0,03$ par rapport à $2,37 \pm 0,02$ mmol/l chez les rats contrôles ; Henrion et coll., 1991a). La concentration de calcium tissulaire est par contre largement augmentée, 16 jours et un an après le traitement, plus particulièrement au niveau des grosses artères de compliance. Par exemple, cette concentration est multipliée par 13 et 15 dans l'aorte thoracique descendante, par 12 et 11 dans l'artère carotide de rats âgés de 3 et 14 mois, respectivement (Atkinson et coll., 1994a). Le contenu calcique est également amplifié dans d'autres vaisseaux périphériques tels que l'artère caudale et l'artère mésentérique, et dans d'autres organes tels que les reins et le cœur mais de façon moins prononcée (Henrion et coll., 1991a). Le traitement VDN est sélectif aux niveaux tissulaire et ionique, et l'accumulation calcique semble être sous forme de sels de phosphate (Atkinson, 1992). En effet, la phosphatémie est abaissée

tandis que le taux tissulaire de phosphate est augmenté, préférentiellement au niveau aortique (Henrion et coll., 1991a).

Les niveaux tissulaires des autres ions tels que le Na⁺, le K⁺, le Mg²⁺ restent inchangés, mais la concentration plasmatique de Na⁺ est diminuée, celle de K⁺ stable et celle de Mg²⁺ augmentée (Henrion et coll., 1991a). L'analyse plasmatique révèle également une légère baisse de l'urée et de la créatinine, tandis que cholestérol, triglycérides, protéines et glucose ne sont pas modifiés (Henrion et coll., 1991a).

1.1.2. Modifications structurales

L'étude histomorphométrique (voir Matériel et méthodes pour la description de la technique) d'aortes thoraciques de rats âgés de 2+1 et 2+4 mois (résultats non publiés) ne montre aucune modification des paramètres étudiés 1 mois après le traitement VDN. Par contre, 4 mois après, une augmentation du diamètre interne ($1,89 \pm 0,08$ par rapport à $1,57 \pm 0,05$ mm), sans modification de l'épaisseur de la média (72 ± 4 par rapport à 75 ± 4 μ m), est observée chez les rats VDN comparés aux témoins. De plus, le pourcentage d'élastine de la média thoracique est inchangé 1 mois après le traitement VDN ($43,6 \pm 1,1\%$ par rapport à $45,9 \pm 2,0\%$), mais diminué 4 mois après ($39,4 \pm 1,6\%$ par rapport à $43,7 \pm 1,3\%$; résultats non publiés).

Le traitement VDN induit une hypertrophie cardiaque chez les rats âgés de 3 et 6 mois, caractérisée par une augmentation du poids du ventricule gauche rapporté au poids corporel (résultats non publiés).

1.1.3. Localisation de la surcharge calcique vasculaire

La technique de Von Kossa a permis la mise en évidence de dépôts de calcium sur les lames élastiques, de préférence sur les 3 ou 4 lames les plus internes de la média (Henrion et coll., 1991a), les contrôles ne montrant pas de dépôts calciques. Seize jours après le traitement VDN, le calcium occupe $33,4 \pm 8,0\%$ de la surface des fibres élastiques de la média. De plus, lorsque la média de l'artère thoracique de rats âgés de 3 mois est mécaniquement séparée de l'adventice, la mesure du calcium dans chacune de ces deux tuniques révèle une répartition de 93% - 3% (rats VDN, n=13) par rapport à 54% - 46% (rats témoins, n=10) entre la média et l'adventice, respectivement (résultats personnels, non publiés).

Sur une artère musculaire de faible diamètre, l'artère caudale de rat, le traitement VDN élève non seulement la concentration de calcium pariétal total, mais également de celle du calcium intracellulaire (Thorin-Trescases et coll., 1990). Cependant, l'augmentation de la concentration de ce dernier est faible par rapport à celle de la quantité de calcium lié à l'élastine.

1.1.4. Modifications fonctionnelles

La pression différentielle des rats VDN est majorée aux âges de 3 et 14 mois (40 ± 3 et 37 ± 3 mmHg par rapport à 30 ± 2 et 24 ± 3 mmHg, respectivement). A ces deux âges, la compliance artérielle systémique est diminuée ($6,0\pm 1,0$ et $5,2\pm 0,3$ par rapport à $11,2\pm 2,4$ et $7,2\pm 1,2$ $\mu\text{l}/\text{mmHg}$, respectivement ; Atkinson et coll., 1994a). L'impédance caractéristique aortique n'est accrue qu'à celui de 3 mois (26400 ± 5770 par rapport à 12360 ± 1920 dynes \times sec/cm⁵). Aucune altération de la pression artérielle moyenne et des résistances périphériques totales n'est observée. Par contre, à 3 et 6 mois, la pression artérielle systolique est augmentée (146 ± 2 et 171 ± 5 par rapport à 130 ± 2 et 145 ± 5 mmHg, respectivement ; résultats non publiés). La transmission de l'onde de pression au niveau aortique est également accélérée et, de plus, significativement corrélée au taux de calcium aortique (Atkinson et coll., 1994a).

La compliance carotidienne *in situ* diminue nettement et significativement, indépendamment de la pression appliquée. De plus, elle est inversement corrélée au contenu carotidien de calcium (Atkinson et coll., 1994a).

Ainsi, le modèle VDN permet d'étudier les relations entre la calcification, plus particulièrement des fibres élastiques, et la perte d'élasticité vasculaires. Un traitement chronique par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion réduit la calcification artérielle (Fleckenstein et coll., 1990). Ainsi, une diminution de la calcification artérielle pourrait être bénéfique dans l'atténuation des conséquences hémodynamiques telles que la diminution de la compliance artérielle. L'implication du calcium intracellulaire a été démontrée indirectement : l'administration d'inhibiteurs de flux calciques chez l'Homme améliore la compliance artérielle (Safar et coll., 1989 ; Van Merode et coll., 1990). Ainsi, la rigidification artérielle pourrait provenir d'une élévation non seulement du calcium extracellulaire, mais aussi du calcium cytoplasmique.

1.2. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion

L'enzyme de conversion est une enzyme clef dans la conversion de l'angiotensine I en un octapeptide, l'angiotensine II (Ang II), peptide actif du système rénine-angiotensine (Dzau et Pratt, 1991). L'interaction Ang II - récepteur se traduit par une activation de la voie des phosphoinositols avec formation d'IP₃ et aboutit à une augmentation du Ca²⁺ libre cytosolique. En plus du système rénine-angiotensine circulant, l'existence de l'enzyme de conversion, de la rénine, de l'angiotensinogène et de l'Ang II a été démontrée dans les vaisseaux sanguins (Dzau et Safar, 1988).

L'Ang II est un agent vasoconstricteur puissant ; elle agit principalement sur le lit vasculaire artériel et augmente les résistances vasculaires systémiques. L'Ang II stimule également la sécrétion d'aldostérone. Elle peut amplifier la libération de catécholamines des terminaisons nerveuses adrénérgiques et par conséquent accroître le tonus vasculaire local en réponse à une activation sympathique (Malik et Masjlett, 1976). Ainsi, le système rénine-angiotensine joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie cardio-vasculaire et toute inhibition de ce système peut induire des modifications hémodynamiques bénéfiques, chez les personnes hypertendues par exemple (Simon et coll., 1985 ; Lees et Reid, 1987).

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (IECA) suppriment la formation endogène de l'Ang II. Par leur effet hypotenseur ou un effet artériel direct, ils peuvent s'opposer à l'épaississement de la paroi artérielle et à l'hypertrophie myocardique - survenant au cours du vieillissement (Michel et coll., 1994) et de l'hypertension (Lévy et coll., 1988 ; Safar et coll., 1992) - et par conséquent améliorer les performances vasculaire et cardiaque (Richer et coll., 1986). Les IECA exercent également une action bénéfique sur la compliance artérielle qu'ils augmentent chez l'animal ou l'Homme hypertendu (Safar et coll., 1986 ; Lévy et coll., 1990).

Le périndopril (IRIS, Servier, Courbevoie, France ; Figure 4.1) est un puissant inhibiteur de l'enzyme de conversion, dépourvu de groupement thiol, à effets prolongés et actif par voie orale. Il est en fait une *prodrug* dont le métabolite diacide, le périndoprilate, est 1000 fois plus actif. Sa CI_{50} plasmatique est de 2 nM chez l'Homme (Jackson et coll., 1987) ou chez le rat (Johnston et coll., 1988). Ses propriétés physicochimiques et pharmacologiques ont été présentées par différents auteurs (Lees et Reid, 1990 ; McFayden et coll., 1990).

Les effets d'un traitement à long terme (1 an) par le périndopril ont été appréciés à l'égard des modifications structurales et des conséquences fonctionnelles engendrées par le traitement VDN initial. De plus, les altérations potentiellement concomitantes de réactivité vasculaire, avec mesure de $[Ca^{2+}]_i$, sur la capacité d'amortissement artériel, ont également été recherchées.

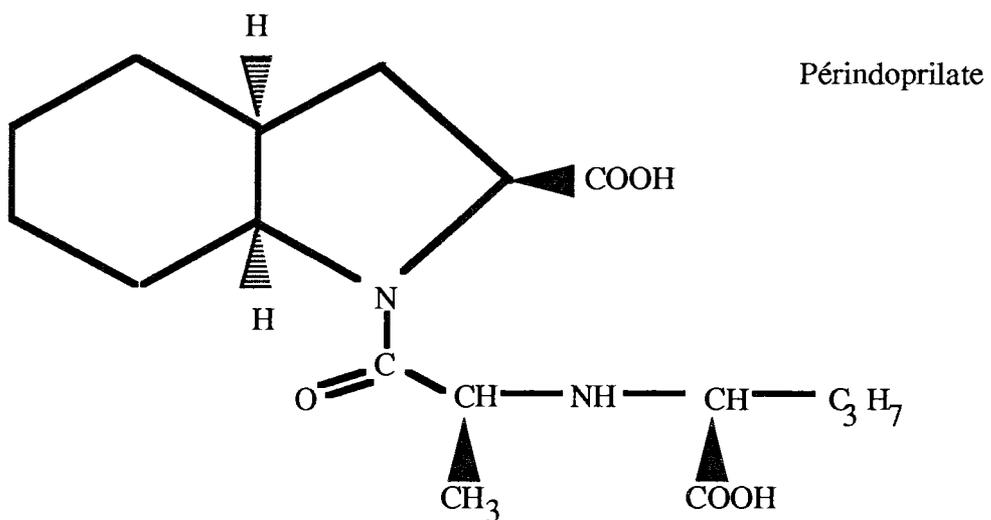
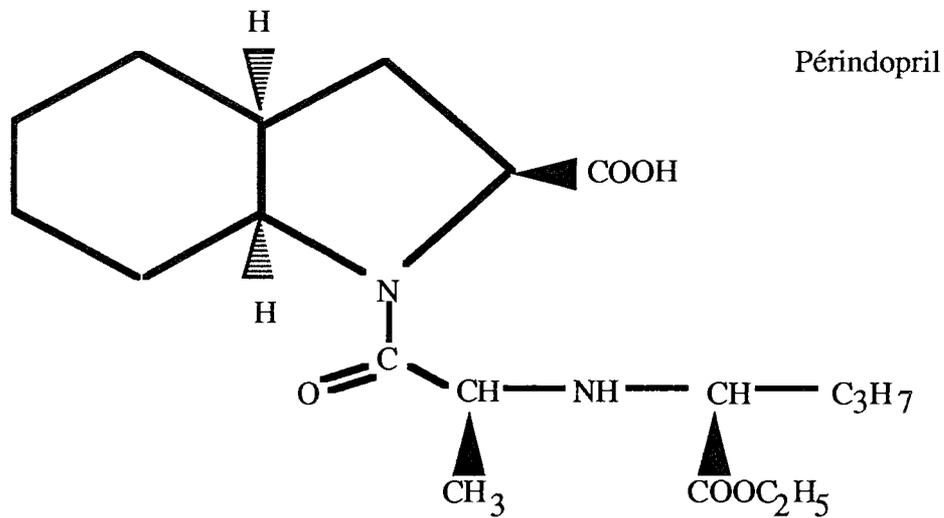


Figure 4.1. Structure chimique du périndopril (acide libre, S-9490) et de son métabolite actif, le périndoprilate (S-9780).

2. Matériel et méthodes

2.1. Animaux

Les animaux utilisés sont des rats Wistar mâles non consanguins (Iffa Credo), âgés de 2 mois à leur arrivée ; ils disposent *ad libitum* de nourriture (AO4, UAR, contenant 150 mmoles/l de calcium) et d'eau adoucie (Aqua-Clear, Culligan®, composition : Ca 28, Mg 7, Na 4, Cl 28, SO₄ 6, NO₃ 64 µmoles/l). L'animalerie a une température maintenue à 22°C, sous un cycle d'alternance lumière/obscurité de 12/12 heures.

2.2. Traitement

2.2.1. Induction de la surcharge calcique

Les 45 rats de l'étude sont initialement séparés en 2 groupes au jour J1 :

- un groupe VDN (n=22) reçoit simultanément, d'une part, une dose unique de 300 000 UI/kg (1 ml/kg, voie intramusculaire) de cholécalférol (Vi-Dé 3 Hydrosol®, Wander SA, Berne, Suisse), et d'autre part, une première dose de 25 mg/kg (5 ml/kg, voie orale) de nicotine (solution aqueuse extemporanée ; bitartrate, Sigma). Une seconde dose identique de nicotine est administrée le soir même à 17h00.

- un groupe témoin (TEM, n=23) reçoit simultanément à 9h00, une injection de NaCl 0,15 M (1 ml/kg, voie intramusculaire) et une première administration de 5 ml/kg d'eau distillée (voie orale). Un volume similaire d'eau distillée est administré le soir même.

2.2.2. Inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I

Vingt-quatre heures après l'induction de la surcharge calcique, chacun des deux groupes de rats est séparé en 2 sous-groupes après randomisation selon le niveau de pression artérielle systolique mesurée par pléthysmographie. Les groupes traités par l'IECA reçoivent une dose de 1 mg/kg/j de périndopril *tert*-butylamine (S-9490-3 ; IRIS, Courbevoie, France) dans l'eau de boisson, tandis que les autres ne reçoivent que l'eau de boisson. Quatre groupes sont ainsi constitués :

- TEM/PLACEBO : rats témoins placebo non traités par le périndopril (n=11),
- TEM/IECA : rats témoins traités par le périndopril (n=12),
- VDN/PLACEBO : rats VDN placebo non traités par le périndopril (n=12),
- VDN/IECA : rats VDN traités par le périndopril (n=10).

2.3. Mesures au cours du traitement

Tous les 3 jours, les rats sont pesés, la consommation de nourriture et de boisson est relevée. En fonction de cette dernière et du poids corporel, la concentration du périndopril dans l'eau de boisson est ajustée tous les 3 jours pour maintenir une dose journalière de 1 mg/kg.

Au jour 0 (J0) la pression artérielle systolique (PAS, mmHg) est mesurée par pléthysmographie (Chillon, 1991). Chaque valeur individuelle est la moyenne de 3 mesures successives. Le rythme cardiaque (RC, battements par minute, bpm) est également mesuré. Les mesures de PAS et de RC sont répétées tous les mois.

2.4. Protocoles expérimentaux

2.4.1. Etude des propriétés visco-élastiques et du rôle du calcium intracellulaire

2.4.1.1. Prélèvement de l'artère carotide

Le prélèvement du segment de l'artère carotide se fait dans les mêmes conditions que celles décrites dans le Chapitre précédent avec détermination du coefficient de rétraction longitudinale L/L_0 , retrait mécanique de l'endothélium et fixation du segment à sa longueur *in situ*.

2.4.1.2. Cycles rapides de pressurisation intraluminale

Une fois le segment carotidien relié au système de pressurisation pulsée, il est perfusé pendant 15 min. Les segments sont soumis à 4 cycles rapides de pressurisation-dépressurisation de la pression basale à 150 mmHg, puis retour à la pression basale. Avant le premier et à la suite de chacun de ces cycles, la PIM et PPb/PPa sont mesurés.

2.4.2.3. Cycles lents de pressurisation intraluminale

Le segment carotidien est soumis à une pressurisation intraluminale de 25 à 150 mmHg par palier de 25 mmHg de 5 min chacun, selon les protocoles précédemment décrits. A la fin du dernier palier (150 mmHg), le segment subit une diminution de la pressurisation par retour de la PIM à 25 mmHg en 2 min.

2.4.2.4. Stimulation par la noradrénaline

Le segment carotidien est stimulé par superfusion de noradrénaline (NA, 10 μ M) pendant 10 min. A la fin de cette période, le segment est de nouveau superfusé avec une solution de Krebs. Les signaux fluorescents sont mesurés ainsi que la PIM et PPb/PPa, et Δ PPb/PPa% et Δ R'% sont calculés comme précédemment.

2.4.2.5. Effets d'un ionophore et d'un chélateur du calcium lors de la calibration de fluorescence

A la suite de la stimulation par la NA, est réalisée la calibration de fluorescence utilisant ionomycine et EGTA pour le calcul de R'_{\max} et R'_{\min} . Le segment carotidien est perfusé avec une solution de Krebs contenant 2 μ M de ionomycine et 4 mM de calcium jusqu'à l'obtention de la fluorescence maximale. PPb/PPa et PIM sont enregistrés simultanément ; R'_{\max} et Δ R'%

correspondants sont calculés. Le segment est ensuite perfusé et superfusé par une solution de Krebs dépourvue de Ca^{2+} et contenant 5 mM d'EGTA, 2 μM d'ionomycine, jusqu'à l'obtention d'une fluorescence minimale. PPb/PPa et PIM enregistrés sont simultanément et R'_{\min} calculé. Après la détermination de R'_{\max} et R'_{\min} , une seconde estimation de l'autofluorescence est obtenue par perfusion du segment par une solution de Krebs dépourvue de Ca^{2+} et contenant 1 mM MnCl_2 et 2 μM d'ionomycine.

2.4.2. Etude histomorphométrique

2.4.2.1. Préparation des coupes histologiques

Après prélèvement de l'artère carotide gauche, le rat est perfusé pendant 1 heure (*via* l'artère carotide droite) avec une solution saline de formol 10% tamponnée (NaCl 120 nmol/l, KCl 2,7 nmol/l, dans un tampon phosphate 10 nmol/l, pH 7,4 à 25°C). Cette perfusion se fait à la pression artérielle moyenne du rat (estimée d'après sa PAS) afin de conserver la géométrie *in vivo* des organes.

Après cette perfusion fixatrice, des segments d'artère carotide sont prélevés et conservés dans la solution de formol à 4°C pendant 4 à 5 jours permettant une fixation complémentaire.

Les segments subissent une déshydratation progressive par passages successifs dans des solutions d'alcool de degré alcoolique croissant (éthanol 70° (1 h), 95° (2h), 100° (1h)) puis dans du butanol (2 h).

Les segments sont ensuite inclus dans de la paraffine et laissés toute une nuit à l'étuve (57°C). Le lendemain, des blocs de paraffine contenant les segments sont réalisés.

Des coupes histologiques sont réalisées au microtome : 20 μm pour la mesure des diamètres et épaisseur médiale, 10 μm pour les mesures du nombre moyen et de l'épaisseur des fibres élastiques et du pourcentage d'élastine dans la média.

Les coupes subissent un déparaffinage par passages successifs dans des solutions de toluène (15 min), éthanol 100° (5 min), 95° (5 min), 70° (5 min), puis sous eau courante (5 min).

Les coupes de 20 μm d'épaisseur sont colorées par le mélange hématoxyline-éosine (coloration topographique non spécifique), et les coupes de 10 μm selon la technique de Weigert : mélange fuchsine basique-résorcine, spécifique du tissu élastique (Ganter et Jollès, 1970).

2.4.2.2. Analyse histomorphométrique

Cette analyse a été réalisée avec l'aide de N. Niederhoffer (Laboratoire de Pharmacologie Cardio-vasculaire, Nancy) au sein de l'unité INSERM U308 du Professeur J.P. Nicolas (Nancy).

Le système d'analyse d'images comporte un microscope orthoplan (Leitz, Weitzlar, Allemagne), une caméra CCD monochrome (XC 77, Sony, Tokyo, Japon ; 1 pixel = 2.3 μ m) et un microordinateur (Macintosh Iix, Apple Computer, Cupertino, CA, USA). La mesure des dimensions des artères est réalisée grâce à un logiciel d'analyse d'images (Optilab, Graftek, Meudon-la-Forêt, France).

2.4.3. Détermination de l'hypertrophie cardiaque

Après prélèvement des cœurs, une dissection est effectuée afin de ne conserver que les ventricules (VG+VD) dont le poids frais est mesuré. Une dissection supplémentaire permet d'isoler le ventricule gauche incluant le septum (VG) dont le poids frais est également mesuré. Par différence de ces deux poids mesurés, le poids du ventricule droit (VD) correspondant à sa paroi externe est calculé. Les résultats sont également exprimés en poids ventriculaire relatif, c'est-à-dire par le rapport poids ventriculaire / poids corporel.

2.4.4. Dosage du calcium tissulaire total

Le dosage du calcium tissulaire total s'effectue par la technique décrite dans le paragraphe 2.9 sur l'aorte abdominale et thoracique, les artères carotide, rénale et caudale, le myocarde, le rein, le foie et le duodénum.

2.4.5. Dosage des protéines tissulaires solubles dans l'acide

Ce dosage a été effectué selon la méthode de Lowry et coll. (1951).

Le poids frais d'un échantillon d'organe est déterminé (20 mg environ, aortes abdominale et thoracique, artères carotide, rénale et caudale, myocarde, rein, foie et duodénum). L'échantillon est ensuite broyé pendant 2 min en présence d'une solution (500 μ l pour les artères et 1 ml pour les autres organes) d'acide perchlorique 0,3 M (Merck) contenant 1% de dodécyl sulfate de sodium (Aldrich Chemical Co., Gillingham, Dorset, Royaume-Uni). Les échantillons sont ensuite centrifugés à 2000g pendant 20 min. Deux cents μ l de surnageant sont prélevés, dilués au 1/2 pour les artères et au 1/4 pour les autres organes, auxquels sont additionnés 1,5 ml de réactif C. Ce réactif C est composé de 100 ml d'une solution de soude 0,1 M contenant 0,2% (poids/volume) de carbonate disodique (Merck) et de 20 ml d'une solution de 0,5% de sulfate de cuivre et 1% de tartrate de sodium et de potassium (Merck). Cent cinquante μ l de réactif de Folin Ciocalteu (Prolabo, Paris, France) sont ajoutés et mélangés. Puis les échantillons sont laissés au repos pendant 30 min à 37°C avant lecture. La lecture est effectuée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 562 nm (UV120-02, Shimadzu Co., Kyoto, Japon). Une gamme d'étalonnage effectuée à partir d'une solution de BSA (Sigma) dans l'acide perchlorique 0,3 M permet le calcul de la concentration en protéines exprimée en mg/g de poids frais de l'organe.

2.4.6. Activité de l'enzyme de conversion

Ces dosages ont été réalisés dans le Service du Professeur C. Burlet (CHRU Brabois, Vandœuvre-lès-Nancy, France).

Après le prélèvement de l'artère carotide gauche et avant la fixation au formol, un échantillon sanguin (3 ml) est prélevé à 4°C sur tube hépariné (12,5 UI/ml de sang) à partir de l'artère carotide droite cathétérisée. Les échantillons sont centrifugés à 4°C à 1000g pendant 15 min. Le plasma est recueilli et stocké à -80°C jusqu'au jour de l'analyse pour la détermination de l'activité plasmatique de l'enzyme de conversion (AEC ; Ryan et coll., 1977).

L'activité plasmatique de l'enzyme de conversion est déterminée par dosage fluorimétrique. L'enzyme de conversion hydrolyse l'angiotensine I (décapeptide) en angiotensine II (octapeptide) avec formation du dipeptide His-Leu. Ce dipeptide est également libéré par action de l'enzyme de conversion sur le substrat artificiel carbobenzoxyphénylalaninyl-His-Leu (CBZ). Ainsi, le dosage de l'activité de l'enzyme de conversion (mmol/ml/min) est basé sur la mesure de la libération de His-Leu à partir de CBZ après dérivation fluorescente (O-phtaldialdéhyde).

2.4.7. Dosage des catécholamines plasmatiques

Ces dosages ont été réalisés avec l'aide de P. Giummelly (Laboratoire de Pharmacologie Cardio-vasculaire, Faculté de Pharmacie, Nancy) d'après une technique déjà décrite par Thorin et Atkinson (1994), basée sur l'extraction des catécholamines en présence d'alumine activée. Une partie du plasma recueilli précédemment (500 µl) est stockée à -80°C jusqu'au jour du dosage.

Les 500 µl sont décongelés à 4°C ; dans chaque tube, sont additionnés 15 mg d'oxyde d'alumine (Millipore-Waters, Bedford, USA), 20 µl d'une solution d'acide perchlorique 0,3 M (Merck) contenant 36 nM de 3,4-dihydroxybenzylamine (étalon interne, DHBA ; Sigma), et 100 µl d'une solution contenant 0,13 M d'EDTA disodique (Na₂EDTA ; Merck) et 53 mM de métabisulfite de sodium (Na₂S₂O₅ ; Merck). Le pH de la solution finale est ajusté à 8,6 avec 0,25 ml de tampon Tris (hydroxyméthyl-aminométhane)-HCl 2 M (pH 8,6 ; Merck). Les échantillons sont placés sur un mélangeur rotatif à 4°C pendant 15 min pour permettre l'adsorption des catécholamines sur l'alumine. L'alumine récupérée est ensuite lavée trois fois avec 2 ml d'eau tri-distillée à 4°C puis les catécholamines sont éluées par addition de 50 µl d'acide perchlorique 0,3 M suivie d'une filtration (microfiltre d'acétate de cellulose 0,45 µm ; Millipore). Vingt cinq µl de l'éluat sont injectés dans le système de chromatographie liquide haute performance (Waters, Bedford, USA) comprenant une pompe (modèle 510), un injecteur (modèle U6K), une colonne de silice 5 µm (Resolve C18) et un détecteur électrochimique dont le potentiel est fixé à +0,6 V (modèle 460) équipé d'une électrode en carbone de verre. Les échantillons sont élués à une vitesse de 0,8 ml/min avec une phase mobile constituée de 0,1 M NaH₂PO₄, 0,05 mM Na₂EDTA, 0,52 mM d'octyl sulfate de sodium (Sigma) et 8% (vol/vol) de méthanol (Carlo Erba, Milan, Italie). Les quantités de noradrénaline et d'adrénaline sont calculées à partir de la hauteur

du pic d'éluion rapportée à celle de l'étalon interne. La limite de détection est de 0,4 pg et le rendement de l'extraction de 60-70% (Thorin et Atkinson, 1994).

2.5. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm esm ($m \pm esm$). Les différentes moyennes ont été comparées à l'aide d'une ANOVA à 2 facteurs (effet VDN et effet IECA), associée au test de comparaison multiple de Scheffé. L'hypothèse nulle est rejetée à un niveau de probabilité $P < 0,05$.

3. Résultats

3.1. Pression artérielle systolique et rythme cardiaque

L'évolution de la PAS est représentée sur la Figure 4.2 (Tableau 7.1 en annexe) et les valeurs de F et de probabilité de l'ANOVA à 2 facteurs (VDN et IECA) sont indiquées pour certains jours dans le Tableau 4.1.

Le traitement VDN augmente la PAS de 25% à 30 jours et de 34% à 90 jours. A 400 jours, la PAS est stabilisée à 164 ± 5 mmHg (valeur identique à celle de 90 jours), soit une augmentation de 34% par rapport à la valeur initiale (122 ± 2 mmHg).

Le traitement IECA abaisse la PAS aussi bien chez les rats VDN que chez les rats TEM de 30 à 400 jours. A 400 jours, le traitement IECA a diminué la PAS de 14% chez les rats TEM et de 16% chez les rats VDN.

La Figure 4.3 (Tableau 7.2 en annexe) représente l'évolution du rythme cardiaque au cours de l'étude. Au jour 400, le rythme cardiaque n'est affecté par aucun des deux traitements, VDN ($F=0,2$; $P=0,6464$) et IECA ($F=1,1$; $P=0,3012$). Ces valeurs sont de 409 ± 17 et 391 ± 17 bpm chez les rats VDN/IECA et VDN/PLACEBO, et de 386 ± 11 et 400 ± 19 bpm chez les rats TEM/IECA et TEM/PLACEBO, respectivement.

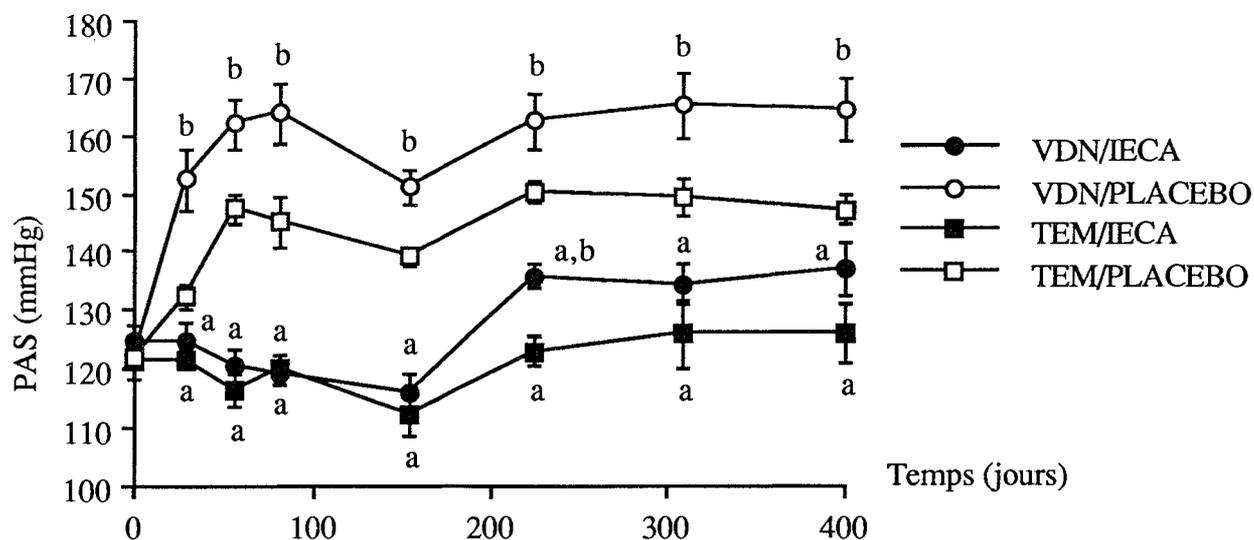


Figure 4.2. Evolution de la pression artérielle systolique (PAS) au cours de l'étude. (a) $P < 0,05$ par rapport à PLACEBO, (b) $P < 0,05$ par rapport à TEM.

Tableau 4.1. ANOVA à 2 facteurs de la pression artérielle systolique. Valeurs de F et probabilité. (*) $P < 0,05$.

Jours	Effet VDN		Effet IECA		Interaction	
	F	P	F	P	F	P
J0	0,4	0,5093	0,3	0,6005	0,4	0,5296
J30	12,2*	0,0011	32,7*	0,0001	6,4*	0,0152
J90	5,2*	0,0270	76,9*	0,0001	6,0*	0,0187
J224	15,8*	0,0003	74,9*	0,0001	0,01	0,9197
J400	9,4*	0,0039	27,4*	0,0001	0,4	0,5244

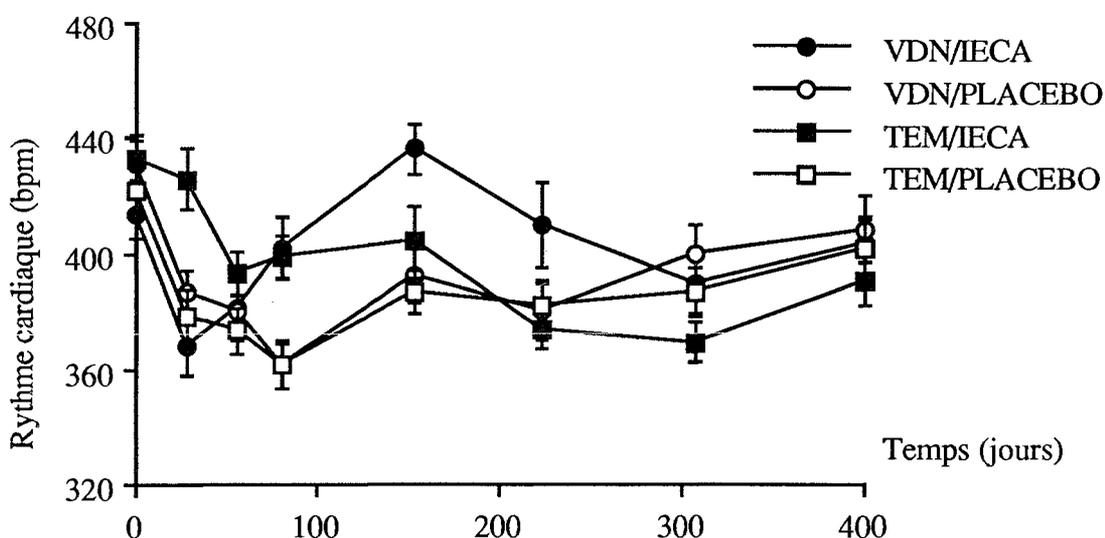


Figure 4.3. Evolution du rythme cardiaque ($m \pm sm$) au cours de l'étude.

3.2. Poids corporel et consommations de nourriture et de boisson

Initialement, la consommation de nourriture des rats VDN est moindre que celle des rats TEM (Figure 4.4 ; Tableau 7.3 en annexe). Par exemple, à J4 elle est de 39 ± 2 chez les rats VDN/PLACEBO par rapport à 90 ± 1 g/kg/j chez les rats TEM/PLACEBO. Le traitement IECA abaisse cette consommation chez les rats VDN (21 ± 1 g/kg/j, $P < 0,05$ par rapport à VDN/PLACEBO). A ce même jour J4, la consommation de boisson est similaire entre les groupes à l'exception de celle des rats VDN/PLACEBO dont la valeur est significativement supérieure de 22,9% (Figure 4.5 ; Tableau 7.4 en annexe). Le poids corporel des rats VDN s'abaisse (25-26%), que les rats soient traités IECA ou non (Figure 4.6, et Tableau 7.5 en annexe ; Tableau 4.2). Dès les jours suivants, l'évolution des consommations de boisson et de nourriture est similaire dans tous les groupes avec une baisse progressive au cours du temps (Figures 4.4 et 4.5 ; Tableaux 7.3 et 7.4 en annexe). Après le quatrième jour, les rats VDN reprennent une croissance corporelle normale ; ainsi à J30 les poids corporels ne sont plus inférieurs que de 7,9% et de 10,3% chez les rats VDN traités ou non par l'IECA, respectivement (Figure 4.6 ; Tableau 4.2). A partir de J150, l'effet VDN disparaît, mais apparaît un effet IECA qui se traduit par un poids corporel plus faible chez les rats traités IECA. En fin d'étude (J400), l'effet IECA est toujours présent (Tableau 4.2), mais préférentiellement chez les rats TEM : 614 ± 17 g chez les TEM/IECA par rapport à 663 ± 15 chez les TEM/PLACEBO ($P < 0,05$), et 575 ± 15 chez les VDN/IECA par rapport à 620 ± 14 chez les VDN/PLACEBO ($P > 0,05$).

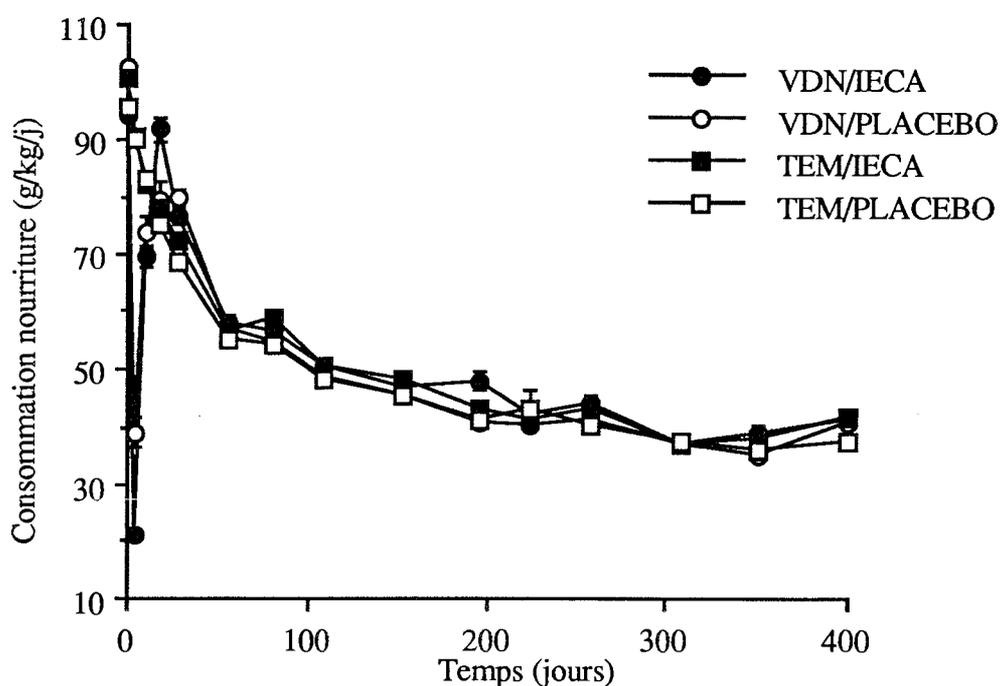


Figure 4.4. Evolution de la consommation de nourriture au cours de l'étude.

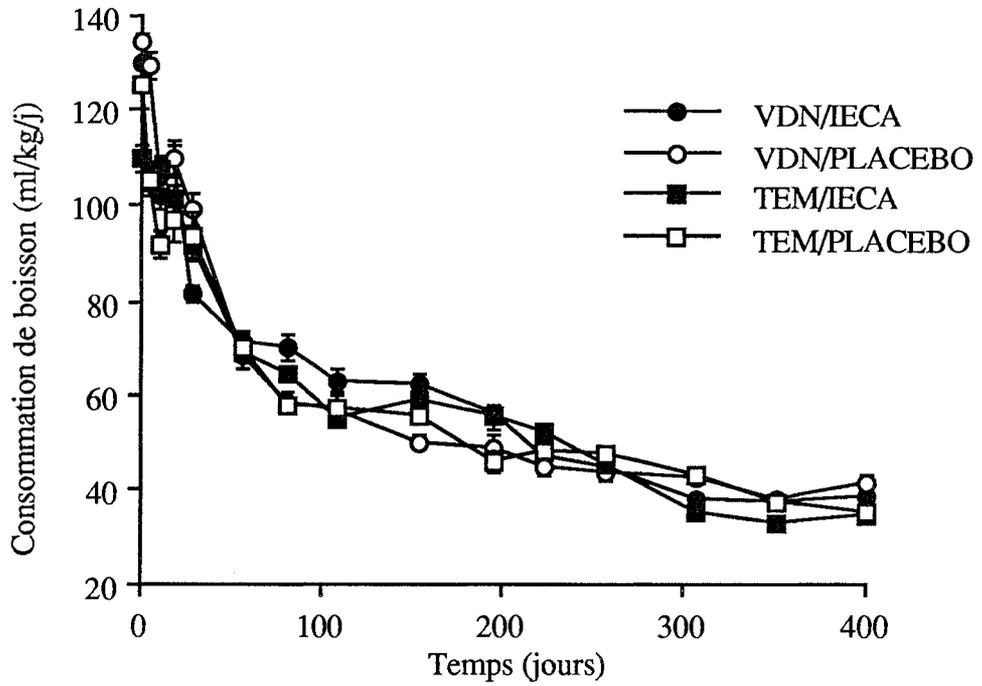


Figure 4.5. Evolution de la consommation de boisson au cours de l'étude.

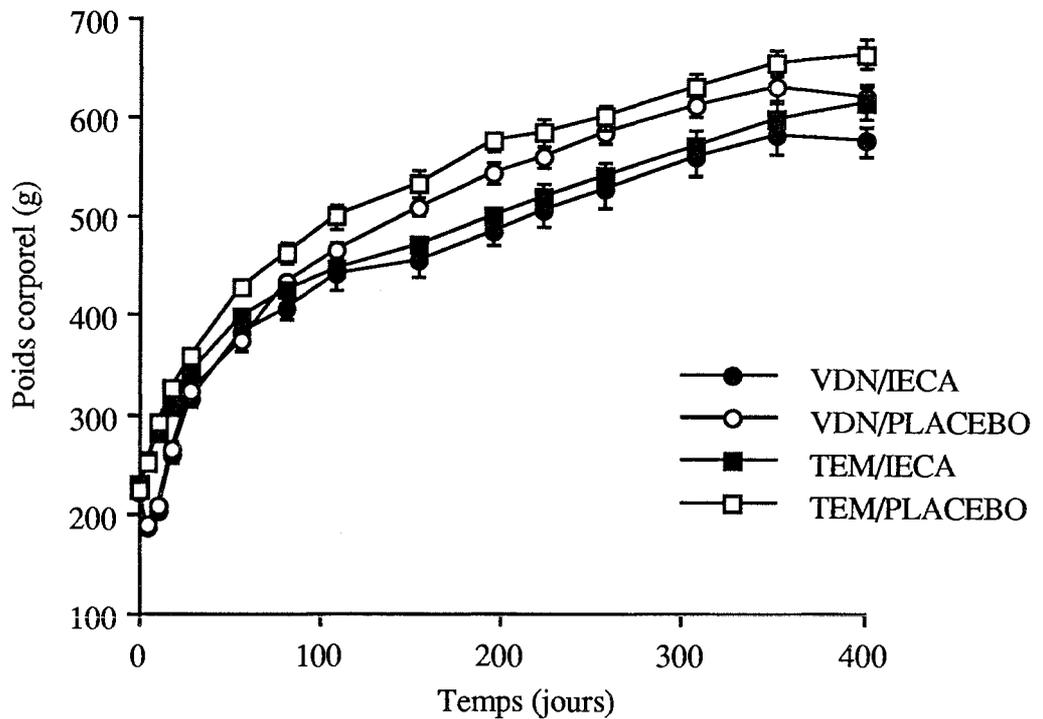


Figure 4.6. Evolution du poids corporel au cours de l'étude.

Tableau 4.2. ANOVA à 2 facteurs du poids corporel. Valeurs de F et probabilité ((*) P<0,05).

	<u>Effet VDN</u>		<u>Effet IECA</u>		<u>Interaction</u>	
	F	P	F	P	F	P
J4	641,7*	0,0001	0,1	0,721	1,0	0,315
J30	27,9*	0,0001	4,8*	0,034	0,7	0,415
J90	7,5*	0,009	13,3*	0,0007	0,5	0,478
J224	2,2	0,143	21,4*	0,0001	0,1	0,750
J400	3,2	0,080	4,4*	0,042	0,5	0,501

3.3. Etude des propriétés visco-élastiques et du rôle du calcium intracellulaire

3.3.1. Coefficient de rétraction longitudinale

Les coefficients de rétraction de l'artère carotide des rats VDN sont significativement réduits par rapport à ceux des rats TEM (F=104 ; P=0,0001), ceci quel que soit le traitement. Par contre, le traitement par l'IECA n'a aucun effet (F=0,24 ; P>0,05). L'effet VDN est significatif tant chez les rats traités par l'IECA ($1,201 \pm 0,030$ dans le groupe VDN/IECA par rapport à $1,472 \pm 0,022$ dans le groupe TEM/IECA, P<0,05) que chez les rats PLACEBO ($1,213 \pm 0,027$ dans le groupe VDN/PLACEBO par rapport à $1,436 \pm 0,016$ dans le groupe TEM/PLACEBO, P<0,05).

3.3.2. Cycles rapides de pressurisation intraluminale

Les valeurs initiales de l'indice d'amortissement artériel PPb/PPa sont significativement supérieures chez les rats VDN à celles des rats TEM (Figure 4.7 ; Tableau 7.6 en annexe). L'indice PPb/PPa des segments carotidiens des rats VDN a une valeur proche de 1 indiquant une perte de la capacité à amortir un signal de pression pulsée et ceci quel que soit le nombre de cycles de pressurisation effectué. Par contre, cet indice diminue progressivement pour les segments de rats TEM de façon similaire à ce qui a été observé dans les deux Chapitres précédents. Par une ANOVA à 3 facteurs (VDN, IECA et Cycle), les valeurs F sont respectivement égales à 518,6 (P=0,0001), 0,004 (P=0,9483) et 2,6 (P=0,0374) avec une interaction entre les effets VDN et IECA (F=4,4 et P=0,0374). En considérant les valeurs cycle par cycle, cette interaction disparaît et seul l'effet VDN persiste. Après le 4^{ème} cycle, l'effet VDN est caractérisé par une valeur F=143,0 (P=0,0001) et l'effet IECA par F=0,3 (P=0,1839) sans interaction.

La PIM de base n'est pas modifiée par la série de cycles rapides de pressurisation intraluminale. Les valeurs initiales et mesurées après le quatrième cycle sont de $21,1 \pm 1,4$ et $20,9 \pm 1,4$ mmHg (rats TEM/IECA), de $21,0 \pm 0,9$ et $20,7 \pm 0,8$ mmHg (rats TEM/PLACEBO), de $21,5 \pm 0,6$ et $21,3 \pm 0,8$ mmHg (rats VDN/IECA) et de $21,1 \pm 0,9$ et $20,9 \pm 0,8$ mmHg (rats VDN/PLACEBO), respectivement.

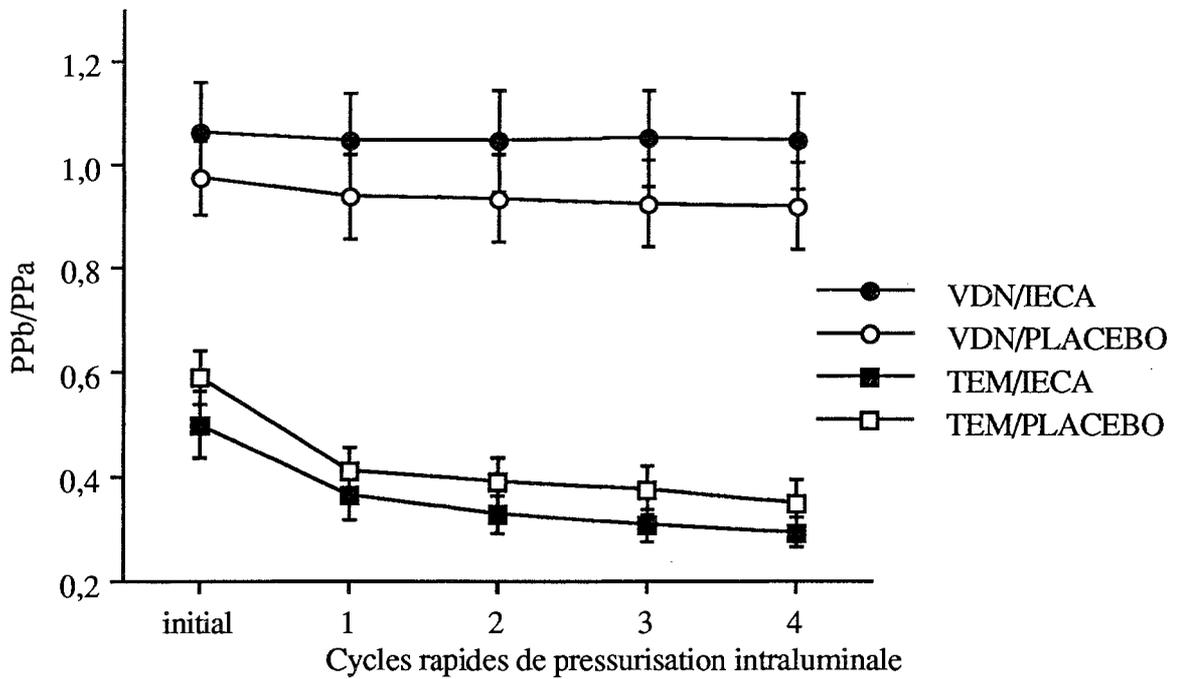


Figure 4.7. Effets de 4 cycles rapides de pressurisation intraluminale sur l'indice d'amortissement artériel (PPb/PPa).

3.3.3. Cycles lents de pressurisation intraluminale

L'évolution de la relation PIM-PPb/PPa est similaire à celle observée dans les Chapitres précédents pour les segments de rats TEM/PLACEBO (Figure 4.8 ; Tableau 7.7 en annexe). Les valeurs de PPb/PPa sont minimales aux faibles PIMs (25-50 mmHg) indiquant une capacité maximale d'amortir un signal de pression pulsée. A partir de 100 mmHg, les valeurs de PPb/PPa sont maximales, c'est-à-dire proches ou égales à 1, traduisant une perte de cette capacité d'amortissement (Figure 4.8 ; Tableau 7.7 en annexe). Les segments carotidiens des rats VDN/PLACEBO se caractérisent par une valeur de PPb/PPa indépendante de la PIM imposée et proche ou égale à 1. Ceci est également souligné sur la Figure 4.9 qui représente les profils des signaux de pression chez les rats TEM et VDN non traités.

L'ANOVA à 2 facteurs (PIM et IECA), réalisée pour les segments de rats TEM indique une significativité de l'effet PIM ($P=0,0001$), sans effet IECA ($P=0,3135$), mais avec une interaction significative ($P=0,0464$). La même analyse réalisée pour les segments de rats VDN ne montre aucune significativité, ni d'interaction ($P>0,2$).

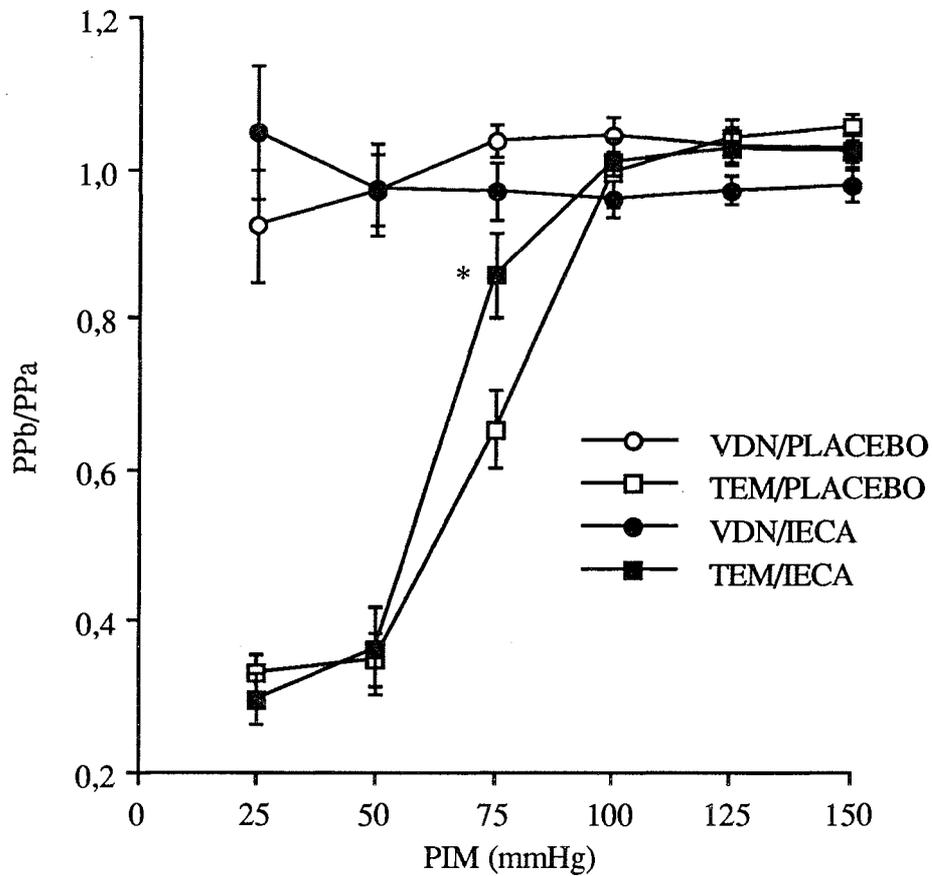


Figure 4.8. Effets d'un cycle lent de pressurisation intraluminaire sur l'indice d'amortissement artériel (PPb/PPa).

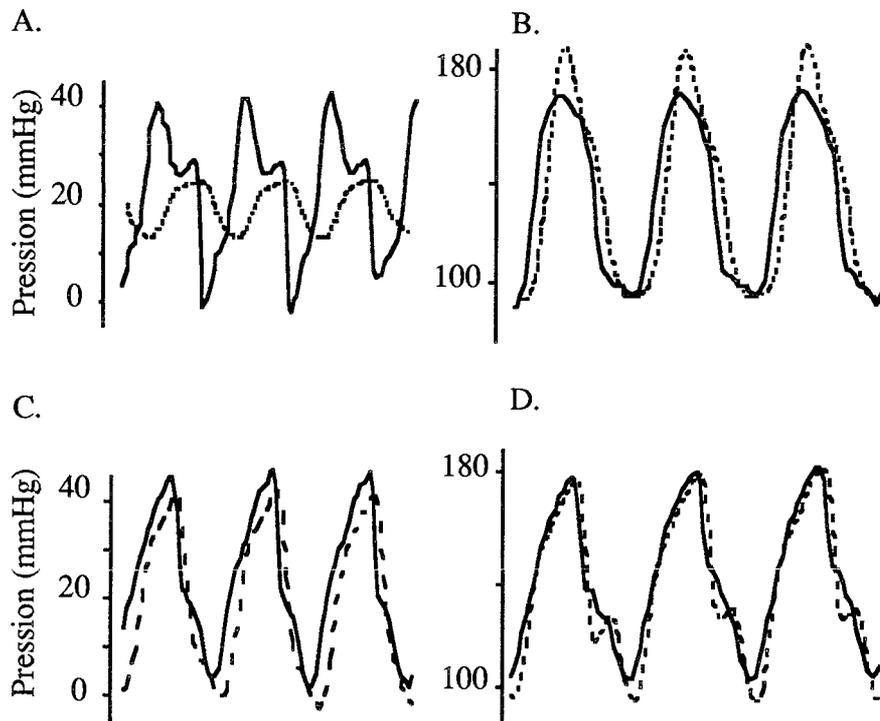


Figure 4.9. Effets du traitement VDN sur les profils des signaux de pression enregistrés par les capteurs de pression "a" placé avant (trait continu) et "b" placé après (trait pointillé) l'artère, à 25 mmHg (A et C) et à 150 mmHg (B et D). A et B : artère carotide de rat TEM/PLACEBO, C et D : artère carotide de rat VDN/PLACEBO.

Le traitement IECA semble dépourvu d'effet sur PPb/PPa, à l'exception de certains niveaux de PIM. A 75 mmHg, l'ANOVA à 2 facteurs (VDN et IECA), indique une valeur F respectivement égale à 32,8 (P=0,0001) et à 1,44 (P>0,05) avec une interaction significative (F=7,7 et P=0,008), révélant une valeur de PPb/PPa supérieure chez les rats TEM/IECA à celle des rats TEM/PLACEBO (P<0,05). A 100 mmHg, les segments de rats VDN/IECA ont une valeur de PPb/PPa inférieure à celle des rats VDN/PLACEBO (P=0,0321).

3.3.4. Paramètres de fluorescence

Le traitement VDN accroît l'autofluorescence de l'artère carotide, mais il n'a d'effet significatif que sur les longueurs d'onde 340 et 360 nm, plus particulièrement chez les rats PLACEBO (Figure 4.10 ; Tableau 7.8 en annexe). A 380 nm, bien que l'autofluorescence soit également plus élevée chez les rats VDN, cette différence est à la limite de la significativité par rapport aux rats TEM (P=0,07). Le traitement IECA n'a pas d'effet sur l'autofluorescence quelle que soit la longueur d'onde.

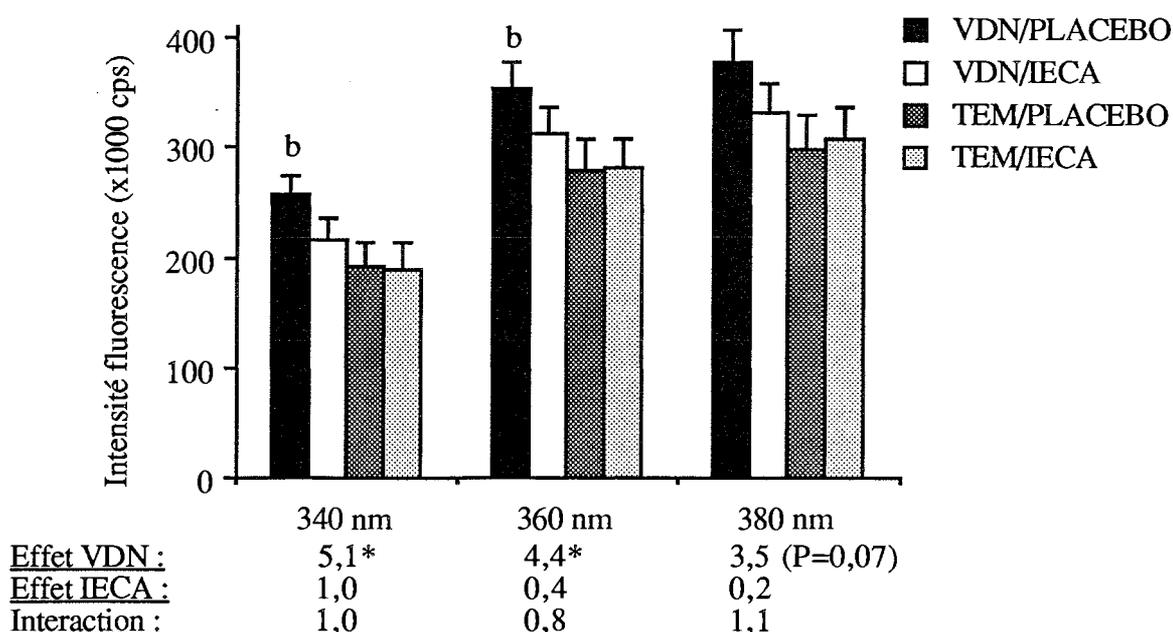
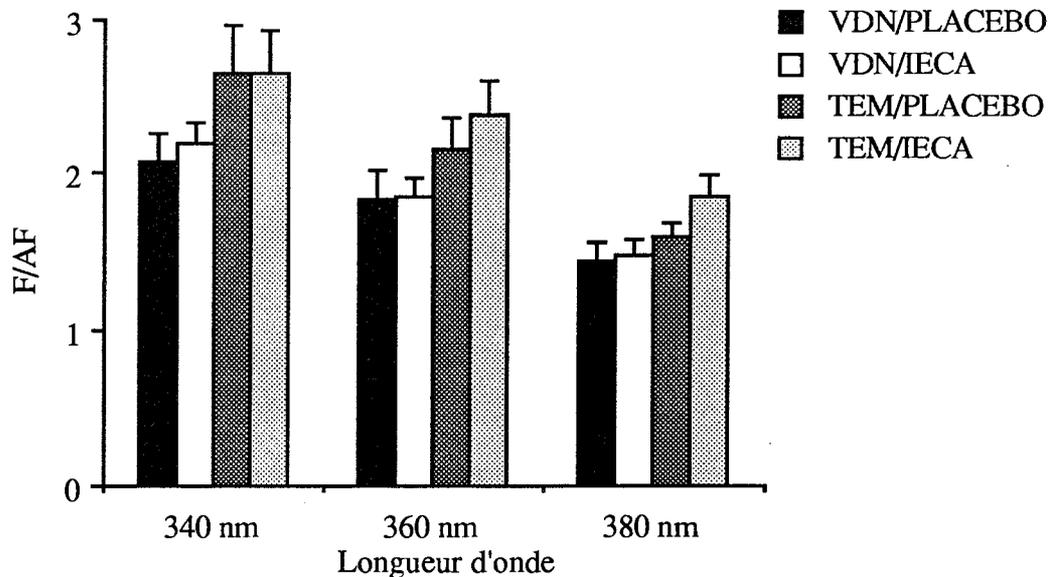


Figure 4.10. Intensités de fluorescence de l'artère carotide non chargée avec le fura-2 (autofluorescence) à 340, 360, 380 nm. (b) P<0,05 par rapport à TEM. Valeurs F de l'ANOVA, (*) P<0,05.

Bien que le coefficient de charge (F/AF) apparaisse plus élevé chez les rats TEM que chez les rats VDN, cette différence n'est pas significative (Figure 4.11 ; Tableau 7.9 en annexe ; effet VDN, P>0,05). Cependant, l'effet VDN est à la limite de la significativité à 340 nm (P=0,06). Le traitement IECA n'a pas d'effet sur le coefficient de charge (Figure 4.11).

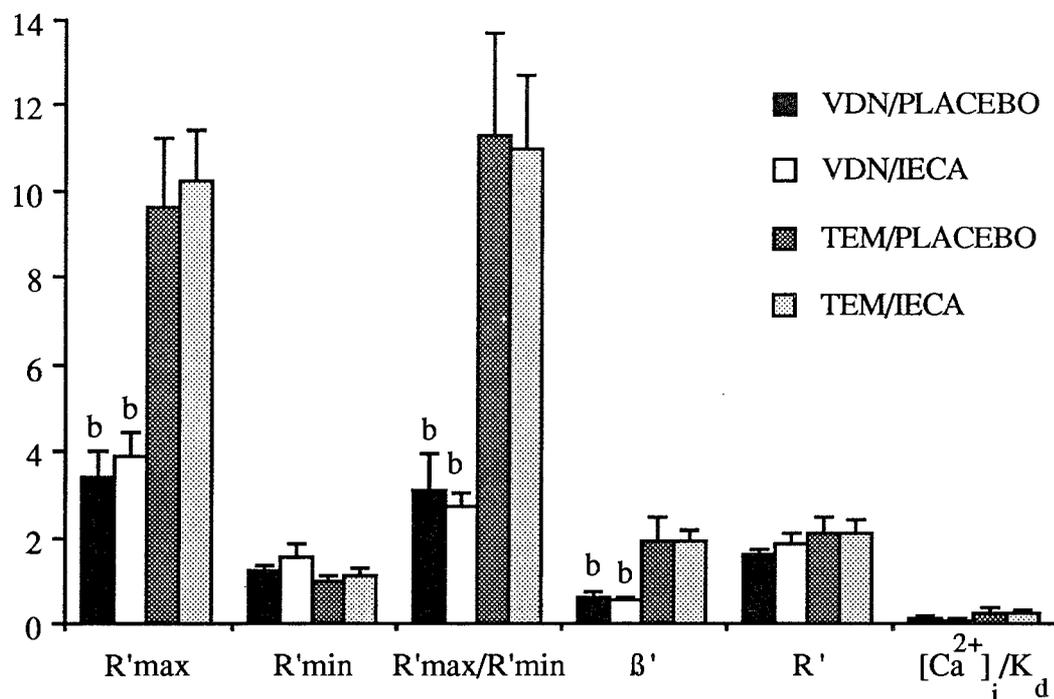


	340 nm	360 nm	380 nm
<u>Effet VDN :</u>	3,8 (P=0,06)	0,03	0,001
<u>Effet IECA :</u>	1,9	0,03	0,4
<u>Interaction :</u>	2,1	0,2	1,8

Figure 4.11. Coefficient de charge du fura-2 estimé par le rapport de la fluorescence après charge sur celle de l'autofluorescence (F/AF). Les valeurs F de l'ANOVA sont indiquées.

Dans les groupes VDN (groupe VDN/PLACEBO - groupe VDN/IECA), les valeurs de R'_{max} , R'_{max}/R'_{min} , β' et de $[Ca^{2+}]_i/K_d$ basale sont significativement et respectivement inférieures de 62-64%, 71-72%, 68-71% et 44-67% à celles de rats TEM (Figure 4.12 ; Tableau 7.10 en annexe). R'_{min} n'est pas modifié par le traitement VDN. Le traitement IECA n'a aucun effet sur l'ensemble de ces paramètres aussi bien chez les rats VDN que chez les rats TEM.

Lors de la perfusion des artères carotides de rat VDN avec de l'ionomycine, l'augmentation de F'_{340} est très faible (contrairement à celle mesurée chez les rats TEM), tandis que la diminution de F'_{380} est comparable entre rats TEM et VDN. L'élévation de $R'_{340/380}$ est ainsi essentiellement due à la baisse de F'_{380} . Lors de la détermination de R'_{min} , les valeurs de F'_{340} diminuent de façon similaire entre rats TEM et VDN, tandis que celles de F'_{380} augmentent chez les rats TEM et continuent de baisser chez les rats VDN par rapport aux fluorescences correspondantes à R'_{max} .



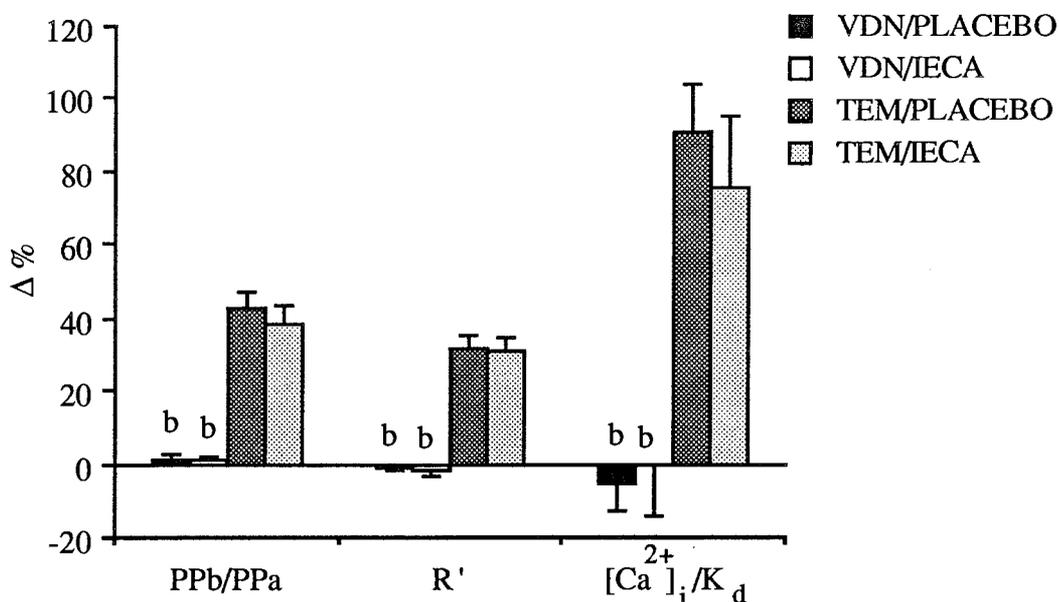
<u>Effet VDN :</u>	30,8*	2,8	26,4*	8,5*	2,0	6,0*
<u>Effet IECA :</u>	0,3	1,1	0,02	0,3	0,2	0,3
<u>Interaction :</u>	0,001	0,4	0,002	0,4	0,2	0,1

Figure 4.12. Paramètres de fluorescence lors de la calibration de fluorescence. R'_{max} = fluorescence maximale et R'_{min} = fluorescence minimale. Voir matériel et méthodes pour les autres paramètres dont R' et $[Ca^{2+}]_i/K_d$ correspondent aux valeurs basales. (b) $P < 0,05$ par rapport à TEM. Les valeurs F de l'ANOVA à 2 facteurs sont indiquées, (*) $P < 0,05$.

3.3.5. Stimulation par la noradrénaline

Chez les rats TEM/PLACEBO, la superfusion de NA entraîne une augmentation relative de R' de $32,2 \pm 3,8\%$ et ainsi de $[Ca^{2+}]_i/K_d$ de $91,0 \pm 12,9\%$ (Figure 4.13 ; Tableau 7.11 en annexe). Conjointement, la capacité d'amortissement diminue de $42,8 \pm 4,7\%$. Le traitement VDN réduit significativement les réponses à la NA aussi bien sur le plan de la fluorescence que sur le plan de l'amortissement artériel (Figure 4.13 ; Tableau 7.11 en annexe). Le traitement IECA n'a aucun effet sur ces paramètres.

Les valeurs de PIM basale (avant stimulation noradrénergique) sont similaires entre les quatre groupes (effets VDN et IECA, $P > 0,1$). Sous stimulation par la NA, la PIM n'est modifiée dans aucun des groupes ($P > 0,05$).



<u>Effet VDN :</u>	29,4*	129,7*	34,0*
<u>Effet IECA :</u>	0,02	0,1	0,1
<u>Interaction :</u>	0,01	0,001	0,5

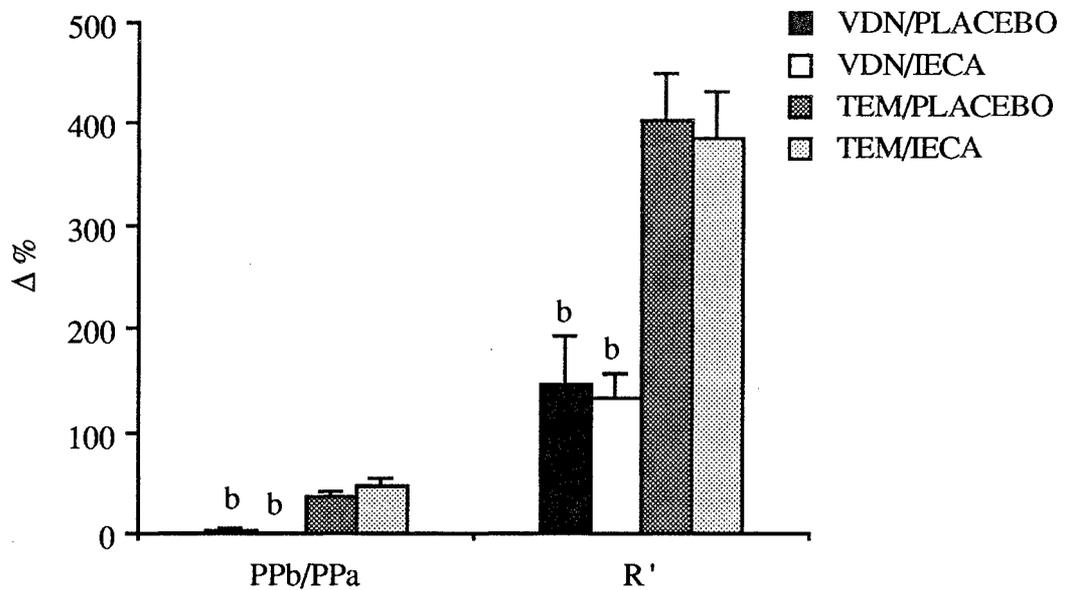
Figure 4.13. Effets de la stimulation par la noradrénaline (10 μ M). (b) $P < 0,05$ par rapport à TEM. Les valeurs F de l'ANOVA à 2 facteurs sont indiquées, (*) $P < 0,05$.

3.3.6. Effets d'un ionophore et d'un chélateur du calcium

Le traitement VDN modifie significativement les réponses induites par l'ionomycine : une diminution de Δ PPb/PPa% (92-101%) et Δ R'% (64-66%) est observée (Figure 4.14 ; Tableau 7.12 en annexe). Le traitement IECA n'a pas d'effet sur ces deux paramètres.

Chez les rats TEM, la capacité d'amortissement, diminuée par l'ionomycine, est restaurée après perfusion et superfusion de la solution d'EGTA (IM/-Ca) (Figure 4.15 ; Tableau 7.13 en annexe). La solution de Mn n'entraîne pas de modification supplémentaire. Chez les rats VDN, les solutions d'EGTA et de Mn n'ont pas d'effet significatif sur PPb/PPa. Le traitement IECA n'a pas d'effet sur les variations de PPb/PPa.

Les valeurs de PIM restent stables autour de 23 mmHg durant l'ensemble de ce protocole dans les quatre groupes de rats.



<u>Effet VDN :</u>	25,1*	32,8*
<u>Effet IECA :</u>	2,6	0,1
<u>Interaction :</u>	4,7*	0,001

Figure 4.14. Effets de l'ionomycine (solution IM/+Ca) lors de la calibration de la fluorescence. (b) $P < 0,05$ par rapport à TEM. Les valeurs F de l'ANOVA à 2 facteurs sont indiquées, (*) $P < 0,05$.

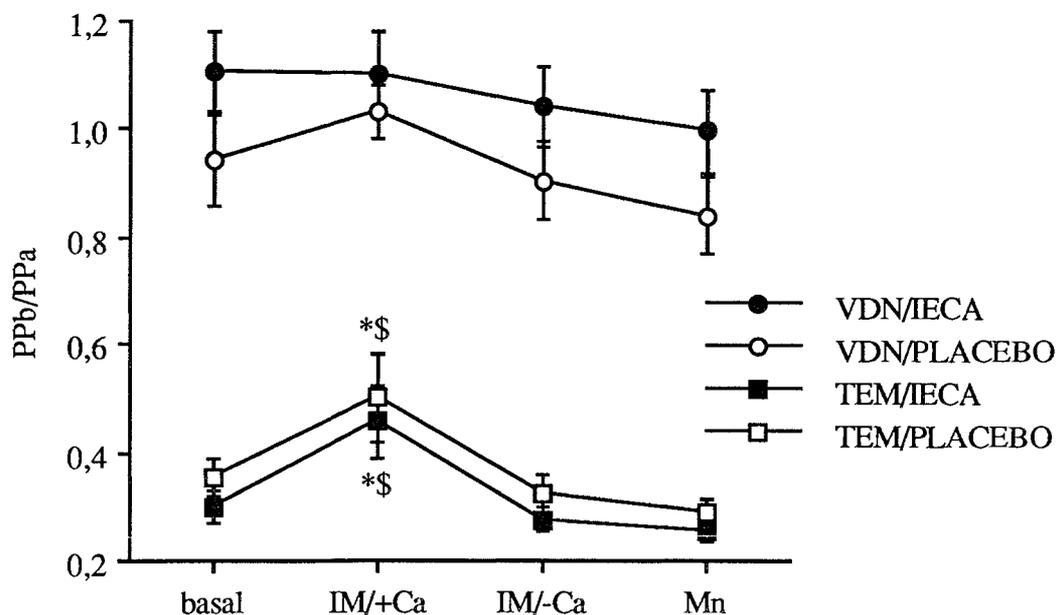


Figure 4.15. Effets de l'ionomycine (IM/+Ca), de l'EGTA (IM/-Ca) et de la solution de Mn sur la capacité d'amortissement artériel (PPb/PPa). (*) $P < 0,05$ par rapport à basal, (\$) $P < 0,05$ par rapport à IM/-Ca, test t de Student pour séries appariées.

3.4. Etude histomorphométrique

Les diamètres interne et externe des artères carotides de rats VDN sont supérieurs à ceux des rats TEM (+32-34%) ; le traitement IECA est dépourvu d'effet sur cette augmentation (Tableau 4.3). Le périmètre interne est accru par le traitement VDN, mais est inchangé par le traitement IECA. Le traitement VDN induit un épaississement de la média des artères carotides de rats traités par l'IECA, mais n'a pas d'effet significatif sur celle des rats PLACEBO. L'IECA réduit non significativement l'épaisseur pariétale des artères carotides de rats TEM. Le rapport h/D_i n'est abaissé par l'effet VDN que chez les rats PLACEBO (de 31,3%).

Les paramètres caractérisant les fibres élastiques ne sont altérés par aucun des deux traitements (Tableau 4.3).

Tableau 4.3. Etude histomorphométrique de l'artère carotide. D_i diamètre interne, D_e diamètre externe, h épaisseur de la média, LE lame élastique. Valeurs de F de l'ANOVA à 2 facteurs (effets VDN et IECA).

	<u>VDN</u>		<u>TEM</u>		<u>Effets</u> <u>VDN</u>	<u>IECA</u>	<u>Interaction</u> <u>VDNxIECA</u>
	<u>PLACEBO</u>	<u>IECA</u>	<u>PLACEBO</u>	<u>IECA</u>			
D_i (mm)	0,874 $\pm 0,059^b$	0,868 $\pm 0,030^b$	0,652 $\pm 0,043$	0,656 $\pm 0,029$	27,3*	0,0004	0,01
D_e (mm)	0,946 $\pm 0,057^b$	0,941 $\pm 0,029^b$	0,724 $\pm 0,042$	0,717 $\pm 0,030$	29,6*	0,02	0,001
Epaisseur média (μm)	36,50 $\pm 0,98$	36,53 $\pm 1,23^b$	35,96 $\pm 1,78$	30,90 $\pm 2,13$	3,5	2,3	2,4
Périmètre (mm)	2,94 $\pm 0,22^b$	2,97 $\pm 0,11^b$	2,22 $\pm 0,17$	2,24 $\pm 0,12$	19,3*	0,03	0,005
h/D_i	0,043 $\pm 0,003^b$	0,043 $\pm 0,002$	0,058 $\pm 0,006$	0,048 $\pm 0,004$	6,5*	1,7	1,5
Nombre LE	5,19 $\pm 0,16$	4,89 $\pm 0,10$	4,91 $\pm 0,17$	4,80 $\pm 0,19$	1,4	1,8	0,4
Epaisseur LE (μm)	2,82 $\pm 0,08$	2,93 $\pm 0,10$	2,74 $\pm 0,08$	2,74 $\pm 0,10$	2,3	0,4	0,3
%LE	36,59 $\pm 1,39$	37,46 $\pm 0,77$	34,81 $\pm 0,89$	35,80 $\pm 0,49$	3,3	1,0	0,004

(*) : $P < 0,05$ (ANOVA à 2 facteurs).

(b) : $P < 0,05$ par rapport à TEM.

VDN/PLACEBO : $n=8$ sauf pour les valeurs de lames élastiques ($n=7$).

VDN/IECA : $n=8$.

TEM/PLACEBO : $n=9$ sauf pour les valeurs de lames élastiques ($n=8$).

TEM/IECA : $n=9$ sauf pour les valeurs de lames élastiques ($n=7$).

3.5. Hypertrophie cardiaque

Les masses ventriculaires ne sont pas modifiées par le traitement VDN, bien qu'à la limite de la significativité statistique pour les masses ventriculaires totale et gauche (Figure 4.16 ; Tableau 7.14 en annexe). Le traitement IECA réduit significativement ces deux dernières masses tant chez les rats VDN (de 12,5% et 16,4%, respectivement) que chez les rats TEM (de 14,7% et 17,5%, respectivement) (Figure 4.16 ; Tableau 7.14 en annexe). Les deux traitements n'ont pas d'effet sur la masse ventriculaire droite.

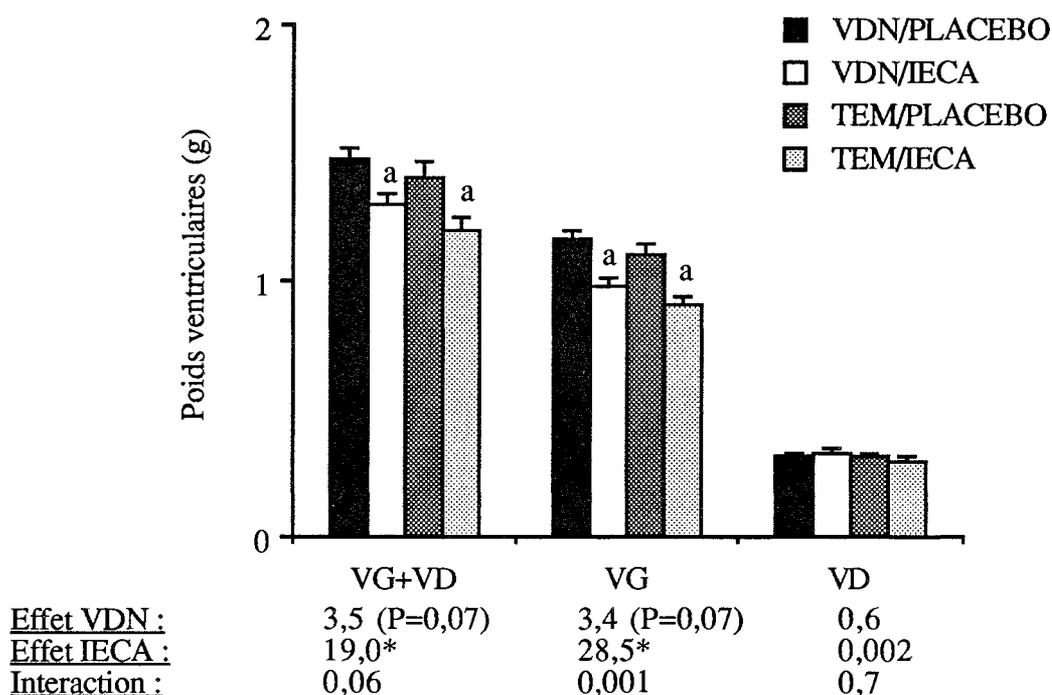


Figure 4.16. Poids ventriculaires total (VG+VD), gauche (VG) et droit (VD). (a) $P < 0,05$ par rapport à PLACEBO. Les valeurs F de l'ANOVA à 2 facteurs sont indiquées, (*) $P < 0,05$.

Le traitement VDN accroît la masse ventriculaire relative des rats PLACEBO de 11%, due à une hypertrophie du ventricule gauche (+12%) ; la masse ventriculaire droite n'est pas significativement altérée (Figure 4.17 ; Tableau 7.15 en annexe). Le traitement IECA réduit non seulement l'hypertrophie ventriculaire gauche provoquée par le traitement VDN (-10%), mais aussi le poids ventriculaire gauche des rats TEM (-10%). Il n'a pas d'effet sur les poids ventriculaires droits.

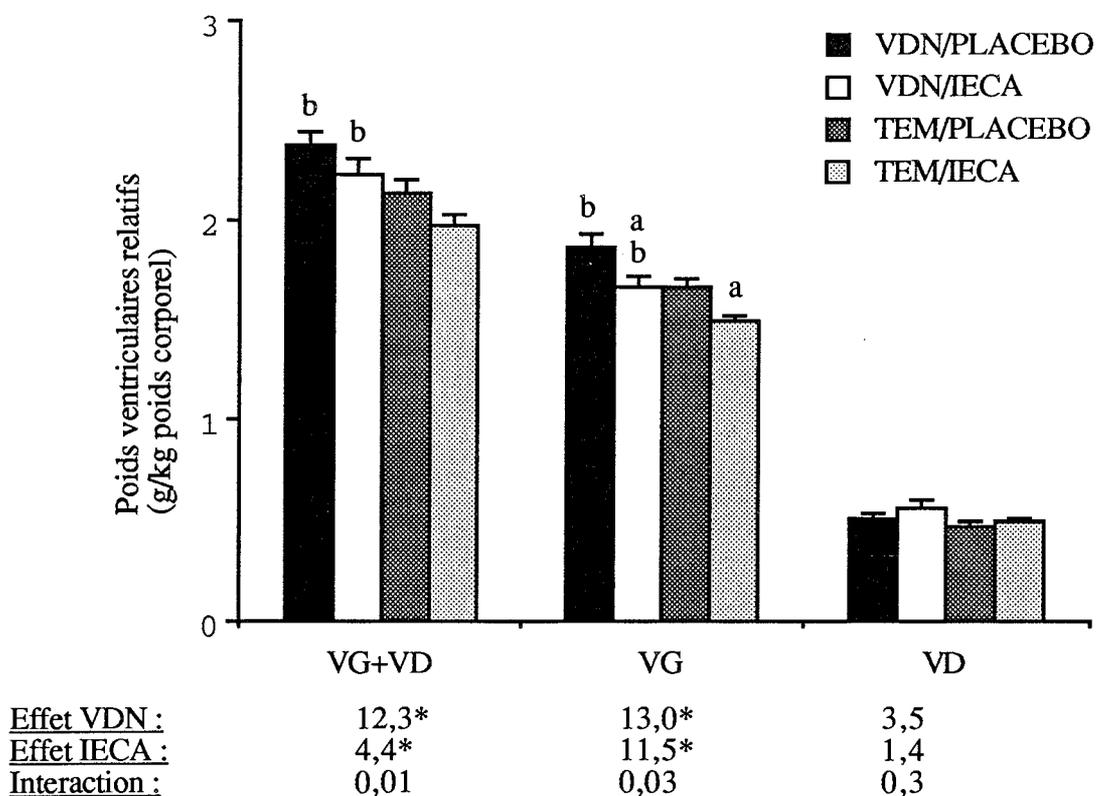


Figure 4.17. Poids relatifs des ventricules gauche (VG), droit (VD) et des deux ventricules (VG+VD), (a) $P < 0,05$ par rapport à PLACEBO, (b) $P < 0,05$ par rapport à TEM. Les valeurs F de l'ANOVA à 2 facteurs sont indiquées, (*) $P < 0,05$.

3.6. Taux de calcium tissulaire total

Le traitement VDN majore fortement la concentration de calcium tissulaire total dans les aortes thoracique et abdominale (x14-17) et dans l'artère carotide (x6-8) (Figure 4.18, et Tableau 7.16 en annexe ; Tableau 4.4). Dans les artères rénale et caudale, cette concentration est inférieure à celle des artères déjà citées, mais supérieure à celle des rats TEM. Une augmentation du taux de calcium est décelée dans d'autres tissus non artériels, tels que le rein, le foie, le myocarde. Au niveau du foie et du duodénum, le traitement VDN abaisse légèrement la concentration calcique (Tableau 4.4). Ces concentrations sont pour le foie de $3,05 \pm 0,40$ par rapport à $3,32 \pm 0,28$ $\mu\text{mol/g}$ chez les rats TEM et de $2,26 \pm 0,16$ par rapport à $2,61 \pm 0,30$ $\mu\text{mol/g}$ chez les rats VDN, et pour le duodénum de $35,95 \pm 4,28$ $\mu\text{mol/g}$ par rapport à $45,17 \pm 6,81$ $\mu\text{mol/g}$ chez les rats TEM et de $23,14 \pm 1,46$ par rapport à $31,20 \pm 5,87$ chez les rats VDN.

Le traitement IECA n'a aucun effet quel que soit le tissu considéré (Figure 4.18, et Tableau 7.16 en annexe ; Tableau 4.4).

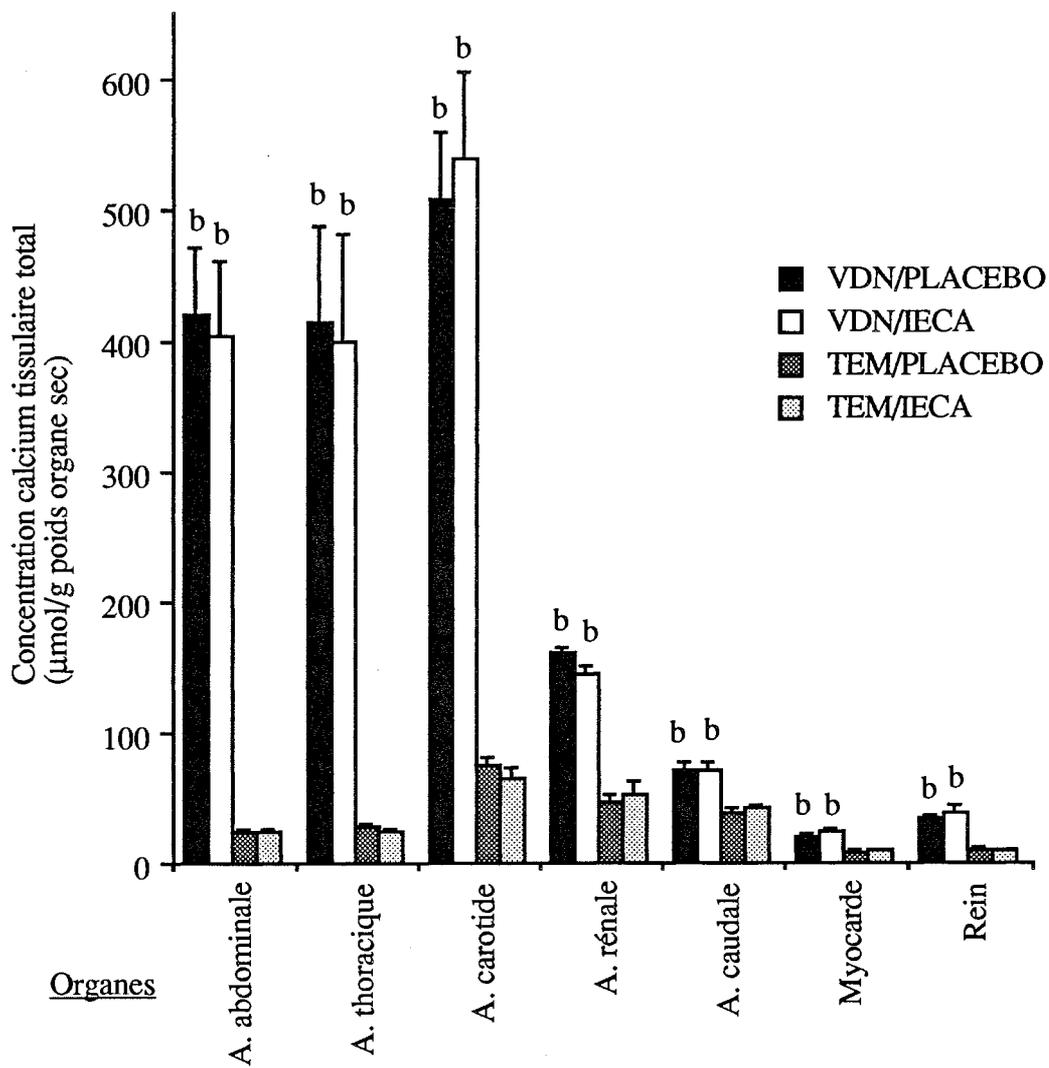


Figure 4.18. Concentrations de calcium tissulaire total dans différentes artères (A.) et dans d'autres organes, (b) $P < 0,05$ par rapport à TEM.

Tableau 4.4. Valeurs F de l'ANOVA à 2 facteurs (VDN et IECA) sur les concentrations de calcium tissulaire total, et les augmentations induites par le traitement VDN.
(*) P<0,05.

	Effet VDN	Effet IECA	Interaction VDN×IECA	VDN/TEM PLACEBO	VDN/TEM IECA
Aorte abdominale	103,4*	0,05	0,04	17,1	16,6
Aorte thoracique	50,7*	0,03	0,01	14,4	16,0
Artère carotide	120,7*	0,06	0,24	6,7	8,2
Myocarde	76,9*	3,14	1,89	2,4	2,7
Artère rénale	151,2*	0,29	2,12	3,5	2,7
Artère caudale	40,7*	0,08	0,14	1,8	1,7
Rein	82,6*	0,49	1,31	3,1	4,1
Duodénum	14,1*	1,13	0,06	0,6	0,6
Foie	8,1*	0,66	0,01	0,7	0,7

3.7. Taux des protéines tissulaires solubles dans l'acide

Les taux de protéines des artères, du myocarde, du rein et du duodénum ne sont modifiés, ni par le traitement VDN, ni par le traitement IECA (Figure 4.19, et Tableau 7.17 en annexe ; Tableau 4.5). Les valeurs obtenues pour le duodénum sont de 29,57±2,54 (rats TEM/IECA), 21,30±4,28 (rats TEM/PLACEBO), 32,20±7,83 (rats VDN/IECA) et 35,87±7,17 (rats VDN/PLACEBO) mg/g de poids frais. Le traitement IECA abaisse le taux protéique du foie (Tableau 4.6) chez les rats VDN (38,54±2,21 par rapport à 55,01±3,73 ; P<0,05) ; il est de 41,75±2,50 chez les rats TEM/IECA et de 45,20±3,00 chez les rats TEM/PLACEBO.

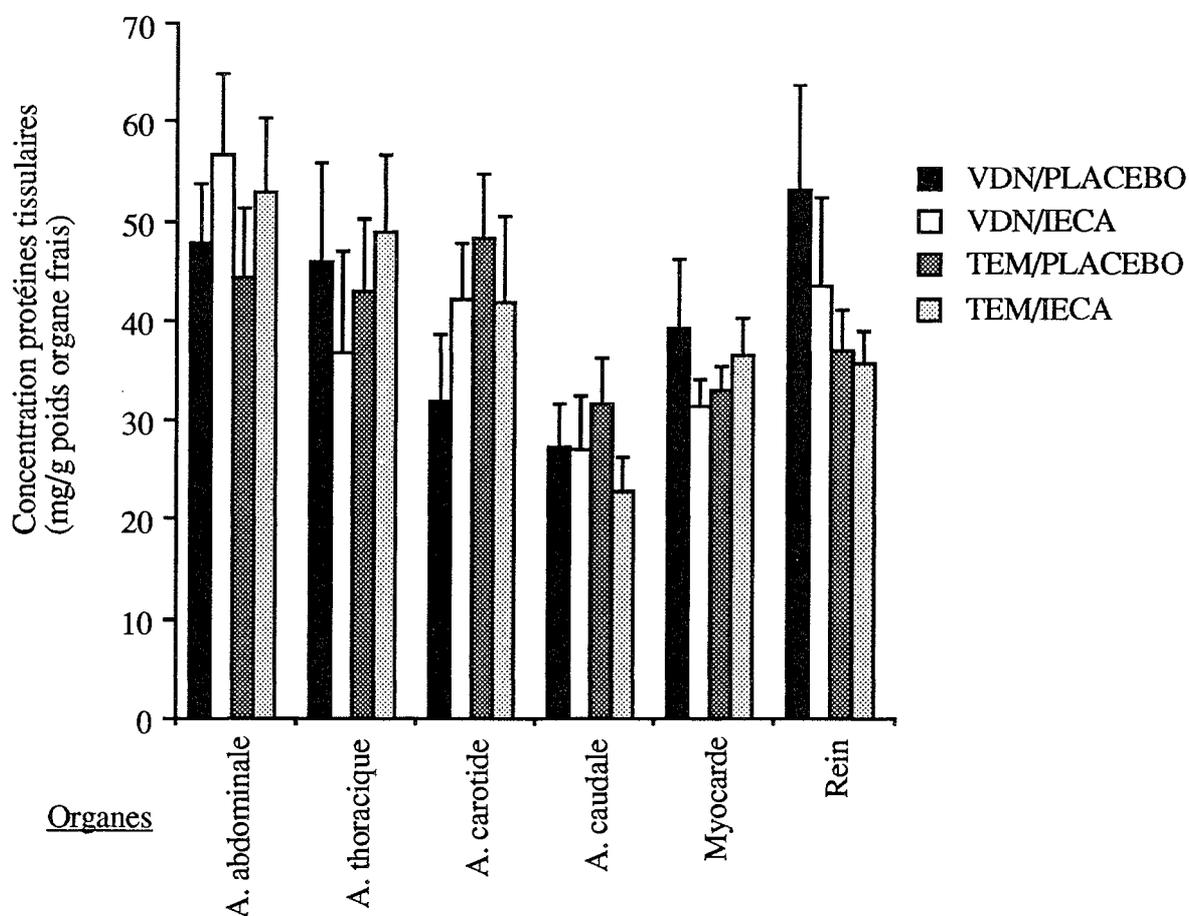


Figure 4.19. Concentration des protéines tissulaires solubles dans l'acide de différentes artères (A.) et d'autres organes.

Tableau 4.5. Valeurs F de l'ANOVA à 2 facteurs (VDN et IECA) sur les concentrations de protéines tissulaires solubles dans l'acide. (*) P<0,05.

	Effet VDN	Effet IECA	Interaction VDNxIECA
Aorte abdominale	0,24	1,48	0,0005
Aorte thoracique	0,27	0,03	0,01
Artère carotide	1,12	0,06	1,22
Myocarde	0,02	0,23	1,39
Artère caudale	0,0002	1,09	0,89
Rein	2,27	0,49	0,29
Duodénum	2,18	0,16	1,05
Foie	1,21	11,02*	4,71*

3.8. Activité de l'enzyme de conversion plasmatique

L'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I est inchangée par le traitement VDN ($F=0,34$), mais l'est par le traitement IECA ($F=154$; $P=0,0001$) sans interaction entre les deux effets ($F=0,06$) (Figure 4.20 ; Tableau 7.18 en annexe). La baisse induite par l'IECA est similaire chez les rats VDN et les rats TEM, respectivement de 91,9% et de 90,0%.

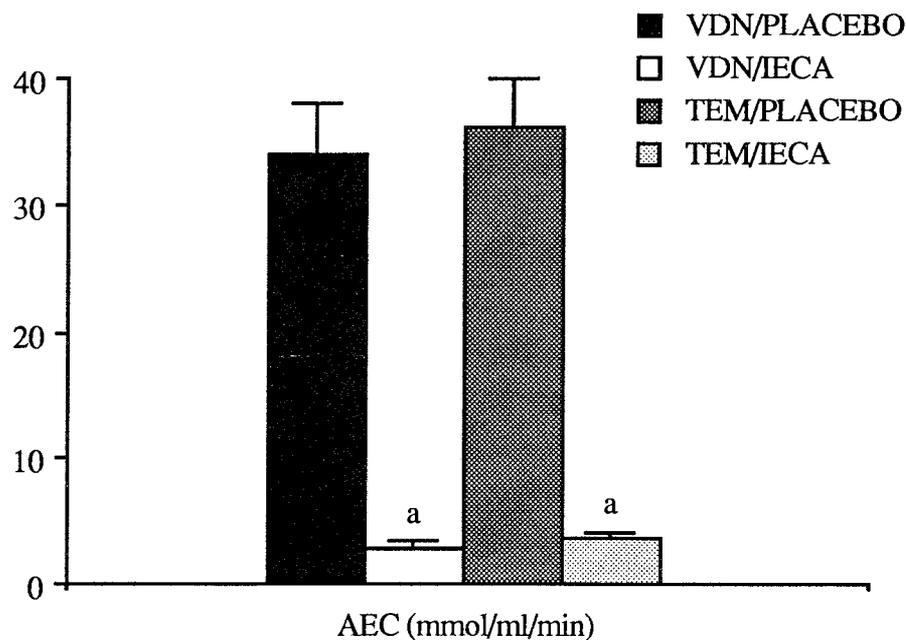


Figure 4.20. Activité de l'enzyme de conversion (AEC). (a) $P < 0,05$ par rapport à PLACEBO.

3.9. Taux des catécholamines plasmatiques

Les concentrations plasmatiques de noradrénaline et d'adrénaline ne sont modifiées ni par le traitement VDN, ni par l'IECA (Figure 4.21 ; Tableau 7.19 en annexe).

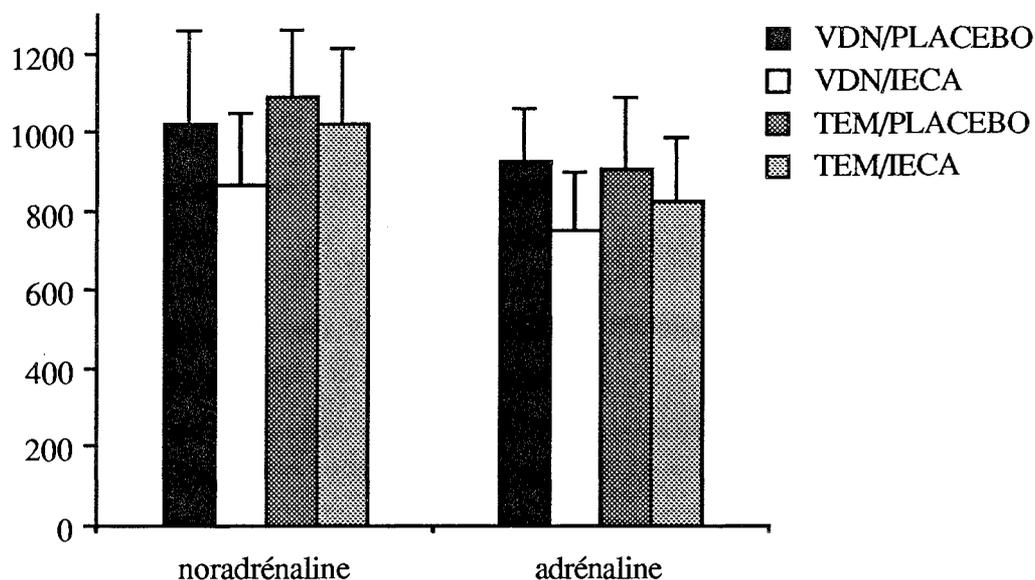


Figure 4.21. Concentrations plasmatiques de noradrénaline et d'adrénaline (pg/ml).

4. Discussion

4.1. Paramètres généraux

4.1.1. Effets du traitement vitamine D₃-nicotine

Au cours de cette étude, l'évolution des paramètres est similaire à celle observée dans les travaux précédents sur les effets du traitement VDN appréciés pendant des durées de 15 jours à 12 mois (Henrion et coll., 1991a ; Atkinson, 1992 ; Atkinson et coll., 1994a ; résultats non publiés). Le poids corporel des rats VDN diminue initialement ; dès le quatrième jour, une reprise de la croissance corporelle survient conduisant à une disparition de l'effet VDN à partir du 150^{ème} jour. Les consommations de nourriture et de boisson sont semblables entre les rats VDN et TEM à l'exception des premiers jours pendant lesquels la prise de nourriture des rats VDN est diminuée. La pression artérielle systolique est accrue tandis que le rythme cardiaque est peu affecté par le traitement VDN. La pression artérielle systolique augmente rapidement dès le premier mois pour se maintenir à une valeur hypertensive durant toute la durée de l'étude. En fin d'étude, cet accroissement est de 12%, une valeur comparable à celle observée au 30^{ème} (15%) et au 90^{ème} jour (13%) dans notre travail, mais également dans un autre similaire (résultats non publiés). Ce traitement VDN conduit également à une hypertrophie ventriculaire gauche. Douze mois après ce traitement, la masse cardiaque relative au poids corporel demeure plus élevée chez les rats VDN, correspondant à une hypertrophie ventriculaire gauche isolée.

L'analyse plasmatique indique des valeurs similaires à celles de référence, soulignant la "bonne santé" des rats VDN (Henrion et coll., 1991a ; Oster, 1991). De plus, le traitement VDN ne semble pas activer le système sympathique, les concentrations plasmatiques des catécholamines étant inchangées. Les concentrations de calcium tissulaire total sont typiquement augmentées au niveau artériel, préférentiellement, et plus particulièrement dans les artères de compliance dont l'artère carotide (taux multiplié par 6-8).

Le modèle VDN a été ainsi décrit comme un modèle de surcharge calcique vasculaire, avec une hypertension systolique isolée - une étude précédente ayant montré l'absence d'augmentation de la pression artérielle moyenne (Makki et coll., 1992) - et une hypertrophie ventriculaire gauche. Ces caractéristiques sont maintenues 12 mois après le traitement VDN initial (présente étude).

4.1.2. Effets du traitement IECA

Le traitement par un IECA, le périndopril, maintenu à une dose journalière de 1 mg/kg ne modifie pas les consommations de nourriture et de boisson, mais ralentit initialement la croissance pondérale. L'effet IECA se manifeste en effet dès le 30^{ème} jour chez les rats TEM et dès le 90^{ème} chez les rats VDN. En fin d'étude, le poids corporel des rats traités par l'IECA est toujours inférieur à celui des rats PLACEBO correspondants ; cependant, l'effet IECA n'est significatif que chez les rats TEM. Le traitement IECA, dépourvu d'effet sur le rythme cardiaque, induit dès le premier mois une diminution de la pression artérielle systolique, chez les rats TEM (14%) comme chez les rats VDN (16%) ; celle-ci se maintient tout au long de l'étude (90^{ème} jour : 17% et 27%, respectivement). De plus, le périndopril réduit l'hypertrophie ventriculaire gauche induite par le traitement VDN et permet ainsi un retour à une valeur similaire à celle des rats TEM. L'IECA provoque également une baisse de la masse ventriculaire gauche relative chez les rats TEM.

L'activité de l'enzyme de conversion appréciée à la fin de l'étude est inférieure à celle mesurée au jour 90 (-14,3% rats TEM/PLACEBO et -21,1% rats VDN/PLACEBO ; résultats non publiés). Une telle tendance est décrite au cours du vieillissement où l'activité de l'enzyme de conversion est abaissée de 31,4% entre les âges de 6 et 24 mois. Le traitement IECA abaisse de façon similaire cette activité enzymatique chez les rats VDN et TEM (de 90 à 92%).

Les concentrations plasmatiques de catécholamines ne sont pas modifiées par le traitement IECA indiquant que le système sympathique n'est pas activé.

4.2. Elasticité de la paroi artérielle

4.2.1. Effets du traitement vitamine D₃-nicotine sur l'indice d'amortissement artériel

Le traitement VDN semble conduire à une perte de la capacité d'amortir un signal de pression pulsée de la part de l'artère carotide. En effet, PPb/PPa est proche de ou égal à 1 chez ces rats VDN. Les cycles rapides ou lents de pressurisation intraluminale n'ont aucun effet sur PPb/PPa. La rigidité artérielle s'observe ainsi dès les basses pressions (25-50 mmHg), valeurs pour lesquelles l'amortissement des artères des rats TEM est maximal. Une telle rigidité a été observée sur l'artère carotide des rats VDN *in situ* : la compliance artérielle sous pression statique est nettement diminuée. Par exemple à 100 mmHg, elle est abaissée d'environ 50%, passant de 7,5 à 3,7 et de 4 à 2 nl/mmHg/mm chez des rats âgés de 3 et 14 mois respectivement (Atkinson et coll., 1994a). De plus, la forme en cloche de la relation compliance-pression intraluminale présente chez les rats TEM disparaît chez les rats VDN où la compliance carotidienne devient indépendante de la pression statique appliquée. Cette même indépendance est notée dans notre étude aux différents plateaux de pression pulsée. La rigidité des artères de rat VDN a été observée, non seulement par mesure de la compliance artérielle *in situ* (Atkinson et coll., 1994a) ou de la capacité d'amortissement artériel *in vitro* (présente étude), mais aussi *in vivo* par la diminution de la compliance artérielle systémique (28%) et par une augmentation de l'impédance caractéristique (18%) (Atkinson et coll., 1994a).

4.2.2. Effets du traitement IECA

Après 12 mois de traitement IECA, la perte de la capacité d'amortissement carotidien induite par l'effet VDN ne semble pas être réduite. De même, le traitement IECA n'exerce d'effet ni sur la calcinose vasculaire, ni sur les paramètres histomorphométriques de l'artère carotide (présente étude).

Cependant, lors d'un traitement de rats VDN par le périndopril (1 mg/kg/j également) de plus courte durée (90 jours), des effets "bénéfiques" sont observés (résultats non publiés).

D'une part, le taux de calcium de l'aorte thoracique est abaissé (71%) et les paramètres histomorphométriques de cette artère restaurés à leurs valeurs contrôles (baisse du D_i de 16,4% et de l'épaisseur médiale de 12,5%, accroissement du pourcentage d'élastine de 14,5%). D'autre part, les paramètres hémodynamiques sont améliorés (baisse de la pression différentielle de 30%, de la vitesse de transmission de l'onde de pression et du module élastique de l'aorte thoracique de 54%). Ainsi, la dose de 1 mg/kg/j, choisie pour son action hypotensive, est suffisante pour améliorer la fonction cardio-vasculaire après traitement VDN.

Le choix de l'artère étudiée (aorte thoracique et artère carotide, respectivement) et la durée du traitement (90 jours et 12 mois) pourraient expliquer la différence d'effet du périndopril entre ces deux travaux. Cette explication semble difficile à retenir puisqu'un seul mois de traitement à

dose équivalente accroît la compliance carotidienne *in situ* de 42% chez les rats Wistar et chez les rats hypertendus rénovasculaires (Lévy et coll., 1988). Cependant, une absence d'effet du périndopril a été observée à long terme chez des rats WAG/Rij, c'est-à-dire lors d'un traitement de 24 mois chez des rats âgés de 6 à 30 mois (Michel et coll., 1994).

Plusieurs paramètres dans notre travail montrent que le manque d'effet IECA sur la capacité d'amortissement artériel n'est certainement pas dû à une disparition d'activité du périndopril après 12 mois de traitement. En effet, l'activité de l'enzyme de conversion plasmatique est abaissée de 90 à 92%, la pression artérielle systolique de 14-16% et la masse ventriculaire gauche relative ou non de 10% et 16-18% respectivement. Il est à noter que ces trois paramètres sont modifiés dans le même ordre de grandeur chez les rats VDN et chez les rats TEM. Des traitements IECA à long terme ont également été étudiés lors du vieillissement de 6 à 30 mois à la même dose de périndopril de 1 mg/kg/j (Michel et coll., 1994). L'IECA ralentit l'épaississement de la média de l'artère carotide et augmente la densité de l'élastine jusqu'à l'âge de 24 mois. Cependant, la compliance carotidienne *in situ* à 100 mmHg n'est pas affectée par l'IECA, de même après inhibition métabolique par le cyanure de potassium.

4.2.3. Facteurs influençant l'élasticité artérielle

Le traitement VDN pourrait modifier les propriétés fonctionnelles des fibres élastiques. D'une part, ces fibres élastiques sont le principal élément intervenant dans la compliance artérielle à faible pression (Wolinsky et Glagov, 1964 ; Cox, 1978b) et, d'autre part, la capacité d'amortissement artériel est maximale à ces pressions chez les rats TEM. Le traitement VDN induit une calcification de la média et plus particulièrement un dépôt de calcium sur les fibres élastiques (Henrion et coll., 1991a). De plus, Urry (1978) a montré qu'un tel dépôt calcique peut être à l'origine de variations des propriétés visco-élastiques de la matrice extracellulaire. Un tel phénomène est observé au cours du vieillissement. La quantité de calcium lié à l'élastine augmente en effet chez les rats âgés de 30 mois ; cette élévation pourrait ainsi indiquer des changements qualitatifs de l'élastine et être en partie responsable de la diminution de la compliance artérielle avec l'âge (Michel et coll., 1994).

4.2.3.1. Fibres élastiques et dimensions artérielles

Le traitement VDN ne semble pas induire d'hypertrophie des cellules musculaires lisses : ni l'épaisseur de la média, ni le taux de protéines solubles dans l'acide ne sont majorés au 90^{ème} jour (résultats non publiés) et au 400^{ème} jour (présente étude). Ainsi, la tension pariétale de l'artère carotide (selon la loi de Laplace) n'est amplifiée que par une élévation du rayon artériel interne puisque la pression artérielle moyenne et l'épaisseur artérielle ne sont pas modifiées.

Le traitement IECA pourrait abaisser la tension pariétale artérielle des rats VDN par une baisse de la pression artérielle moyenne, car le rapport R_i/h reste inchangé. Mais les raisons de

cette constance du rapport R_i/h semblent être différentes entre l'aorte thoracique au 90^{ème} jour (résultats non publiés) et l'artère carotide au 400^{ème} jour (présente étude). En effet, dans l'aorte thoracique, la baisse de R_i est concomitante d'une augmentation de h , tandis que dans l'artère carotide, ces deux paramètres ne sont pas modifiés. Chez les rats TEM, la tension pariétale artérielle pourrait être maintenue après le traitement IECA par l'accroissement de R_i/h ; celui-ci contrebalancerait la baisse de pression artérielle moyenne. En effet, le rapport R_i/h augmente en conséquence de l'amincissement et de la stabilité de R_i .

4.2.3.2. Cellules endothéliales

La composante endothéliale peut également intervenir dans la détermination de la compliance artérielle (Lévy et coll., 1990). En effet, le retrait de l'endothélium augmente la compliance carotidienne chez les rats WKY et SHR (Lévy et coll., 1990) et la fonction endothéliale est diminuée chez les rats VDN (Henrion et coll., 1991b). Dans ce travail, nous avons pris soin de retirer l'endothélium pour supprimer son influence sur les mesures, non seulement de compliance artérielle, mais également de calcium intracellulaire.

L'inhibition métabolique par le cyanure de potassium n'a pas d'effet sur la compliance carotidienne chez les rats VDN (Atkinson et coll., 1994a) ; ceci montre que la composante cellulaire est probablement peu impliquée dans la rigidification artérielle induite par le traitement VDN.

4.2.3.3. Cellules musculaires lisses et réactivité vasculaire

En plus de son effet sur les fibres élastiques, le traitement VDN pourrait également altérer la réactivité vasculaire (Oster, 1991). En effet, l'inactivation métabolique (Yin et coll., 1983 ; Lévy et coll., 1990) ou l'activation alpha-noradrénergique (Cox, 1979 ; Chapitre II) peuvent respectivement augmenter ou réduire l'élasticité de la paroi artérielle. Comme nous l'avons vu dans le Chapitre II, l'activation des cellules musculaires lisses accroît PPb/PPa, signe d'une rigidification artérielle par contraction circonférentielle sans variation de la pression intraluminaire. Ceci permettrait un réajustement du niveau d'amortissement artériel à un niveau de pression donné.

Lors de la stimulation par la noradrénaline, les variations de PPb/PPa et de R' (de 30-40% chez les rats TEM), signes respectifs d'une rigidification carotidienne et d'une augmentation du calcium intracellulaire, sont pratiquement nulles chez les rats VDN. Cette différence de réponse de PPb/PPa entre les rats TEM et les rats VDN peut s'expliquer par au moins trois points : (1) PPb/PPa est déjà égal à 1 (valeur maximale de rigidité) chez les rats VDN, (2) la méthode n'a pu détecter de faibles variations ou (3) la réactivité vasculaire au niveau récepteuriel est abolie, le niveau de Ca^{2+} cytosolique ne variant pas. Ces résultats divergent de ceux obtenus sur une artère

musculaire, l'artère caudale de rat. Dans cette artère, les variations de R' ($\Delta R'\%$) et de pression de perfusion (ΔP) sont significativement plus élevées chez les rats VDN que celles mesurées chez les rats témoins lors de stimulations par la noradrénaline ou la sérotonine, alors qu'une diminution de l'efficacité du couplage calcium-vasoconstriction est notée (Oster, 1991). Une différence due à la nature de l'artère est à considérer. La surcharge calcique accroît la résistance basale de l'artère caudale ; cette élévation ne résulte probablement pas de la calcification extracellulaire puisque le taux de calcium n'est multiplié que par 2 (Oster, 1991). La calcification nettement plus importante (Tableau 4.4) et la dominante élastique de l'artère carotide font que cette différence de niveau basal de Ca^{2+} cytosolique est moins déterminante pour le développement de la rigidification artérielle induite par le traitement VDN. De plus, les réponses à une stimulation noradrénergique sont modifiées par le traitement VDN d'une façon différente dans des anneaux aortiques (Henrion et coll., 1991a) et dans l'artère caudale (Oster, 1991). En effet, les élévations maximales de tension et la sensibilité à la noradrénaline sont significativement inférieures dans les anneaux aortiques de rats VDN (Henrion et coll., 1991a) tandis que la vasoconstriction est potentialisée dans l'artère caudale (Oster, 1991).

Lors de la stimulation par la noradrénaline, le rapport $R'_{340/380}$ augmente d'environ 32% chez les rats TEM tandis qu'il reste stable chez les rats VDN. Cette variation, exprimée sous la forme de $[Ca^{2+}]_i/K_d$ afin de tenir compte de la calibration de fluorescence - R'_{max} et β' étant plus faibles chez les rats VDN - est encore plus marquée par rapport à celle de $R'_{340/380}$ entre les rats VDN et TEM.

Lorsque la stimulation est obtenue par une voie non réceptorielle avec l'utilisation d'un ionophore du Ca^{2+} , l'ionomycine, $R'_{340/380}$ s'accroît aussi bien chez les rats TEM que chez les rats VDN. Cette augmentation reste cependant inférieure de 65% chez les rats VDN à celle des rats TEM. De plus, cette stimulation par l'ionomycine réduit l'amortissement artériel chez les rats TEM, mais n'a aucun effet chez les rats VDN, certainement pour les mêmes raisons que celles évoquées précédemment pour la noradrénaline.

La stimulation par la noradrénaline n'entraîne, ni variation de PPb/PPa, ni élévation de $R'_{340/380}$ chez les rats VDN. Comme nous l'avons noté précédemment, il est difficile d'apprécier un effet sur l'amortissement artériel puisque la rigidité vasculaire est déjà maximale (PPb/PPa environ égal à 1). De plus, la noradrénaline est sans effet sur le Ca^{2+} cytosolique puisque $R'_{340/380}$ ou $[Ca^{2+}]_i/K_d$ ne varient pas chez les rats VDN ; ce résultat indique une perte de la perméabilité membranaire au Ca^{2+} extracellulaire et de la mobilisation du Ca^{2+} . Il ne peut être dû ni à une saturation de l'indicateur puisque les valeurs basales de Ca^{2+} cytosolique chez les rats VDN sont au contraire plus faibles, ni à une mauvaise charge du fura-2 puisque les coefficients de charge (F/AF) ne sont pas significativement influencés par le traitement VDN. De même, c'est au niveau des valeurs de R'_{max} que l'effet VDN est le plus prononcé, avec une baisse de celui-ci (R'_{max}) et une augmentation très faible de la fluorescence F'_{340} . L'ensemble de ces résultats

pourraient indiquer une modification de l'affinité du fura-2 pour le Ca^{2+} et/ou une altération de la cinétique de complexation. En considérant ce dernier facteur seul, la perfusion de la solution d'ionomycine pour la détermination de R'_{max} pourrait nécessiter des durées plus longues pour les artères carotides de rat VDN par rapport à celles des rats TEM. Le temps de contact a été identique dans les deux cas ; il permet l'obtention d'une valeur maximale de R'_{max} chez les rats TEM et une faible variation reproductible chez les rats VDN. Cependant, la diminution de fluorescence F'_{380} similaire chez les rats VDN et les rats TEM lors de cette stimulation ne peut s'expliquer dans ce contexte là.

La viscosité, la force ionique, le pH, les protéines solubles intracellulaires sont autant de facteurs susceptibles d'influencer la valeur du K_d du fura-2 pour le Ca^{2+} . Cependant, le taux des protéines solubles dans l'acide n'est pas modifié par le traitement VDN.

Bien que le K_d du fura-2 soit peu influencé par le pH lorsque ce dernier conserve des valeurs physiologiques (Grynkiewicz et coll., 1985), une baisse du pH, c'est-à-dire une acidification du milieu intracellulaire, accroît ce K_d (Lattanzio et Bartschat, 1991). Cette variation est principalement due à une diminution du taux d'association du Ca^{2+} qui entre en compétition avec la protonation de l'indicateur. De plus, cette acidification abaisse la capacité du fura-2 à différencier le Ca^{2+} du Mg^{2+} (Lattanzio et Bartschat, 1991). Cependant, la plus faible valeur de K_d déterminée pour le Mg^{2+} est de 5,6 mM (Grynkiewicz et coll., 1985) voire de 70 mM (Uto et coll., 1991), une valeur très élevée qui montre la sélectivité du fura-2 pour le Ca^{2+} par rapport au Mg^{2+} .

Une augmentation de la viscosité du milieu provoque une intensité de fluorescence plus élevée du spectre d'excitation du fura-2 en présence de Ca^{2+} ; simultanément, le rapport des fluorescences 340 / 380 diminue, conduisant à des valeurs de R_{min} , R_{max} et β d'autant plus faibles que la viscosité est élevée (Linderman et coll., 1990 ; Poenie, 1990). Ces valeurs déterminées sur solutions peuvent respectivement être abaissées de 60%, 95% et 80% dans une solution de haute viscosité enrichie en sucrose (Linderman et coll., 1990). Mais paradoxalement, Meininger et coll. (1991) réduisent leurs estimations de R_{max} et R_{min} sur artérioles isolées pour corriger l'effet de la viscosité. Cependant, Poenie (1990) a observé qu'à une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ d'environ 100 nM la viscosité a peu d'effet sur $R_{340/380}$, mais qu'à des $[\text{Ca}^{2+}]$ supérieures $R_{340/380}$ diminue avec l'accroissement de la viscosité.

Les valeurs de R_{max} et β peuvent être également altérées par une fuite de l'indicateur lors de la détermination de R_{max} , c'est-à-dire lors de la stimulation par l'ionomycine (Jensen et coll., 1992, 1993). Dans cette hypothèse, les fuites de l'indicateur seraient plus importantes pour les artères carotides de rat VDN que pour celles de rat TEM. Ces fuites majorées expliqueraient la non remontée de la fluorescence F'_{380} , abaissée lors de la détermination de R'_{max} , en présence de la solution d'EGTA dans les artères carotides de rat VDN.

En absence de mesures directes de l'influence de tous ces paramètres tels que la viscosité, le pH, la force ionique intracellulaires, le K_d , il est difficile de préciser les causes réelles des

modifications de fluorescence sur les artères carotides de rat VDN. Apparemment, les mécanismes réceptoriels des artères carotides sont altérés par le traitement VDN puisque la stimulation par la noradrénaline n'induit pas de mobilisation du Ca^{2+} cytosolique. A l'inverse, en présence d'ionomycine, une élévation de Ca^{2+} cytosolique est induite, bien qu'inférieure à celle observée sur l'artère carotide de rat TEM.

Le périndopril n'exerce aucun effet sur la réactivité vasculaire à la noradrénaline ou à l'ionomycine, chez les rats TEM ou les rats VDN. Les seuls effets bénéfiques de ce traitement de 12 mois par le périndopril semblent être une réduction de la pression artérielle systolique et de l'hypertrophie ventriculaire gauche.

CONCLUSION GENERALE

Dans ce travail, nous avons étudié le rôle potentiel du calcium dans les modifications d'élasticité artérielle à un double niveau : (1) intracellulaire par mesure de celui-ci à l'aide de la sonde fluorescente le fura-2, et (2) extracellulaire par une surcharge calcique vasculaire (modèle VDN). Dans ce but, nous avons développé une nouvelle technique permettant la mesure simultanée du calcium cytosolique libre et de la capacité de l'artère carotide à amortir un signal de pression pulsée. Notre recherche s'est ainsi focalisée sur un aspect du vieillissement vasculaire - le rôle du calcium - qui inclut une interaction complexe de nombreuses altérations structurales et fonctionnelles.

Chez le rat adulte de 12 mois, notre technique a permis de décrire le comportement élastique de la paroi artérielle en fonction de la pression intraluminale, avec une capacité d'amortissement artériel maximale à basse pression. La stimulation par un agent alpha-noradrénergique, la noradrénaline, montre que le niveau d'amortissement artériel peut être ajusté à des valeurs de PPb/PPa supérieures. Dans cette modulation artérielle, le Ca^{2+} cytoplasmique peut jouer un rôle très important : son niveau augmente de façon concomitante de la rigidification artérielle. Il en est de même lorsque le segment artériel est en présence d'un ionophore calcique, l'ionomycine.

Nos résultats mettent également en évidence une légère rigidification artérielle lors du vieillissement (Chapitre III) ; celle-ci est nettement plus prononcée après un traitement vitamine D₃-nicotine (Chapitre IV). La perte de la capacité d'amortissement qui en découle pourrait résulter de l'augmentation du taux de calcium extracellulaire. Le calcium pourrait se déposer sur les fibres élastiques, et ainsi conduire à la perte de la capacité d'amortissement artériel, elle-même à l'origine d'une hypertrophie cardiaque (Figure 5). La rigidification artérielle importante observée lors de la calcification artérielle (modèle VDN) montre le rôle primordial potentiel d'un dépôt calcique sur les fibres élastiques. Le rôle du Ca^{2+} cytoplasmique semble limité en présence de la calcification extracellulaire induite par le traitement vitamine D₃-nicotine et, dans une moindre mesure, lors du vieillissement. En effet, les concentrations basales de Ca^{2+} cytoplasmique sont similaires à tous les âges (Chapitre III), et chez les rats TEM et VDN (Chapitre IV). De plus, lors de la stimulation par la noradrénaline, le niveau de Ca^{2+} cytoplasmique est inchangé chez les rats VDN, et semblable au cours du vieillissement (entre 12 et 24 mois). Ainsi, le dépôt calcique dans la matrice extracellulaire semble être le facteur prédominant. Cependant, d'autres paramètres peuvent aussi intervenir au cours du vieillissement vasculaire, tels qu'une augmentation du taux de collagène, une hypertrophie et/ou une hyperplasie cellulaire, *etc.* Le système rénine-angiotensine

par l'action de l'angiotensine II pourrait être l'un des facteurs avec la pression artérielle à l'origine de ces changements.

L'action à long terme d'un IECA s'est avérée limitée à une baisse de la pression artérielle systolique (et vraisemblablement à celle de la pression artérielle moyenne) et à une diminution de la masse cardiaque chez les rats TEM et de l'hypertrophie cardiaque chez les rats VDN. Ni les taux de calcium extracellulaire, ni les paramètres morphologiques (diamètre, épaisseur pariétale) et fonctionnels de l'artère carotide (capacité d'amortissement artériel, réactivité vasculaire) ne sont affectés par l'IECA. L'effet de l'IECA sur la masse cardiaque peut provenir d'une action directe ou indirecte *via* la baisse de la pression artérielle (Figure 5). Cependant, l'absence d'un effet direct de l'IECA sur l'élasticité de l'artère carotide n'exclut pas son efficacité sur d'autres artères notamment l'aorte. Les conséquences d'une modification de l'élasticité aortique sont certainement plus importantes à l'égard de l'impédance caractéristique dont dépend la post-charge.

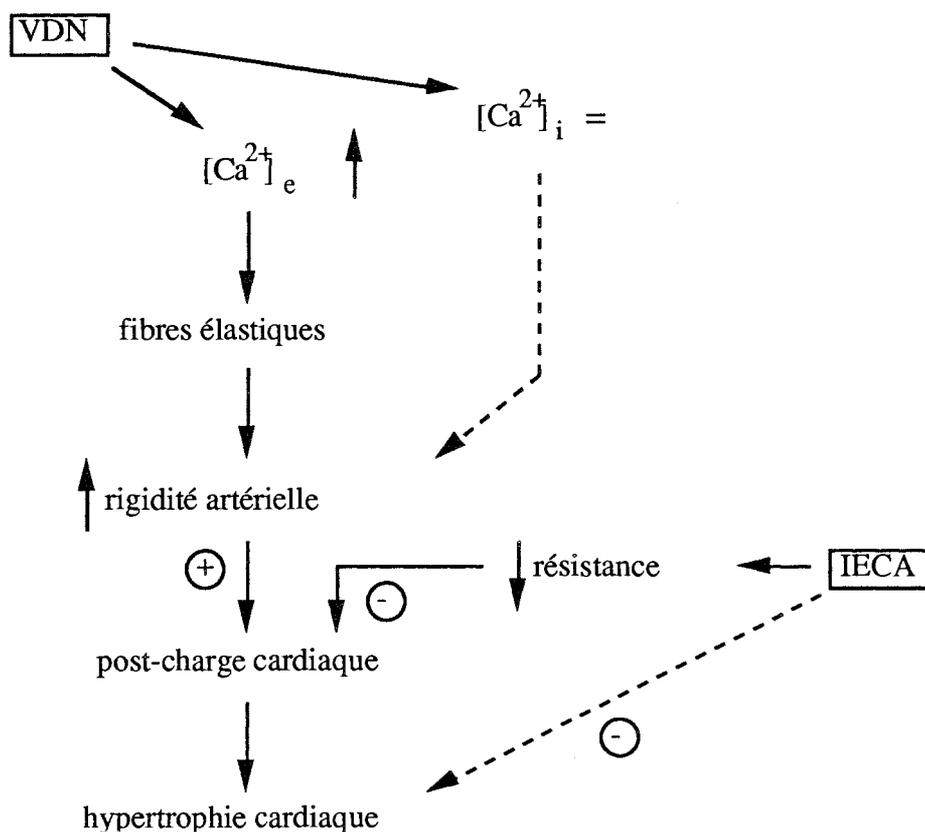


Figure 5. Hypothèse du rôle artériel du calcium dans l'effet VDN chez le rat et du principal rôle d'un IECA.

REFERENCES

AARS, H. (1969). Relationship between blood pressure and diameter of ascending aorta in normal and hypertensive rabbits. *Acta Physiol. Scand.*, **75**, 397-405.

ADELSTEIN, R.S., CONTI, M.A. & PATO, M.D. (1980). Regulation of myosin light chain kinase by reversible phosphorylation and calcium-calmodulin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **356**, 142-150.

ANLIKER, M., HISTAND, M.B. & OGDEN, E. (1968). Dispersion and attenuation of small artificial pressure waves in the canine aorta. *Circ. Res.*, **23**, 539-551.

APTER, J.T. (1967). Correlation of visco-elastic properties of large arteries with microscopic structure. IV. Thermal responses of collagen, elastin, smooth muscle, and intact arteries. *Circ. Res.*, **21**, 901-918.

ATKINSON, J. (1992). Vascular calcium overload. Physiological and pharmacological consequences. *Drugs*, **44** (Suppl. 1), 710-714.

ATKINSON, J., POITEVIN, P., CHILLON, J.M., LARTAUD, I. & LEVY, B. (1994a). Vascular calcium overload produced by vitamin D₃ plus nicotine treatment diminishes arterial distensibility in rats. *Am. J. Physiol.*, **266**, H540-H547.

ATKINSON, J., TATCHUM-TALOM, R. & CORMAN, B. (1994b). Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes. III. Endothelial function of mesenteric arterial bed of rat. *Am. J. Physiol.*, **267**, R136-R143.

AVOLIO, A.P., CHEN, S.G., WANG, R.P., ZHANG, C.L., LI, M.F. & O'ROURKE, M.F. (1983). Effects of aging on changing arterial compliance and left ventricular load in a northern chinese urban community. *Circulation*, **68**, 50-58.

AVOLIO, A.P., FA-QUAN, D., WEI-QIANG, L., YAO-FEI, L., ZHEN-JONG, H., LIAN-FEN, X. & O'ROURKE, M.F. (1985). Effects of aging on arterial distensibility in populations with high and low prevalence of hypertension: comparison between urban and rural communities in China. *Circulation*, **71**, 202-210.

BACCARANI-CONTRI, M., VINCENZI, D., CICCETTI, F. & PASQUALI-RONCHETTI, I. (1990). Immunolocalization of proteoglycans within normal elastin fibre. *Eur. J. Cell Biol.*, **53**, 305-312.

BALDWIN, A.L. & WILSON, L.M. (1993). Endothelium increases medial hydraulic conductance of aorta, possibly by release of EDRF. *Am. J. Physiol.*, **264**, H26-H32.

BAND, W., GOEDHARD, W.J.A. & KNOOP, A.A. (1972). Effects of aging on dynamic viscoelastic properties of the rat's thoracic aorta. *Pflügers Arch.*, **331**, 18-25.

BARDY, N., Merval, R., SAMUEL, J.L. & TEDGUI, A. (1994). Effets de l'angiotensine II et de la pression sur l'expression de la fibronectine cellulaire dans la paroi vasculaire en culture organotypique. *Arch. Mal. Cœur*, **87**, 991-995.

BARNETT, G.O., MALLOS, A.J. & SHAPIRO, A. (1961). Relationship of aortic pressure and diameter in the dog. *J. Appl. Physiol.*, **16**, 545-548.

BARRY, D.I & LASSEN, N.A. (1984). Cerebral blood flow autoregulation in hypertension and effect of antihypertensive drugs. *J. Hypertens.*, **2** (Suppl. 5), S285-S289.

BAUER, R.D. & PASCH, T. (1971). The quasistatic and dynamic circumferential elastic modulus of the rat tail artery studied at various wall stresses and tones of the vascular smooth muscle. *Pflügers Arch.*, **330**, 335-346.

BEAN, B.P., STUREK, M., PUGA, A. & HERMSMEYER, K. (1986). Calcium channels in muscle cells isolated from rat mesenteric arteries : modulation by dihydropyridine. *Circ. Res.*, **59**, 229-235.

BELL, L.B., HOPP, F.A., SEAGARD, J.L., VAN BREDERODE, H.F.M. & KAMPINE, J.P. (1988). A continuous noncontact method for measuring *in situ* vascular diameter with a video camera. *J. Appl. Physiol.*, **64**, 1279-1284.

BENETOS, A., PANNIER, B., BRAHAMI, M., SAFAR, M.E. & LEVY, B.I. (1993). Dose related changes in the mechanical properties of the carotid artery in WKY rats and SHR following relaxation of arterial smooth muscle. *J. Vasc. Res.*, **30**, 23-29.

BENHAM, C.D., HESS, P. & TSIEN, R.W. (1987). Two types of calcium channel in single smooth muscle cells from rabbit ear artery studied with whole-cell and single-channel recordings. *Circ. Res.*, **61** (Suppl. 1), 10-16.

BERGEL, D.H. (1961a). The dynamic elastic properties of the arterial wall. *J. Physiol.*, **156**, 458-469.

BERGEL, D.H. (1961b). The static elastic properties of the arterial wall. *J. Physiol.*, **156**, 445-457.

BERRY, C.L. (1987). Organogenèse de la paroi artérielle. Dans *Les maladies de la paroi artérielle*. eds. Camilleri, J.P., Berry, C.L., Fiessinger, J.N. & Bariéty, J. pp. 44-59. Paris : Flammarion, Médecine-Science.

BIRDWELL, C.R., GOSPODAROWICZ, D. & NICOLSON, G.L. (1978). Identification, localization, and role of fibronectin in cultured bovine endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 3273-3277.

BLAUSTEIN, M.P., ASHIDA, T., GOLDMAN, W.F., WIER, W.G. & HAMLYN, J.M. (1986). Sodium/calcium exchange in vascular smooth muscle : a link between sodium metabolism and hypertension. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **488**, 199-216.

BLUMENTHAL, H.T., LANSING, A.I. & WHEELER, P.A. (1944). Calcification of the media of the human aorta and its relation to intimal arteriosclerosis, aging and disease. *Am. J. Pathol.*, **20**, 665-679.

BLUMENTHAL, H.T., LANSING, A.I. & GRAY, S.H. (1950). The interrelation of elastic tissue and calcium in the genesis of arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.*, **26**, 989-1009.

BOLTON, T.B. (1979). Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.*, **59**, 606-718.

BOUTHIER, J., BENETOS, A., SIMON, A., LEVENSON, J. & SAFAR, M. (1985). Pulsed Doppler evaluation of diameter, blood velocity and blood flow of common carotid artery in sustained essential hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **7**, S99-S104.

BRANT, A.M., RODGERS, V.G.J. & BOROVIETZ, H.S. (1987). Measurement *in vitro* of pulsatile arterial diameter using a helium-neon laser. *J. Appl. Physiol.*, **62**, 679-683.

BROWNLEE, M., VLASSARA, H. & CERAMI, A. (1984). Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Intern. Med.*, **101**, 527-537.

BURGER, W., KELLNER, C. & BUSSE, R. (1984). Effects of active and passive wall stress changes on the rhythmic mechanical activity of the pressurized rat tail artery. *Blood Vessels*, **21**, 231-245.

BURTON, A.C. (1954). Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels. *Physiol. Rev.*, **34**, 619-642.

BUSSE, R., HOLTZ, J. & BASSENGE, E. (1983). Biomechanics of activated epicardial canine coronary arteries *in vitro* and *in vivo*. Dans *Mechanics of the coronary circulation*. eds. Mates, Nerem & Stein pp. 83-86. New York : American Society of Mechanical Engineering.

CALLAGHAN, F.J., BABBS, C.F., BOURLAND, J.D. & GEDDES, L.A. (1984). The relationship between arterial pulse-wave velocity and pulse frequency at different pressures. *J. Med. Eng. Technol.*, **8**, 15-18.

CALLAGHAN, F.J., GEDDES, L.A., BABBS, C.F. & BOURLAND, J.D. (1986). Relationship between pulse-wave velocity and arterial elasticity. *Med. Biol. Eng. Comput.*, **24**, 248-254.

CAPDEVILLE-ATKINSON, C., OSTER, L., THORIN-TRESCASES, N., ROBERT, A., BOUTINET, S. & ATKINSON, J. (1993). Intracellular free Ca^{2+} and vasoconstriction determined simultaneously in the perfused rat tail artery. *Am. J. Physiol.*, **265**, C1689-C1702.

CAPDEVILLE-ATKINSON, C., OSTER, L., THORIN-TRESCASES, N., ROBERT, A., CORMAN, B. & ATKINSON, J. (1995). Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes. V. Intracellular calcium-vasoreactivity coupling. *Am. J. Physiol.*, in press.

CAPLAN, B.A., GERRITY, R.G. & SCHWARTZ, C.J. (1974). Endothelial cell morphology in focal areas of *in vivo* Evans blue uptake of the young pig aorta. *Exp. Mol. Pathol.*, **21**, 102-117.

CAPUTO, L., TEDGUI, A., POITEVIN, P. & LEVY, B.I. (1992). *In vitro* assessment of diameter-pressure relationship in carotid arteries from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*, **10** (Suppl. 6), 527-530.

CARAFOLI, E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 395-433.

CAREW, T.E., VAISHNAV, R.N. & PATEL, D.J. (1968). Compressibility of the arterial wall. *Circ. Res.*, **23**, 61-68.

CARRIER, G.O., JACKSON, C.V. & OWEN, M.P. (1979). Influence of age on norepinephrine-induced vascular contractions as a function of extracellular calcium. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **26**, 433-446.

CHADWICK, C.C., SAITO, A. & FLEISCHER, S. (1990). Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 2132-2136.

CHANCE, B. & JOBSIS, F. (1959). Changes in fluorescence in a frog sartorius muscle following a twitch. *Nature*, **184**, 195-196.

CHILLON, J.M. (1991). Impact hémodynamique du vieillissement et de la surcharge calcique vasculaire chez le rat ; effet des inhibiteurs de flux calciques et des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I. Thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré-Nancy 1.

CLARK, J.M. & GLAGOV, S. (1985). Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. *Arteriosclerosis*, **5**, 19-34.

COBBOLD, P.H. & RINK, T.J. (1987). Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem. J.*, **248**, 313-328.

- COHEN, M.L. & BERKOWITZ, B.A. (1976). Vascular contraction : effect of age and extracellular calcium. *Blood Vessels*, **13**, 139-154.
- CONRAD, C.H., BROOKS, W.W., ROBINSON, K.G. & BING, O.H.L. (1991). Impaired myocardial function in spontaneously hypertensive rats with heart failure. *Am. J. Physiol.*, **260**, H136-H145.
- COX, R.H. (1977). Effects of age on the mechanical properties of rat carotid artery. *Am. J. Physiol.*, **233**, H256-H263.
- COX, R.H. (1978a). Comparison of carotid artery mechanics in the rat, rabbit, and dog. *Am. J. Physiol.*, **234**, H280-H288.
- COX, R.H. (1978b). Passive mechanics and connective tissue composition of canine arteries. *Am. J. Physiol.*, **234**, H533-H541.
- COX, R.H. (1979). Comparison of arterial wall mechanisms in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.*, **237**, H159-H167.
- COX, R.H. (1983). Age-related changes in arterial wall mechanics and composition of NIA Fischer rats. *Mech. Ageing Dev.*, **23**, 21-36.
- CRASS, M.F., HULSEY, S.M. & BULKLEY, T.J. (1988). Use of a new pulsatile perfused rat aorta preparation to study the characteristics of the vasodilator effect of parathyroid hormone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**, 723-734.
- DAVIDSON, J.M. (1990). Biochemistry and turnover of lung interstitium. *Eur. Resp. J.*, **3**, 1048-1068.

DETH, R.C. & VAN BREEMEN, C. (1974). Relative contributions of Ca²⁺ influx and cellular Ca²⁺ release during drug-induced activation of the rabbit aorta. *Pflügers Arch.*, **348**, 13-22.

DOBRIN, P.B. (1978). Mechanical properties of arteries. *Physiol. Rev.*, **58**, 397-458.

DOBRIN, P.B. (1983). Vascular mechanics. Dans *Handbook of physiology, Section 2 : The cardiovascular system, Vol. III : Peripheral circulation and organ blood flow*. eds. Shepherd, J.J. & Abboud, F.M. pp. 65-102. New York : American Physiology Society.

DOBRIN, P.B. & DOYLE, J.M. (1970). Vascular smooth muscle and the anisotropy of dog carotid artery. *Circ. Res.*, **27**, 105-119.

DOBRIN, P.B. & ROVICK, A.A. (1969). Influence of vascular smooth muscle on contractile mechanics and elasticity of arteries. *Am. J. Physiol.*, **217**, 1644-1651.

DOCHERTY, J.R. (1988). The effects of ageing on vascular α -adrenoceptors in pithed rat and rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, **146**, 1-5.

DUCKLES, S.P., CARTER, B.J. & WILLIAMS, C.L. (1985). Vascular adrenergic neuroeffector function does not decline in aged rats. *Circ. Res.*, **56**, 109-116.

DZAU, V.J. & SAFAR, M.E. (1988). Large conduit arteries in hypertension : role of the vascular renin-angiotensin system. *Circulation*, **77**, 947-948.

DZAU, V.J. & PRATT, R.E. (1991). Renin-angiotensin system. Dans *The heart and cardiovascular system*. eds. Fozzard, H.A et coll. pp. 1817-1850. New York : Raven Press.

EGGERMONT, J.A., VROLIX, M., WUYTACK, F., RAEYMAEKERS, L. & CASTEELS, R. (1988). The (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPases of the plasma membrane and of the endoplasmic reticulum in smooth muscle cells and their regulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **12** (Suppl. 5), S51-S55.

EHRlich, B.E. & WATRAs, J. (1988). Inositol 1,4,5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Nature*, **336**, 583-586.

EMMICK, J.T. & COHEN, M.L. (1986). Ageing and vasodilatation to atrial peptides. *Clin. Exp. Hypertens.*, **A8**, 75-90.

FARRAR, D.J., BONDS, M.G., RILEY, W.A. & SAWYER, J.K. (1991). Anatomic correlates of aortic pulse wave velocity and carotid artery elasticity during atherosclerosis progression and regression in monkeys. *Circulation*, **83**, 1754-1763.

FLECKENSTEIN, A., FREY, M. & FLECKENSTEIN-GRUN, G. (1983). Protection by calcium antagonists against experimental arterial calcinosis. Dans *Secondary prevention of coronary heart disease*. pp. 109-122. eds. Pyörälä, K. et coll. New York : George Thieme Verlag.

FLECKENSTEIN, A., FREY, M., ZORN, J. & FLECKENSTEIN-GRUN, G. (1990). Calcium, a neglected factor in hypertension and arteriosclerosis. Dans *Hypertension : pathophysiology, diagnosis and management*. eds. Laragh, J.H. & Brenner, B.M. pp. 471-509. New York : Raven Press.

FORNIERI, C., QUAGLINO, D. & MORI, G. (1989). Correlations between age and rat dermis modifications. Ultrastructural-morphometric evaluations and lysyl oxidase activity. *Aging*, **1**, 127-138.

- FORNIERI, C., QUAGLINO, D. & MORI, G. (1992). Role of the extracellular matrix in age-related modifications of the rat aorta. *Arterioscler. Thromb.*, **12**, 1008-1016.
- FOUDA, A.K. & ATKINSON, J. (1986). Sensitivity to noradrenaline and electrical stimulation decreases with age in the rat tail artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **334**, 37-39.
- FRANZBLAU, C., FARIS, B. & PAPAIOANNOU, P.L. (1969). Lysinonorleucine. A new amino acid from hydrolysates of elastin. *Biochemistry*, **8**, 2833-2837.
- FROHLICH, E.D., SASAKI, O., CHIEN, Y. & ARITA, M. (1992). Changes in cardiovascular mass, left ventricular pumping ability and aortic distensibility after calcium antagonists in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*, **10**, 1369-1378.
- FURUKAWA, K.I., TAWADA-IWATA, Y. & SHIGEKAWA, M. (1989). Modulation of plasma membrane Ca²⁺ pump by membrane potential in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biochem.*, **106**, 1068-1073.
- GANTER, P. & JOLLES, G. (1970). *Histochimie normale et pathologique*. Tome 2. pp. 1432. Paris : Gauthier-Villars.
- GENT, A.N. (1972). Fracture of elastomers. Dans *Fracture*. ed. Leibowitz, H. New York : Academic Press.
- GERSTENBLITH, G., LAKATTA, E.G. & WEISFELDT, M.L. (1976). Age changes in myocardial function and exercise response. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **19**, 1-21.
- GILL, T.J., SMITH, G.J., WISSLER, R.W. & KUNZ, H.W. (1989). The rat as an experimental animal. *Science*, **245**, 269-276.

GIRERD, X.J., ACAR, C., MOURAD, J.J., BOUTOUYRIE, P., SAFAR, M.E. & LAURENT, S. (1992). Incompressibility of the human arterial wall : an *in vitro* ultrasound study. *J. Hypertens.*, **10** (Suppl. 6), S111-S114.

GIRERD, X., COPIE, X., MOURAD, J.J., MOULIN, C., ACAR, C., MIGNOT, J.P., SAFAR, M. & LAURENT, S. (1994). Mesure de la masse vasculaire de l'artère radiale humaine par méthode ultrasonique. *Arch. Mal. Cœur*, **87**, 1019-1022.

GOW, B.S. (1966). An electrical caliper for measurement of pulsatile arterial diameter changes *in vivo*. *J. Appl. Physiol.*, **20**, 1122-1126.

GREENE, M.A., FRIEDLANDER, R., BOLTAX, A.J., HADJIGEORGE, C.G. & LUSTIG, G.A. (1966). Distensibility of arteries in human hypertension. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **121**, 580-585.

GREENFIELD, J.C., TINDALL, G.T., DILLON, M.L. & MAHALEY, M.S. (1964). Mechanics of the human common carotid artery *in vivo*. *Circ. Res.*, **15**, 240-246.

GRODEN, D.L., GUAN, Z. & STOKES, B.T. (1991). Determination of fura-2 dissociation constants following adjustment of the apparent Ca-EGTA association constant for temperature and ionic strength. *Cell Calcium*, **12**, 279-287.

GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M. & TSIEN, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440-3450.

GURNEY, A.M. (1990). Measurement and control of intracellular calcium. Dans *Receptor-effector coupling, a practical approach*. ed. Hulme, E.C. pp. 117-153. Oxford : IRL Press.

GUYTON, A.C. (1991). Textbook of Medical Physiology, huitième édition. Philadelphie : WB Saunders Company.

HALLOCK, P. & BENSON, I.C. (1937). Studies on the elastic properties of human isolated aorta. *J. Clin. Invest.*, **16**, 595-602.

HALPERN, W. & KELLEY, M. (1991). *In vitro* methodology for resistance arteries. *Blood vessels*, **28**, 245-251.

HARDER, D.R. (1987). Pressure-induced myogenic activation of cat cerebral arteries is dependent on intact endothelium. *Circ. Res.*, **60**, 102-107.

HARDOUIN, S., BOURGEOIS, F., BESSE, S., MACHIDA, C.A., SWYNGHEDAUW, B. & MOALIC, J.M. (1993). Decreased accumulation of β_1 -adrenergic receptor, G α s and total myosin heavy chain messenger RNAs in the left ventricle of senescent rat heart. *Mech. Ageing Dev.*, **71**, 169-188.

HASS, G.M., LANDERHOLM, W. & HEMMENS, A. (1966). Production of calcific atherosclerosis and thromboarteritis with nicotine, vitamin D and dietary cholesterol. *Am. J. Pathol.*, **49**, 739-771.

HAUDENSCHILD, C.C., PRESCOTT, M.F. & CHOBANIAN, A.V. (1981). Aortic endothelial and subendothelial cells in experimental hypertension and aging. *Hypertension*, **3** (Suppl. I), I148-I153.

HAYASHI, S. & TODA, N. (1978). Age-related changes in the response of rabbit isolated aortae to vasoactive agents. *Br. J. Pharmacol.*, **64**, 229-237.

HAYOZ, D., NUSSBERGER, J., WAEBER, B. & BRUNNER, H.R. (1993). The renin-angiotensin system and arterial wall behavior. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **22** (Suppl. 5), S48-S52.

HENRION, D., CHILLON, J.M., GODEAU, G., MULLER, F., CAPDEVILLE-ATKINSON, C., HOFFMAN, M. & ATKINSON, J. (1991a). The consequences of aortic calcium overload following vitamin D₃ plus nicotine treatment in young rats. *J. Hypertens.*, **9**, 919-926.

HENRION, D., CHILLON, J.M., CAPDEVILLE-ATKINSON, C., VINCENEUX-FEUGIER, M. & ATKINSON, J. (1991b). Chronic treatment with the angiotensin I converting enzyme inhibitor, perindopril, protects *in vitro* carbachol-induced vasorelaxation in a rat model of vascular calcium overload. *Br. J. Pharmacol.*, **104**, 966-972.

HENRION, D., LAHER, I. & BEVAN, J.A. (1992). Intraluminal flow increases vascular tone and ⁴⁵Ca²⁺ influx in the rabbit facial vein. *Circ. Res.*, **71**, 339-345.

HERLIHY, J.T. (1980). Helically cut vascular strip preparation : geometrical considerations. *Am. J. Physiol.*, **238**, H107-H109.

HOEKS, A.P.G., BRANDS, P.J., SMEETS, G.A.M. & RENEMAN, R.S. (1990). Assessment of the distensibility of superficial arteries. *Ultrasound Med. Biol.*, **16**, 121-128.

HONGO, K. & CHIBA, S. (1983). A new method for measuring vascular responsiveness of relatively larger arteries of dog. *J. Pharmacol. Method*, **9**, 83-91.

HRUZA, Z. & ZWEIFACH, B.W. (1967). Effect of age on vascular reactivity to catecholamines in rats. *J. Gerontol.*, **22**, 469-473.

- HYNES, M.R. & DUCKLES, S.P. (1987). Effect of increasing age on the endothelium-mediated relaxation of rat blood vessels *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **241**, 387-392.
- IMURA, T., YAMAMOTO, K., KANAMORI, K., MIKAMI, T. & YASUDA, H. (1986). Non-invasive ultrasonic measurement of the elastic properties at the human abdominal aorta. *Cardiovasc. Res.*, **20**, 209-214.
- JACKSON, A.P., TIMMERMAN, M.P., BAGSHAW, C.R. & ASHLEY, C.C. (1987). The kinetics of calcium binding to fura-2 and indo-1. *FEBS Lett.*, **216**, 35-39.
- JACKSON, B., CUBELA, R. & JOHNSTON, C.I. (1987). Angiotensin-converting enzyme inhibitors : measurement of relative inhibitory potency and serum drug levels by radioinhibitor binding displacement assay. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **36**, 1357-1360.
- JACOB, M.P. (1993). L'élastine : préparation, caractérisation, structure et catabolisme. *C. R. Soc. Biol.*, **187**, 166-180.
- JENSEN, P.E., MULVANY, M.J. & AALKJÆR, C. (1992). Endogenous and exogenous agonist-induced changes in the coupling between $[Ca^{2+}]_i$ and force in rat resistance arteries. *Pflügers Arch.*, **420**, 536-543.
- JENSEN, P.E., MULVANY, M.J., AALKJÆR, C., NILSSON, H. & YAMAGUCHI, H. (1993). Free cytosolic Ca^{2+} measured with Ca^{2+} -selective electrodes and fura-2 in rat mesenteric resistance arteries. *Am. J. Physiol.*, **265**, H741-H746.
- JOANNIDES, R., RICHARD, V., HENRY, J.P. & THUILLEZ, C. (1994). Modification des propriétés mécaniques de la paroi artérielle évaluées *in vivo* chez les rats spontanément hypertendus. *Arch. Mal. Cœur*, **87**, 1047-1050.

JOHNSTON, C.I., CUBELA, R. & JACKSON, B. (1988). Relative inhibitory potency and plasma drug levels of angiotensin converting enzyme inhibitors in the rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **15**, 123-129.

KAMM, K.E. & STULL, J.T. (1985). The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **25**, 593-620.

KANNEL, W.B. (1987). Hypertension and other risk factors in coronary heart disease. *Am. Heart J.*, **114**, 918-925.

KAO, J.P.Y., HAROOTUNIAN, A.T. & TSIEN, R.Y. (1989). Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J. Biol. Chem.*, **264**, 8179-8184.

KELLY, R., HAYWARD, C., AVOLIO, A. & O'ROURKE, M. (1989). Noninvasive determination of age-related changes in the human arterial pulse. *Circulation*, **80**, 1652-1659.

KINSELLA, M.G. & WIGHT, T.N. (1986). Modulation of sulfated proteoglycan synthesis by bovine aortic endothelial cells during migration. *J. Cell Biol.*, **102**, 679-687.

KONISHI, M., OLSON, A., HOLLINGWORTH, S. & BAYLOR, S.M. (1988). Myoplasmic binding of fura-2 investigated by steady-state fluorescence and absorbance measurements. *Biophys. J.*, **54**, 1089-1104.

KORTEWEG, D.J. (1878). Über die Fortpflanzungsgeschwindigkeit des Schalles in elastischen Röhren. *Ann. Phys. Chem.*, **5**, 525-542.

LAKATTA, E.G. (1980). Age-related alterations in the cardiovascular response to adrenergic mediated stress. *FASEB J.*, **39**, 3173-3177.

LANGEWOUTERS, G.J., WESSELING, K.H. & GOEDHARD, W.J.A. (1984). The static elastic properties of 45 human thoracic and 20 abdominal aortas and the parameters of a new model. *J. Biomechanics*, **17**, 425-435.

LARTAUD, I., MAKKI, T., BRAY-DES BOSCS, L., NIEDERHOFFER, N., ATKINSON, J., CORMAN, B. & CAPDEVILLE-ATKINSON, C. (1994). Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes. IV. Cerebral blood flow regulation. *Am. J. Physiol.*, **267**, R687-R694.

LATTANZIO, F.A. & BARTSCHAT, D.K. (1991). The effect of pH on rate constants, ion selectivity and thermodynamic properties of fluorescent calcium and magnesium indicators. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **177**, 184-191.

LAURENT, S., HAYOZ, D., TRAZZI, S., BOUTOUYRIE, P., WAEBER, B., OMBONI, S., BRUNNER, H.R., MANCIA, G. & SAFAR, M. (1993). Isobaric compliance of the radial artery is increased in patients with essential hypertension. *J. Hypertens.*, **11**, 89-98.

LAURENT, S., LACOLLEY, P., GIRERD, X., CAVIEZEL, B., BECK, L., CHALLANDE, P. & SAFAR, M. (1994). La compliance artérielle n'est pas diminuée chez l'hypertendu lorsqu'elle est comparée à même niveau de pression artérielle. *Arch. Mal. Cœur*, **87**, 1069-1072.

LEAROYD, B.M. & TAYLOR, M.G. (1966). Alterations with age in the viscoelastic properties of human arterial walls. *Circ. Res.*, **18**, 278-292.

LEE, M.C. & HAUT, R.C. (1992). Strain rate effects on tensile failure properties of the common carotid artery and jugular veins of ferrets. *J. Biomechanics*, **25**, 925-927.

LEES, K.R. & REID, J.L. (1987). The haemodynamic and humoral effects of treatment for one month with the angiotensin converting enzyme inhibitor perindopril in salt replete hypertensive patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **31**, 519-524.

LEES, K.R. & REID, J.L. (1990). Perindopril. Dans *Cardiovascular drug therapy*. ed. Messerli, F.H. pp. 817-823. Philadelphie : Saunders.

LEHMANN, E.D., GOSLING, R.G., PARKER, J.R., DE SILVA, T. & TAYLOR, M.G. (1993). A blood pressure independent index of aortic distensibility. *Br. J. Radiol.*, **66**, 126-131.

LEUNG, D.Y.M., GLAGOV, S. & MATHEWS, M.B. (1976). Cyclic stretching stimulates synthesis of matrix components by arterial smooth muscle cells *in vitro*. *Science*, **191**, 475-477.

LEVY, B.I., MICHEL, J.B., SALZMANN, J.L., AZIZI, M., POITEVIN, P., SAFAR, M.E. & CAMILLERI, J.P. (1988). Effects of chronic inhibition of converting enzyme on mechanical and structural properties of arteries in rat renovascular hypertension. *Circ. Res.*, **63**, 227-239.

LEVY, B.I., BENESSIANO, J., POITEVIN, P. & SAFAR, M.E. (1990). Endothelium-dependent mechanical properties of the carotid artery in WKY and SHR. *Circ. Res.*, **66**, 321-328.

LEWIS, D.A., LOOMIS, J.L. & SEGAL, S.S. (1991). Preservation of endothelial cells in excised rat carotid arteries. Effects of transmural pressure and segment length. *Circ. Res.*, **69**, 997-1002.

LINDERMAN, J.J., HARRIS, L.J., SLAKEY, L.L. & GROSS, D.J. (1990). Charge-coupled device imaging of rapid calcium transients in cultured arterial smooth muscle cells. *Cell Calcium*, **11**, 131-144.

LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FAN, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **19**, 265-275.

McADAMS, R.P. & WATERFALL, J.F. (1986). The effect of age on the sensitivity of pre- and postsynaptic alpha-adrenoceptors to agonists and antagonists in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **334**, 430-435.

McDONALD, D.A. (1974). Blood flow in arteries, deuxième édition. Londres : Edward Arnold.

McFAYDEN, R.J., LEES, K.R. & REID, J.L. (1990). Perindopril. A review of its pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Drugs*, **39**, 49-63.

McVEIGH, G.E., BURNS, D.E., FINKELSTEIN, S.M., McDONALD, K.M., MOCK, J.E., FESKE, W., CARLYLE, P.F., FLACK, J., GRIMM, R. & COHN, J.N. (1991). Reduced vascular compliance as a marker for essential hypertension. *Am. J. Hypertension*, **4**, 245-251.

MAKKI, T., LARTAUD, I., BRAY-DES BOSCS, L., CAPDEVILLE-ATKINSON, C., CHILLON, J.M., HOFFMAN, M., NICOLAS, J.P. & ATKINSON, J. (1992). Haemodynamic effects of a new dihydropyridine calcium entry blocker, S-12968(-), in a rat model of cardiovascular calcium overload. *Br. J. Pharmacol.*, **106**, 79-84.

MAKKI, T., TATCHUM TALOM, R., NIEDERHOFFER, N., AMIN, F., TANKOSIC, P., MERTES, P.M. & ATKINSON, J. (1994). The angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, increases arterial distensibility without lowering blood pressure in normotensive rats. *Br. J. Pharmacol.*, **111**, 555-560.

MALIK, K.U. & MASJLETT, A. (1976). Facilitation of adrenergic transmission by locally generated angiotensin II in rat mesenteric arteries. *Circ. Res.*, **60**, 422-428.

MATSUDA, M., NOSAKA, T., SATO, M. & OHSHIMA, N. (1993). Effects of physical exercise on the elasticity and elastic components of the rat aorta. *Eur. J. Appl. Physiol.*, **66**, 122-126.

MECHAM, R.P. & HEUSER, J.E. (1991). The elastic fibre. Dans *Cell biology of the extracellular matrix*, deuxième édition. ed. Hay, E.D. New York : Plenum Press.

MEININGER, G.A., ZAWIEJA, D.C., FALCONE, J.C., HILL, M.A. & DAVEY, J.P. (1991). Calcium measurement in isolated arterioles during myogenic and agonist stimulation. *Am. J. Physiol.*, **261**, H950-H959.

MERILLON, J.P., MOTTE, G., FRUCHAUD, J., MASQUET, C. & GOURGON, R.C. (1978). Evaluation of the elasticity and characteristic impedance of the ascending aorta in man. *Cardiovasc. Res.*, **12**, 401-406.

MICHEL, J.B., HEUDES, D., MICHEL, O., POITVIN, P., PHILIPPE, M., SCALBERT, E., LEVY, B.I. & CORMAN, B. (1994). Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on the aging processes. II. Large arteries. *Am. J. Physiol.*, **267**, R124-R135.

MILNOR, W.R. (1989). Hemodynamics, deuxième édition. Baltimore : Williams et Wilkins.

MINTA, A.K, KOA, J.P.Y. & TSIEN, R.Y. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.*, **264**, 8171-8178.

MOENS, A.I. (1878). Die Pulscurve. Brill, E.J., Leiden, pp. 87-95.

MOLINARI-TOSATTI, M.P. & GOTTE, L. (1971). Some features of the binding of calcium ions to elastin. *Calc. Tiss. Res.*, **6**, 329-334.

MOURLON-LE GRAND, M.C., BENESSIANO, J. & LEVY, B.I. (1992). cGMP pathway and mechanical properties of carotid artery wall in WKY rats and SHR : role of endothelium. *Am. J. Physiol.*, **263**, H61-H67.

MURGO, J.P., WESTERHOF, N., GIOLMA, J.P. & ALTOBELLI, S.A. (1981). Manipulation of ascending aortic pressure and flow wave reflections with the Valsava maneuver : relation to input impedance. *Circulation*, **63**, 122-132.

NAKASHIMA, T. & TANIKAWA, J. (1971). A study of human aortic distensibility with relation to atherosclerosis and aging. *Angiology*, **22**, 477-490.

NICHOLS, W.W., O'ROURKE, M.F., AVOLIO, A.P., YAGINUMA, T., MURGO, J.P., PEPINE, C.J. & CONTI, C.R. (1985). Effects of age on ventricular-vascular coupling. *Am. J. Cardiol.*, **55**, 1179-1184.

NICHOLS, W.W. & O'ROURKE, M.F. (1990). McDonald's Blood flow in arteries, troisième édition. Londres : Edward Arnold.

NYBORG, N.C.B. (1991). Ageing is associated with increased 5-HT₂-receptor affinity and decreased receptor reserve in rat isolated coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.*, **102**, 282-286.

OAKES, S.G., MARTIN, W.J., LISEK, C.A. & POWIS, G. (1988). Incomplete hydrolysis of the calcium indicator precursor fura-2 pentacetoxymethyl ester (fura-2 AM) by cells. *Analyt. Biochem.*, **169**, 159-166.

OLAH, M.E. & RAHWAN, R.G. (1987). Age-related changes in responsiveness of the rat aorta to depolarizing and receptor-mediated contractile stimuli and to calcium antagonism. *Pharmacology*, **35**, 163-173.

O'ROURKE, M.F., AVOLIO, A.P. & KELLY, R.P. (1991). The arterial pulse. Baltimore : Lea and Febiger.

OSTER, L. (1991). Mise au point de la mesure simultanée du calcium myoplasmique et de la réactivité d'une artère isolée et perfusée de rat. Etude de l'influence du vieillissement sur le couplage calcium myoplasmique - vasoréactivité. Thèse de Doctorat de l'Université Claude Bernard - Lyon I.

PACAUD, P., LOIRAND, G., MIRONNEAU, C. & MIRONNEAU, J. (1987). Opposing effects of noradrenaline on the two classes of voltage-dependent calcium channels of single vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflügers Arch.*, **410**, 557-559.

PAGANI, M., GAIG, H., SHERMAN, A., MANDERS, W.T., QUINN, P., PATRICK, T., FRANKLIN, D. & VATNER, S.F. (1978). Measurement of multiple simultaneous small dimensions and study of arterial pressure-diameter relation in conscious animals. *Am. J. Physiol.*, **234**, H610-H617.

PATEL, D.J. & FRY, D.L. (1964). *In situ* pressure-radius-length measurements in ascending aorta of anesthetized dogs. *J. Appl. Physiol.*, **19**, 413-416.

PATEL, D.J., JANICKI, J.S. & CAREW, T.E. (1969). Static anisotropic elastic properties of the aorta in living dogs. *Circ. Res.*, **25**, 765-779.

PATEL, D.J. & VAISHNAV, R.N. (1972). The rheology of large blood vessels. Dans *Cardiovascular fluid dynamics*. ed. Bergel, D.H. pp. 2-64. Londres : Academic Press.

PERDOMO, J.J., GOUNON, P., SCHAEVERBEKE, M., SCHAEVERBEKE, J., GROULT, V., JACOB, M.P. & ROBERT, L. (1994). Interaction between cells and elastin fibers : an ultrastructural and immunocytochemical study. *J. Cell. Physiol.*, **158**, 451-458.

PETERSON, L.H. (1966). General types of dimensional transducer. Dans *Methods in medical research*, Vol. 11. ed. Rushmer, R.F. pp. 5-23. Chicago : Year Book Medical Publishers.

PETERSON, L.H., JENSEN, R.E. & PARNELL, J. (1960). Mechanical properties of arteries *in vivo*. *Circ. Res.*, **8**, 622-639.

PFEFFER, J.M., PFEFFER, M.A., FISHBEIN, M.C. & FROHLICH, E.D. (1979). Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.*, **237**, H461-H468.

PFEFFER, J.M., PFEFFER, M.A., MIRSKY, I. & BRAUNWALD, E. (1982). Regression of left ventricular hypertrophy and prevention of left ventricular dysfunction by captopril in the spontaneously hypertensive rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 3310-3314.

POENIE, M. (1990). Alteration of intracellular fura-2 fluorescence by viscosity : a simple correction. *Cell Calcium*, **11**, 85-91.

RASGADO-FLORES, H. & BLAUSTEIN, M.P. (1987). Na/Ca exchange in barnacle muscle cells has a stoichiometry of $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$. *Am. J. Physiol.*, **252**, C499-C504.

REMYNGTON, J.W. (1955). Hysteresis loop behaviour of the aorta and other extensible tissues. *Am. J. Physiol.*, **180**, 83-95.

RICHER, C., DOUSSAU, M.P. & GIUDICELLI, J.F. (1986). Perindopril, a new converting enzyme inhibitor : systemic and regional hemodynamics and sympathoinhibitory effects in spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **8**, 346-357.

ROBERT, L. & BIREMBAUT, P. (1987). La matrice extra-cellulaire de la paroi artérielle. Dans *Les maladies de la paroi artérielle*. eds. Camilleri, J.P., Berry, C.L., Fiessinger, J.N. & Bariéty, J. pp. 31-41. Paris : Flammarion, Médecine-Science.

ROE, M.W., LEMASTERS, J.J. & HERMAN, B. (1990). Assessment of fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. *Cell Calcium*, **11**, 63-73.

ROWE, J.W. & TROEN, B.R. (1980). Sympathetic nervous system and aging in man. *Endocrine Rev.*, **1**, 167-179.

ROY, C.S. (1880). The elastic properties of the arterial wall. *J. Physiol.*, **3**, 125-159.

RUCKER, R.B., FORD, D., GOETTLICH RIEMANN, W. & TOM, K. (1974). Additional evidence for the binding of calcium ions to elastin at neutral sites. *Calc. Tiss. Res.*, **14**, 317-325.

RYAN, J.W., CHUNG, A., AMMONS, C. & CARLTON, M.L. (1977). A simple radioassay for angiotensin-converting enzyme. *Biochem. J.*, **167**, 501-504.

SAFAR, M.E., PERONNEAU, P.A., LEVENSON, J.A., TOTO-MOUKOUO, J.A. & SIMON, A.C. (1981). Pulsed Doppler : diameter, blood flow velocity and volumic flow of the brachial artery in sustained essential hypertension. *Circulation*, **63**, 393-400.

SAFAR, M.E., LAURENT, S., BOUTHIER, J.A. & LONDON, G.M. (1986). Comparative effects of captopril and isosorbide dinitrate on the arterial wall of hypertensive human brachial arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **8**, 1257-1261.

SAFAR, M.E., LAURENT, S., BENETOS, A. & LONDON, G.M. (1988). The common carotid circulation in patients with essential hypertension. *Stroke*, **19**, 1198-1202.

- SAFAR, M., PANNIER, B., LAURENT, S. & LONDON, G.M. (1989). Calcium entry blockers and arterial compliance in hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **14**, S1-S6.
- SAFAR, M.E., ASMAR, R.G. & BENETOS, A. (1992). Large artery dilation produced by converting enzyme inhibition : therapeutic aspects. *Am. J. Medicine*, **92** (Suppl. 4B), 475-535.
- SAIDA, K. & VAN BREEMEN, C. (1983). A possible Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mechanism mediated by norepinephrine in vascular smooth muscle. *Pflügers Arch.*, **397**, 166-167.
- SAIDA, K., TWORT, C. & VAN BREEMEN, C. (1988). The specific GTP requirement for inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release from skinned vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **12** (Suppl. 5), S47-S50.
- SAKAI, L.Y., KEENE, D.R. & ENGVALL, E. (1986). Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J. Cell Biol.*, **103**, 2499-2509.
- SCANLON, M., WILLIAMS, D.A. & FAY, F.S. (1987). A Ca²⁺-insensitive form of fura-2 associated with polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.*, **262**, 6308-6312.
- SCHIFFMAN, E., LAVENDER, D.R., MILLER, E.J., & CORCORAN, B.A. (1969). Amino acids at the nucleating site in mineralizing tissue. *Calc. Tiss. Res.*, **3**, 125-135.
- SCHOLZ, R., THURMAN, R.G., WILLIAMSON, J.R., CHANCE, B. & BUCHER, T. (1969). Flavin and pyridine nucleotide oxidation-reduction changes in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.*, **244**, 2317-2324.
- SCOTT, P.J.W. & REID, J.L. (1982). The effect of age on the responses of human isolated arteries to noradrenaline. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **13**, 237-239.

SIMON, A.C., LEVENSON, J., BOUTHIER, J.D. & SAFAR, M.E. (1985). Effects of chronic administration of enalapril and propranolol on the large arteries in essential hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **7**, 856-861.

SPEDEEN, R.N. & FRECKELTON, D.J. (1970). Constriction of arteries at high transmural pressures. *Circ. Res.*, **26** (Suppl. 2), 99-111.

STARCHER, B.C. & GALIONE, M.J. (1976). Purification and comparison of elastins from different animal species. *Anal. Biochem.*, **74**, 441-447.

STEVENS, M.J., LIPE, S. & MOULDS, R.F.W. (1982). The effect of age on the responses of human isolated arteries and veins to noradrenaline. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **14**, 750-752.

SUMMA, Y. (1978). Determination of the tangential elastic modulus of human arteries *in vivo*. Dans *The arterial system*. eds. Bauer, R.D. & Busse, R. pp. 95-100. New York : Springer-Verlag.

SUTCLIFFE, M.C. & DAVIDSON, J.M. (1990). Effect of static stretching on elastin production by porcine aortic smooth muscle cells. *Matrix*, **10**, 148-153.

TAKAMIZAWA, K., HAYASHI, K. & MATSUDA, T. (1992). Isometric biaxial tension of smooth muscle in isolated cylindrical segments of rabbit arteries. *Am. J. Physiol.*, **263**, H30-H34.

TARDY, Y., MEISTER, J.J., PERRET, F., BRUNNER, H.R. & ARDITI, M. (1991). Non-invasive estimate of the mechanical properties of peripheral arteries from ultrasonic and photoplethysmographic measurements. *Clin. Phys. Physiol. Meas.*, **12**, 39-54.

TEDGUI, A., CHIRON, B., CURMI, P. & JUAN, L. (1987). Effect of nicardipine and verapamil on *in vitro* albumin transport in rabbit thoracic aorta. *Arteriosclerosis*, **7**, 80-87.

THORIN, E., HENRION, D., OSTER, L., THORIN-TRESCASES, N., CAPDEVILLE, C., MARTIN, J.A., CHILLON, J.M., HICKS, P.E. & ATKINSON, J. (1990). Vascular calcium overload produced by administration of vitamin D₃ and nicotine in rats. Changes in tissue calcium levels, blood pressure and pressure responses to electrical stimulation or norepinephrine *in vivo*. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **16**, 257-266.

THORIN, E. & ATKINSON, J. (1994). Modulation by the endothelium of sympathetic vasoconstriction in an *in vitro* preparation of the rat tail artery. *Br. J. Pharmacol.*, **111**, 351-357.

THORIN-TRESCASES, N., OSTER, L., ATKINSON, J. & CAPDEVILLE, C. (1990). Norepinephrine and serotonin increase the vasoconstrictor response of the perfused rat tail artery to changes in cytosolic Ca²⁺. *Eur. J. Pharmacol.*, **179**, 469-471.

TOUBOUL, P.J., PRATI, P., SCARABIN, P.Y., ADRAI, V., THIBOUT, E. & DUCIMETIERE, P. (1992). Use of monitoring software to improve the measurement of carotid wall thickness by B-mode imaging. *J. Hypertens.*, **10** (Suppl. 5), S37-S41.

TSIEN, R.Y. (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, **290**, 527-528.

TSIEN, R.Y., POZZAN, T. & RINK, T.J. (1982). Calcium homeostasis in intact lymphocytes : cytoplasmic calcium monitored with a new intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell Biol.*, **94**, 325-334.

TSIEN, R.Y., RINK, T.J. & POENIE, M. (1985). Measurement of cytosolic free Ca^{2+} in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium*, **6**, 145-157.

TUTTLE, R.S. (1966). Age related changes in the sensitivity of rat aortic strips to norepinephrine and associated chemical and structural alterations. *J. Gerontol.*, **21**, 510-516.

URRY, D.W. (1971). Neutral sites for calcium ion binding to elastin and collagen : a charge neutralization theory for calcification and its relationship to atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 810-814.

URRY, D.W. (1978). Molecular perspectives of vascular wall structure and disease : the elastic component. *Persp. Biol. Med.*, **21**, 265-295.

UTO, A., ARAI, H. & OGAWA, Y. (1991). Reassessment of fura-2 and the ratio method for determination of intracellular Ca^{2+} concentrations. *Cell Calcium*, **12**, 29-37.

VAN MERODE, T., VAN BORTEL, L., SMEETS, F.A.M., BÖHM, R., MOOIJ, J., RAHN, K.H. & RENEMAN, R.S. (1990). The effect of verapamil on carotid artery distensibility and cross-sectional compliance in hypertensive patients. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **15**, 109-113.

VATER, C.A., MAINARDI, C.L., HARRIS, E.D. & SIEGEL, R.C. (1979). Native crosslinks in collagen fibrils induce resistance to human synovial collagenase. *Biochem. J.*, **181**, 639-645.

WANSTALL, J.C. & O'DONNELL, S.R. (1988). Inhibition of norepinephrine contractions by diltiazem on aorta and pulmonary artery from young and aged rats : influence of alpha-adrenoceptor reserve. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**, 1016-1020.

WESTERHOF, N., ELZINGA, G. & SIPKEMA, P. (1971). An artificial arterial system for pumping hearts. *J. Appl. Physiol.*, **31**, 776-781.

WETTERER, E., BUSSE, R., BAUER, R.D., SCHABERT, A. & SUMMA, Y. (1977). Photoelectric device for contact-free recording of the diameters of exposed arteries *in situ*. *Pflügers Arch.*, **368**, 149-152.

WETTERER, E., BAUER, R.D. & BUSSE, R. (1978). New ways of determining the propagation coefficient and the visco-elastic behavior of arteries *in situ*. Dans *The arterial system*. eds. Bauer, R.D. & Busse, R. pp. 35-47. New York : Springer-Verlag.

WILENS, S.L. (1937). The postmortem elasticity of the adult aorta. Its relation to age and to the distribution of intimal atheromas. *Am. J. Path.*, **13**, 811-834.

WILLIAMS, D.A., FOGARTY, K.E., TSIEN, R.Y. & FAY, F.S. (1985). Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using fura-2. *Nature*, **312**, 558-561.

WILLIAMS, D.A. & FAY, F.S. (1990). Intracellular calibration of the fluorescent calcium indicator fura-2. *Cell Calcium*, **11**, 75-83.

WILLIAMS, D.A., HEAD, S.I., BAKKER, A.J. & STEPHENSON, D.G. (1990). Resting calcium concentrations in isolated skeletal muscle fibres of dystrophic mice. *J. Physiol.*, **428**, 243-256.

WOLINSKY, H. & GLAGOV, S. (1964). Structural basis for the static mechanical properties of the aortic media. *Circ. Res.*, **14**, 400-413.

YIN, F.C.P., SPURGEON, H.A., RAKUSAN, K., WEISFELDT, M.L. & LAKATTA, E.G. (1982). Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy : application in the aging rat. *Am. J. Physiol.*, **243**, H941-H947.

YIN, F.C.P., SPURGEON, H.A. & KALLMAN, C.H. (1983). Age-associated alterations in viscoelastic properties of canine aortic strips. *Circ. Res.*, **53**, 464-472.

YU, S.Y. & BLUMENTHAL, H.T. (1967). The calcification of elastic tissue. Dans *The connective tissue*. eds. Wagner, B.M. & Smith, D.E. pp. 17-49. Baltimore : Williams & Williams Co.

ZATZMAN, M., STACY, R.W., RANDALL, J. & EBERSTEIN, A. (1954). Time course of stress relaxation in isolated arterial segments. *Am. J. Physiol.*, **177**, 299-302.

ANNEXE

CHAPITRE II :

Tableau 5.1. Absorbance (unités arbitraires) de l'artère carotide non chargée ou chargée avec le furu-2 en fonction de la longueur d'onde (nm), soit en position proche, soit en position éloignée de la cellule réceptrice ($m \pm esm$, $n=7$ par groupe).

position :	artère carotide non chargée				artère carotide chargée			
	éloignée		proche		éloignée		proche	
longueur d'onde	m	$\pm esm$	m	$\pm esm$	m	$\pm esm$	m	$\pm esm$
300	0,742	0,064	0,478	0,064	0,750	0,060	0,495	0,057
310	0,807	0,100	0,515	0,036	0,812	0,102	0,535	0,035
320	0,808	0,103	0,514	0,039	0,810	0,100	0,525	0,035
330	0,835	0,081	0,556	0,034	0,855	0,080	0,561	0,044
340	0,825	0,080	0,539	0,035	0,851	0,081	0,567	0,050
350	0,822	0,080	0,532	0,035	0,856	0,079	0,550	0,042
360	0,821	0,078	0,526	0,034	0,845	0,078	0,540	0,038
370	0,817	0,065	0,505	0,031	0,820	0,077	0,535	0,035
380	0,814	0,065	0,498	0,033	0,815	0,068	0,525	0,050
390	0,800	0,068	0,496	0,033	0,805	0,065	0,523	0,040
400	0,795	0,067	0,496	0,032	0,802	0,065	0,521	0,035
410	0,792	0,065	0,494	0,032	0,795	0,064	0,521	0,032
420	0,778	0,066	0,483	0,033	0,795	0,068	0,523	0,035
430	0,761	0,064	0,473	0,031	0,770	0,059	0,510	0,034
440	0,748	0,060	0,450	0,037	0,750	0,057	0,480	0,033
450	0,739	0,058	0,456	0,031	0,748	0,055	0,482	0,033
460	0,729	0,055	0,451	0,030	0,735	0,060	0,480	0,032
470	0,723	0,053	0,447	0,029	0,725	0,050	0,470	0,028
480	0,713	0,051	0,454	0,025	0,712	0,052	0,465	0,024
490	0,703	0,049	0,449	0,024	0,710	0,052	0,452	0,027
500	0,694	0,048	0,432	0,027	0,701	0,049	0,450	0,029
510	0,672	0,052	0,427	0,027	0,686	0,051	0,447	0,028
520	0,664	0,051	0,423	0,026	0,680	0,045	0,442	0,028
530	0,661	0,046	0,418	0,026	0,678	0,044	0,438	0,028
540	0,644	0,043	0,409	0,024	0,650	0,044	0,432	0,025
550	0,632	0,044	0,405	0,024	0,640	0,045	0,430	0,026

Tableau 5.2. Effets de 3 cycles de pressurisation (montée en pression, PIM, mmHg)-dépressurisation (descente en pression, PIM, mmHg) consécutifs sur la capacité d'amortissement carotidien (PPb/PPa) dont les valeurs sont indiquées par $m \pm esm$ ($n=7$).

PIM	cycle 1		cycle 2				cycle 3					
	montée		descente		montée		descente		montée		descente	
	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
25	0,409	0,014	0,337	0,013	0,356	0,017	0,308	0,014	0,343	0,014	0,324	0,017
50	0,370	0,012	0,278	0,008	0,293	0,009	0,252	0,012	0,285	0,011	0,246	0,009
75	0,695	0,031	0,590	0,035	0,586	0,048	0,581	0,053	0,603	0,047	0,546	0,047
100	0,950	0,018	0,975	0,022	0,979	0,024	0,961	0,045	1,000	0,014	0,982	0,026
125	1,018	0,023	1,007	0,038	1,041	0,016	1,013	0,006	1,057	0,018	1,036	0,060
150	1,014	0,016	1,012	0,022	1,019	0,010	1,011	0,009	1,048	0,037	1,038	0,045

Tableau 5.3. Evolution au cours du temps de la fluorescence aux longueurs d'onde d'excitation 340, 360 et 380 nm (longueur d'onde d'émission 510 nm) pendant la période d'incorporation du fura-2 AM ($m \pm esm$, $n=7$).

<u>longueur d'onde</u>	<u>340 nm</u>		<u>360 nm</u>		<u>380 nm</u>		
	<u>temps</u> (min)	m	esm	m	esm	m	esm
0		1,640	0,196	1,800	0,105	2,100	0,084
15		2,586	0,102	3,060	0,147	3,220	0,116
30		3,660	0,258	4,240	0,325	4,200	0,259
45		4,800	0,446	5,500	0,503	5,180	0,397
60		6,020	0,664	6,640	0,661	6,020	0,512
75		7,000	0,770	7,700	0,770	6,820	0,613
90		7,850	0,826	8,317	0,790	7,200	0,686
105		8,850	1,027	9,133	0,951	7,783	0,916
120		9,150	1,094	9,250	0,959	7,900	0,922
135		9,217	1,105	9,300	0,967	8,017	0,923
150		9,267	1,160	9,267	0,958	7,917	0,924

Tableau 5.4. Evolution au cours du temps de la fluorescence aux longueurs d'onde d'excitation 340, 360 et 380 nm (longueur d'onde d'émission 510 nm) pendant la période de "lavage" du segment carotidien à la suite de la charge du fura-2 AM ($m \pm esm$, $n=7$).

<u>longueur d'onde</u>	<u>340 nm</u>		<u>360 nm</u>		<u>380 nm</u>		
	<u>temps</u> (min)	m	esm	m	esm	m	esm
5		7,667	0,899	8,067	1,101	6,567	0,985
10		7,433	0,869	7,667	1,066	6,250	0,936
15		7,233	0,844	7,467	1,048	6,083	0,902
20		7,050	0,837	7,233	1,013	5,900	0,872
25		6,817	0,819	6,767	0,846	5,717	0,849
30		6,680	0,820	6,680	0,870	5,600	0,830
35		6,630	0,810	6,630	0,860	5,600	0,830

Tableau 5.5. Indice de capacité d'amortissement artériel (PPb/PPa) avant et à la suite de 5 cycles rapides de pressurisation intraluminale ($m \pm esm$, $n=5$).

<u>cycles de pressurisation</u>	m	esm
valeur initiale	0,618	0,033
1er	0,427	0,019
2ème	0,375	0,017
3ème	0,357	0,019
4ème	0,349	0,020
5ème	0,347	0,019

Tableau 5.6. Reproductibilité de la capacité d'amortissement artériel (PPb/PPa) durant 3 cycles consécutifs de pressurisation intraluminale ($m \pm esm$, $n=5$).

PIM (mmHg)	1 ^{er} cycle		2 ^{ème} cycle		3 ^{ème} cycle	
	m	esm	m	esm	m	esm
25	0,351	0,019	0,361	0,023	0,343	0,008
50	0,330	0,009	0,333	0,015	0,319	0,014
75	0,578	0,044	0,536	0,047	0,589	0,046
100	1,010	0,035	0,958	0,046	0,999	0,025
125	1,044	0,028	1,030	0,020	0,994	0,022
150	1,020	0,002	1,057	0,021	1,046	0,016

Tableau 5.7. Stabilité de PPb/PPa ($m \pm esm$) durant chaque palier de pression PIM (mmHg) de 5 min chacun au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale ($n=10$).

PIM	25		50		75		100		125		150	
	temps	m	esm	esm								
(min)												
1	0,400	0,041	0,387	0,034	0,628	0,077	0,957	0,028	0,991	0,020	1,048	0,021
2	0,415	0,048	0,380	0,030	0,631	0,075	0,931	0,028	1,033	0,014	1,043	0,017
3	0,410	0,047	0,379	0,033	0,575	0,070	0,937	0,031	1,001	0,016	1,014	0,016
4	0,397	0,044	0,377	0,030	0,603	0,078	0,944	0,025	1,013	0,005	1,027	0,015
5	0,401	0,047	0,380	0,032	0,586	0,100	0,936	0,021	1,004	0,019	1,037	0,018

Tableau 5.8. Variations du diamètre externe et de la compliance artérielle correspondante, durant un cycle lent de pressurisation intraluminale ($m \pm esm$, $n=17$).

PIM (mmHg)	diamètre externe (μm)		compliance (nl/mmHg/mm)		
	m	esm	PIM (mmHg)	m	esm
25	947	3	37,5	12,1	0,8
50	1134	12	62,5	14,6	0,9
75	1330	19	87,5	6,7	0,8
100	1418	46	112,5	3,4	0,4
125	1449	49	137,5	1,1	0,1
150	1462	48			

Tableau 5.9. Evolution de la variation relative du diamètre externe ($\Delta D_e\%$) et de l'épaisseur de la média durant un cycle lent de pressurisation intraluminale ($m \pm esm$, $n=17$).

PIM (mmHg)	$\Delta D_e\%$		épaisseur de la média (μm)	
	m	esm	m	esm
25	52	3	192	15
50	52	3	145	10
75	34	3	117	13
100	32	3	110	6
125	20	3	107	6
150	15	1	106	6

Tableau 5.10. Relation entre le module élastique de pression (E_p , $\times 10^6$ dynes/cm²) et la pression intraluminale moyenne (PIM) au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale ($m \pm esm$, $n=17$).

<u>PIM</u> (mmHg)	<u>m</u>	<u>esm</u>
25	0,119938	0,013264
50	0,169440	0,015660
75	0,730804	0,124427
100	1,826680	0,242246
125	4,778962	0,852419
150	6,440128	0,582472

Tableau 5.11. Relation entre la tension pariétale moyenne (T_m , $\times 10^5$ dynes/cm²) et la variation relative de la tension pariétale à chaque pulsation de pression ($\Delta T\%$) avec la pression intraluminale moyenne (PIM) au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale ($m \pm esm$, $n=17$).

<u>PIM</u> (mmHg)	<u>T_m</u>		<u>$\Delta T\%$</u>	
	<u>m</u>	<u>esm</u>	<u>m</u>	<u>esm</u>
25	0,45	0,05	195,00	12,32
50	1,99	0,17	45,61	2,78
75	5,16	0,40	34,41	2,28
100	7,91	0,61	46,49	2,33
125	10,60	0,79	51,15	1,78
150	13,18	0,94	49,57	1,95

Tableau 5.12. Variations du volume intraluminal dans l'artère carotide et variations de la compliance correspondante durant un cycle lent de pressurisation intraluminaire ($m \pm esm$, $n=5$).

temps (sec)	volume (μ l/mm)		compliance (nl/mmHg/mm)		
	m	esm	PIM (mmHg)	m	esm
10	0,000	0,000	37,5	11,6	0,9
60	0,004	0,004	62,5	12,6	0,5
120	0,004	0,004	87,5	6,5	0,3
180	0,004	0,004	112,5	4,1	0,7
240	0,007	0,007	137,5	2,6	0,8
300	0,020	0,006			
310	0,309	0,017			
360	0,357	0,022			
420	0,382	0,023			
480	0,400	0,024			
540	0,420	0,029			
600	0,436	0,029			
610	0,720	0,041			
660	0,768	0,049			
720	0,794	0,050			
780	0,830	0,051			
840	0,858	0,051			
900	0,892	0,055			
910	1,067	0,064			
960	1,116	0,059			
1020	1,155	0,058			
1080	1,193	0,063			
1140	1,238	0,066			
1200	1,265	0,063			
1210	1,376	0,065			
1260	1,447	0,072			
1320	1,484	0,073			
1380	1,536	0,077			
1440	1,565	0,083			
1500	1,605	0,084			
1510	1,708	0,069			
1560	1,762	0,067			
1620	1,799	0,066			
1680	1,845	0,065			
1740	1,901	0,069			
1800	1,942	0,067			

Tableau 5.13. PPb/PPa au cours d'un cycle lent de pressurisation intraluminale avant (A, n=13) et après perfusion de la solution de charge contenant (B+, n=7) ou non (B-, n=6) le fura-2 AM ($m \pm \text{esm}$).

<u>PIM</u> (mmHg)	<u>A</u>		<u>B+</u>		<u>B-</u>	
	<u>m</u>	<u>esm</u>	<u>m</u>	<u>esm</u>	<u>m</u>	<u>esm</u>
25	0,409	0,015	0,410	0,030	0,408	0,011
50	0,393	0,034	0,363	0,032	0,389	0,051
75	0,578	0,061	0,555	0,034	0,570	0,091
100	0,948	0,022	0,936	0,030	0,900	0,016
125	1,005	0,013	1,029	0,051	1,004	0,019
150	1,042	0,010	1,025	0,011	1,029	0,031

Tableau 5.14. Effets d'un cycle lent de pressurisation intraluminale sur PPb/PPa et $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($m \pm \text{esm}$, n=7).

<u>PIM</u> (mmHg)	<u>PPb/PPa</u>		<u>$[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM)</u>	
	<u>m</u>	<u>esm</u>	<u>m</u>	<u>esm</u>
25	0,410	0,030	98,1	4,6
50	0,363	0,032	91,8	3,3
75	0,555	0,034	74,1	2,8
100	0,936	0,030	56,1	7,8
125	1,029	0,051	44,1	10,9
150	1,025	0,011	37,3	11,2

Tableau 5.15. Effets de 90 min de fixation au formol sur PPb/PPa du segment carotidien ($m \pm \text{esm}$, n=4).

<u>temps (min)</u>	<u>m</u>	<u>esm</u>
0	0,332	0,016
1	0,651	0,030
2	0,728	0,039
3	0,739	0,032
4	0,771	0,035
5	0,798	0,044
10	0,829	0,048
15	0,885	0,056
20	0,916	0,070
25	0,954	0,062
30	0,983	0,062
40	1,000	0,065
50	1,032	0,070
60	1,032	0,060
90	1,058	0,065

Tableau 5.16. Effets d'un cycle lent de pressurisation intraluminale sur PPb/PPa avant (Krebs, n=4) et après (Formol, n=4) fixation au formol du segment carotidien, et dans le cas où ce dernier est remplacé par un cathéter rigide (Cathéter, n=7) (m±esm).

<u>PIM</u> (mmHg)	<u>Krebs</u>		<u>Formol</u>		<u>Cathéter</u>	
	m	esm	m	esm	m	esm
25	0,376	0,006	1,062	0,050	1,076	0,023
50	0,297	0,041	1,014	0,031	1,080	0,026
75	0,500	0,049	1,064	0,053	1,045	0,015
100	0,900	0,058	1,031	0,028	1,046	0,018
125	0,992	0,021	1,027	0,035	1,071	0,029
150	1,039	0,015	1,043	0,029	1,032	0,019

CHAPITRE III :

Tableau 6.1. Effets de l'âge sur le coefficient de rétractation longitudinale (L/L₀) de l'artère carotide (m±esm).

	<u>2 mois (n=7)</u>		<u>12 mois (n=6)</u>		<u>24 mois (n=6)</u>	
	m	esm	m	esm	m	esm
L/L ₀	1,464	0,027	1,452	0,020	1,310	0,016

Tableau 6.2. Effets de l'âge sur l'indice d'amortissement artériel (PPb/PPa) au cours de 5 cycles rapides de pressurisation intraluminale (m±esm).

<u>cycles</u>	<u>2 mois (n=7)</u>		<u>12 mois (n=6)</u>		<u>24 mois (n=6)</u>	
	m	esm	m	esm	m	esm
initial	0,587	0,063	0,627	0,069	0,458	0,044
1 ^{er}	0,383	0,034	0,358	0,043	0,296	0,019
2 ^{ème}	0,352	0,035	0,323	0,037	0,272	0,019
3 ^{ème}	0,331	0,026	0,304	0,030	0,267	0,022
4 ^{ème}	0,327	0,033	0,267	0,023	0,239	0,018
5 ^{ème}	0,331	0,030	0,275	0,021	0,242	0,019

Tableau 6.3. Influences de l'âge sur les effets d'un cycle lent de pressurisation intraluminale sur l'indice d'amortissement artériel (PPb/PPa) ($m \pm esm$).

PIM (mmHg)	2 mois (n=7)		12 mois (n=6)		24 mois (n=6)	
	m	esm	m	esm	m	esm
25	0,309	0,012	0,277	0,014	0,241	0,014
50	0,306	0,011	0,294	0,014	0,318	0,012
75	0,569	0,032	0,545	0,036	0,666	0,028
100	1,057	0,022	1,015	0,026	1,048	0,028
125	1,107	0,009	1,110	0,009	1,094	0,022
150	1,093	0,009	1,107	0,008	1,087	0,015

Tableau 6.4. Effets de l'âge sur la fluorescence du segment carotidien non chargé (autofluorescence, x1000 cps) aux trois longueurs d'onde d'excitation (340, 360 et 380 nm) ($m \pm esm$).

longueur d'onde	2 mois (n=7)		12 mois (n=6)		24 mois (n=6)	
	m	esm	m	esm	m	esm
340 nm	141,387	8,130	201,195	11,308	254,773	11,770
360 nm	193,676	9,480	281,192	15,950	362,562	14,291
380 nm	176,156	10,668	250,618	16,276	319,668	16,396

Tableau 6.5. Effets de l'âge sur le rapport de charge du segment carotidien par le fura-2 correspondant à la fluorescence après charge du fura-2 sur l'autofluorescence avant la charge ($m \pm esm$).

longueur d'onde	2 mois (n=7)		12 mois (n=6)		24 mois (n=6)	
	m	esm	m	esm	m	esm
340 nm	3,839	0,338	3,311	0,165	3,030	0,180
360 nm	3,387	0,303	2,933	0,128	2,721	0,144
380 nm	2,577	0,226	2,250	0,086	2,116	0,099

Tableau 6.6. Effets de l'âge sur le pourcentage de l'autofluorescence dans les signaux de fluorescence obtenus après la charge du segment carotidien par le fura-2 ($m \pm esm$).

longueur d'onde	2 mois (n=7)		12 mois (n=6)		24 mois (n=6)	
	m	esm	m	esm	m	esm
340 nm	30,141	3,838	31,008	1,374	35,137	2,589
360 nm	33,819	4,021	34,800	1,329	38,831	2,823
380 nm	43,280	4,211	45,177	1,582	49,300	3,240

Tableau 6.7. Effets de l'âge sur les paramètres de fluorescence ($m \pm \text{esm}$).

	<u>2 mois (n=7)</u>		<u>12 mois (n=6)</u>		<u>24 mois (n=6)</u>	
	m	esm	m	esm	m	esm
R' _{max}	8,840	0,747	9,999	1,376	8,272	0,669
R' _{min}	0,788	0,035	0,903	0,083	0,964	0,057
R' _{max} /R' _{min}	11,628	1,144	11,842	1,696	9,326	1,122
β'	1,973	0,212	1,758	0,141	1,697	0,186
R'	1,688	0,049	1,805	0,110	1,759	0,094
[Ca ²⁺] _i /K _d	0,283	0,032	0,244	0,033	0,259	0,038

Tableau 6.8. Influences de l'âge sur les effets de la superfusion de noradrénaline (10 μM) sur l'indice d'amortissement artériel ($\Delta\text{PPb}/\text{PPa}\%$) et sur le Ca²⁺ cytoplasmique ($\Delta\text{R}'\%$ et $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i/\text{K}_d\%$) ($m \pm \text{esm}$).

	<u>2 mois (n=7)</u>		<u>12 mois (n=6)</u>		<u>24 mois (n=6)</u>	
	m	esm	m	esm	m	esm
$\Delta\text{PPb}/\text{PPa}\%$	4,179	2,129	41,393	9,354	57,008	17,795
$\Delta\text{R}'\%$	6,632	1,974	60,362	7,497	43,906	8,267
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i/\text{K}_d\%$	13,642	3,954	165,892	14,775	150,514	39,429

Tableau 6.9. Effets de l'ionomycine sur l'indice d'amortissement artériel ($\Delta\text{PPb}/\text{PPa}\%$) et sur le taux de Ca²⁺ cytoplasmique ($\Delta\text{R}'\%$) ($m \pm \text{esm}$).

	<u>2 mois (n=7)</u>		<u>12 mois (n=6)</u>		<u>24 mois (n=6)</u>	
	m	esm	m	esm	m	esm
$\Delta\text{PPb}/\text{PPa}\%$	107,318	8,583	113,542	17,293	88,178	14,666
$\Delta\text{R}'\%$	448,390	39,906	460,276	69,269	374,887	47,892

Tableau 6.10. Effets de l'âge sur l'indice d'amortissement artériel (PPb/PPa) en présence de calcium plus ionomycine (IM/Ca), d'EGTA plus ionomycine (IM/EGTA) ou de manganèse plus ionomycine (Mn) (m±esm).

solution	2 mois (n=7)		12 mois (n=6)		24 mois (n=6)	
	m	esm	m	esm	m	esm
Krebs	0,333	0,016	0,314	0,019	0,301	0,022
IM/Ca	0,667	0,027	0,650	0,048	0,570	0,048
IM/EGTA	0,412	0,029	0,335	0,017	0,306	0,018
Mn	0,372	0,021	0,297	0,015	0,289	0,018

Tableau 6.11. Effets de l'âge sur les concentrations de calcium tissulaire total (µmol/g tissu sec) au niveau de trois artères et du myocarde (m±esm).

	2 mois (n=7)		12 mois (n=6)		24 mois (n=6)	
	m	esm	m	esm	m	esm
Artère thoracique	21,797	1,143	24,062	1,381	27,260	0,604
Artère carotide	25,537	2,554	26,440	2,689	38,675	4,968
Myocarde	7,349	0,668	7,513	0,629	7,015	0,517
Artère caudale	20,820	1,700	18,680	1,100	20,400	1,150

Tableau 6.12. Effets de l'âge sur le poids ventriculaire total (VG+VD, g), gauche (VG, g) et droit (VD, g). et sur ces mêmes poids ventriculaires rapportés au poids corporel (PC, kg) (m±esm).

	2 mois (n=7)		12 mois (n=6)		24 mois (n=6)	
	m	esm	m	esm	m	esm
VG	0,692	0,018	0,867	0,023	0,934	0,020
VD	0,195	0,008	0,220	0,012	0,227	0,007
VG+VD	0,888	0,021	1,088	0,033	1,161	0,020
VG/PC	1,625	0,033	1,498	0,041	1,480	0,039
VD/PC	0,462	0,022	0,376	0,020	0,364	0,012
(VG+VD)/PC	2,009	0,046	1,856	0,057	1,862	0,041

CHAPITRE IV :

Tableau 7.1. Evolution de la pression artérielle systolique (mmHg) au cours de l'étude (m ± esm).

groupes	<u>VDN/IECA</u>		<u>VDN/PLACEBO</u>		<u>TEM/IECA</u>		<u>TEM/PLACEBO</u>	
	(n=10)		(n=12)		(n=12)		(n=11)	
Jours	M	esm	M	esm	M	esm	M	esm
0	125	2	122	2	122	3	122	2
28	125	3	152	5	122	2	132	2
56	120	3	162	4	116	3	147	3
81	119	1	164	5	120	3	145	4
154	116	3	151	3	112	4	139	2
224	136	2	162	5	123	2	150	2
308	134	3	165	6	126	6	149	3
400	137	5	164	5	126	5	147	3

Tableau 7.2. Evolution du rythme cardiaque (bpm) au cours de l'étude (m ± esm).

groupes	<u>VDN/IECA</u>		<u>VDN/PLACEBO</u>		<u>TEM/IECA</u>		<u>TEM/PLACEBO</u>	
	(n=10)		(n=12)		(n=12)		(n=11)	
Jours	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
0	413	8	431	8	433	8	421	9
28	368	10	387	8	426	10	379	9
56	381	10	380	11	393	7	373	8
81	402	11	361	8	399	7	361	8
154	436	9	392	9	404	12	387	8
224	410	15	380	10	374	7	382	9
308	389	11	400	10	369	7	387	8
400	403	10	408	12	390	8	402	10

Tableau 7.3. Evolution de la consommation de nourriture (g/kg/j) au cours de l'étude (m ± esm).

groupes	<u>VDN/IECA</u>		<u>VDN/PLACEBO</u>		<u>TEM/IECA</u>		<u>TEM/PLACEBO</u>	
	(n=10)		(n=12)		(n=12)		(n=11)	
Jours	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
0	94,1	0,8	102,4	1,0	100,6	0,9	95,7	1,2
4	21,3	0,5	39,0	2,5	90,7	1,0	89,9	1,1
11	69,6	1,8	73,9	2,8	82,1	0,9	82,9	1,1
18	91,7	2,1	79,4	3,4	78,1	1,3	75,1	1,1
28	76,7	1,9	79,7	1,6	72,1	1,1	68,5	1,4
56	57,9	1,2	57,0	1,2	56,6	1,0	55,2	1,1
81	56,7	1,4	54,5	0,8	58,9	0,8	54,3	1,2
109	50,3	1,7	48,5	0,9	50,5	0,8	48,3	1,1
154	46,6	1,4	45,2	0,8	48,0	0,8	45,2	1,0
196	47,8	1,5	40,7	0,9	43,2	0,9	41,0	0,6
224	41,9	1,3	40,3	0,8	41,0	1,8	42,8	3,5
258	44,0	1,5	41,2	0,9	42,8	1,1	40,1	0,8
308	37,0	1,2	36,9	0,7	37,0	1,0	37,4	1,0
352	39,0	1,2	35,1	0,7	37,9	1,0	36,0	1,0
400	41,4	0,9	40,9	1,0	41,4	1,2	37,5	1,5

Tableau 7.4. Evolution de la consommation de boisson (ml/kg/j) au cours de l'étude ($m \pm esm$).

groupes	<u>VDN/IECA</u>		<u>VDN/PLACEBO</u>		<u>TEM/IECA</u>		<u>TEM/PLACEBO</u>	
	(n=10)		(n=12)		(n=12)		(n=11)	
Jours	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
0	129,8	5,9	134,2	1,2	109,4	2,8	125,6	5,2
4	104,4	1,7	129,4	2,6	106,4	2,5	105,1	3,2
11	101,9	2,7	105,9	4,1	107,1	2,5	91,5	2,7
18	109,3	3,0	109,5	3,7	101,0	2,9	96,5	4,1
28	81,5	1,7	99,0	3,4	91,3	2,6	93,4	5,2
56	71,1	2,4	68,6	2,8	69,2	1,2	70,2	2,5
81	70,2	2,7	58,3	2,0	64,8	1,0	57,9	1,3
109	62,9	2,6	56,7	3,2	55,0	0,8	57,1	1,9
154	62,1	2,3	50,1	1,2	58,7	1,0	55,4	1,7
196	56,1	1,6	48,9	2,5	55,3	2,5	46,1	2,2
224	46,9	1,5	44,7	1,7	52,1	1,6	48,3	1,5
258	44,9	1,4	43,7	1,9	45,6	1,3	47,9	1,0
308	38,0	1,2	42,7	0,9	35,2	1,1	43,0	0,9
352	37,3	1,4	38,3	0,9	32,8	0,9	37,6	0,7
400	38,8	0,9	41,5	1,6	34,8	1,0	35,1	0,8

Tableau 7.5. Evolution du poids corporel (g) au cours de l'étude ($m \pm esm$).

groupes	<u>VDN/IECA</u>		<u>VDN/PLACEBO</u>		<u>TEM/IECA</u>		<u>TEM/PLACEBO</u>	
	(n=10)		(n=12)		(n=12)		(n=11)	
Jours	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
0	223	2	222	1	227	2	224	2
4	187	3	189	2	254	3	251	2
11	202	5	207	7	281	3	290	4
18	258	6	263	8	308	5	327	5
28	314	6	322	6	341	5	359	6
56	382	8	375	10	399	6	428	9
81	408	11	433	7	426	6	463	11
109	442	16	467	8	446	6	500	12
154	454	14	510	9	471	8	533	13
196	485	15	543	11	500	10	575	9
224	506	16	561	11	521	12	584	13
258	528	18	585	11	541	14	600	12
308	559	19	612	12	572	15	631	12
352	582	20	630	13	599	16	654	14
400	575	15	620	14	614	17	663	15

Tableau 7.6. Effets de 4 cycles rapides de pressurisation intraluminale sur l'indice d'amortissement artériel (PPb/PPa) ($m \pm esm$).

groupes	<u>VDN/IECA</u>		<u>VDN/PLACEBO</u>		<u>TEM/IECA</u>		<u>TEM/PLACEBO</u>	
	(n=10)		(n=12)		(n=12)		(n=11)	
<u>cycles</u>	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
valeur initiale	1,064	0,099	0,977	0,073	0,500	0,065	0,592	0,052
1 ^{er}	1,046	0,095	0,940	0,082	0,362	0,045	0,410	0,048
2 ^{ème}	1,048	0,098	0,937	0,085	0,327	0,036	0,389	0,048
3 ^{ème}	1,054	0,093	0,927	0,084	0,307	0,032	0,375	0,045
4 ^{ème}	1,049	0,093	0,922	0,083	0,294	0,029	0,348	0,045

Tableau 7.7. Effets d'un cycle lent de pressurisation intraluminale sur l'indice d'amortissement artériel (PPb/PPa) ($m \pm esm$).

groupes	<u>VDN/PLACEBO</u>		<u>TEM/PLACEBO</u>		<u>VDN/IECA</u>		<u>TEM/IECA</u>	
	(n=12)		(n=11)		(n=10)		(n=12)	
<u>PIM</u>	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
25	0,923	0,077	0,331	0,026	1,048	0,089	0,296	0,034
50	0,972	0,063	0,348	0,036	0,973	0,048	0,361	0,058
75	1,038	0,021	0,654	0,050	0,971	0,038	0,858	0,056
100	1,045	0,025	0,994	0,046	0,961	0,025	1,008	0,015
125	1,032	0,023	1,040	0,025	0,972	0,019	1,026	0,022
150	1,028	0,018	1,056	0,018	0,977	0,020	1,025	0,023

Tableau 7.8. Intensités de fluorescence de l'artère carotide non chargée avec le fura-2 (autofluorescence, $\times 10^3$ cps) à 340, 360, 380 nm ($m \pm esm$).

groupes	<u>VDN/PLACEBO</u>		<u>VDN/IECA</u>		<u>TEM/PLACEBO</u>		<u>TEM/IECA</u>	
	(n=12)		(n=10)		(n=11)		(n=12)	
<u>longueur d'onde</u>	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
340 nm	256,093	18,982	215,889	19,724	191,671	22,648	189,945	22,847
360 nm	354,220	23,833	312,393	24,514	279,456	28,374	281,865	27,352
380 nm	379,250	28,161	332,119	27,962	299,608	31,309	308,882	27,241

Tableau 7.9. Coefficient de charge (fluorescence/autofluorescence) du fura-2 ($m \pm esm$).

groupes	VDN/PLACEBO		VDN/IECA		TEM/PLACEBO		TEM/IECA	
	(n=12)		(n=10)		(n=11)		(n=12)	
longueur d'onde	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
340 nm	2,075	0,195	2,187	0,137	2,662	0,298	2,656	0,274
360 nm	1,840	0,180	1,852	0,115	2,166	0,204	2,391	0,221
380 nm	1,446	0,116	1,477	0,098	1,593	0,090	1,854	0,141

Tableau 7.10. Paramètres de fluorescence lors de la calibration de fluorescence. R'_{max} = fluorescence maximale et R'_{min} = fluorescence minimale. Voir matériel et méthodes pour les autres paramètres dont R' et $[Ca^{2+}]_i/K_d$ correspondent aux valeurs basales ($m \pm esm$).

groupes	VDN/PLACEBO		VDN/IECA		TEM/PLACEBO		TEM/IECA	
	(n=12)		(n=10)		(n=11)		(n=12)	
	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
R'_{max}	3,410	0,624	3,909	0,535	9,601	1,620	10,217	1,223
R'_{min}	1,233	0,151	1,570	0,267	0,994	0,124	1,136	0,179
R'_{max}/R'_{min}	3,080	0,850	2,690	0,320	11,290	2,380	10,990	1,720
β'	0,624	0,100	0,545	0,057	1,936	0,520	1,909	0,277
R'	1,586	0,152	1,839	0,251	2,089	0,362	2,089	0,321
$[Ca^{2+}]_i/K_d$	0,151	0,035	0,085	0,015	0,271	0,080	0,258	0,079

Tableau 7.11. Effets de la stimulation par la noradrénaline (10 μ M) sur l'indice d'amortissement artériel ($\Delta PPb/PPa\%$) et sur le niveau de calcium cytoplasmique ($\Delta R'\%$ et $\Delta [Ca^{2+}]_i/K_d\%$) ($m \pm esm$).

groupes :	VDN/PLACEBO		VDN/IECA		TEM/PLACEBO		TEM/IECA	
	(n=12)		(n=10)		(n=11)		(n=12)	
	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
$\Delta PPb/PPa\%$	1,52	1,55	1,18	0,80	42,84	4,71	38,59	4,82
$\Delta R'\%$	-0,76	1,00	-1,34	1,81	32,24	3,75	31,49	3,57
$\Delta [Ca^{2+}]_i/K_d\%$	-4,96	7,58	-0,25	13,48	91,03	12,89	75,70	19,72

Tableau 7.12. Effets de l'ionomycine lors de la calibration de la fluorescence sur l'indice d'amortissement artériel ($\Delta PPb/PPa\%$) et sur le niveau de calcium cytoplasmique ($\Delta R'\%$) ($m \pm esm$).

groupes :	<u>VDN/PLACEBO</u>		<u>VDN/IECA</u>		<u>TEM/PLACEBO</u>		<u>TEM/IECA</u>	
	(n=12)		(n=10)		(n=11)		(n=12)	
	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
$\Delta PPb/PPa\%$	3,08	1,70	-0,52	0,75	37,57	4,12	47,97	7,30
$\Delta R'\%$	145,94	47,14	131,68	25,13	403,62	48,11	386,20	46,93

Tableau 7.13. Effets de l'ionomycine (IM/+Ca), de l'EGTA (IM/-Ca) et du Mn sur la capacité d'amortissement artériel (PPb/PPa) ($m \pm esm$).

groupes :	<u>VDN/IECA</u>		<u>VDN/PLACEBO</u>		<u>TEM/IECA</u>		<u>TEM/PLACEBO</u>	
	(n=10)		(n=12)		(n=12)		(n=11)	
	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
basal	1,106	0,074	0,944	0,084	0,299	0,029	0,352	0,034
IM/+Ca	1,102	0,076	1,033	0,050	0,455	0,069	0,500	0,082
IM/-Ca	1,042	0,073	0,905	0,072	0,276	0,024	0,324	0,034
Mn	0,995	0,076	0,841	0,073	0,255	0,020	0,290	0,026

Tableau 7.14. Masse ventriculaire totale (VG+VD,g), gauche (VG, g) et droite (VD, g) ($m \pm esm$).

groupes :	<u>VDN/PLACEBO</u>		<u>VDN/IECA</u>		<u>TEM/PLACEBO</u>		<u>TEM/IECA</u>	
	(n=12)		(n=10)		(n=11)		(n=12)	
	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
VG+VD	1,483	0,035	1,297	0,044	1,409	0,056	1,202	0,043
VG	1,166	0,037	0,975	0,031	1,100	0,042	0,907	0,033
VD	0,308	0,015	0,323	0,021	0,309	0,018	0,296	0,015

Tableau 7.15. Poids des ventricules gauche (VG, g), droit (VD, g) et des deux ventricules (VG+VD, g) rapportés au poids corporel (PC, kg) ($m \pm esm$).

groupes :	<u>VDN/PLACEBO</u>		<u>VDN/IECA</u>		<u>TEM/PLACEBO</u>		<u>TEM/IECA</u>	
	(n=12)		(n=10)		(n=11)		(n=12)	
	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
(VG+VD)/PC	2,367	0,074	2,228	0,079	2,130	0,074	1,978	0,049
VG/PC	1,860	0,069	1,672	0,050	1,661	0,048	1,492	0,034
VD/PC	0,507	0,024	0,556	0,039	0,469	0,029	0,487	0,022

Tableau 7.16. Concentrations de calcium tissulaire total ($m \pm esm$; $\mu\text{mol/g}$ poids organe sec). AA=artère abdominale, AT=artère thoracique, ACo=artère carotide, AR=artère rénale, AC=artère caudale, M=myocarde, R=rein.

groupes :	<u>VDN/PLACEBO</u>		<u>VDN/IECA</u>		<u>TEM/PLACEBO</u>		<u>TEM/IECA</u>	
	(n=12)		(n=10)		(n=11)		(n=12)	
	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
AA	418,990	52,174	402,839	57,987	24,503	2,001	24,317	1,876
AT	414,460	72,650	398,971	82,187	28,745	2,180	25,009	1,409
ACo	507,087	51,698	537,023	67,472	75,445	6,696	65,263	7,610
AR	160,220	4,795	143,683	7,201	46,322	6,262	53,885	9,009
AC	71,365	5,766	70,884	6,141	38,861	3,499	42,003	3,018
M	20,250	2,234	25,203	1,798	8,615	1,106	9,241	0,628
R	33,943	3,314	39,318	4,659	10,819	0,844	9,522	0,585

Tableau 7.17. Concentration des protéines tissulaires solubles dans l'acide ($m \pm esm$; mg/g poids organe frais). AA=artère abdominale, AT=artère thoracique, ACo=artère carotide, AC=artère caudale, M=myocarde, R=rein.

groupes :	<u>VDN/PLACEBO</u>		<u>VDN/IECA</u>		<u>TEM/PLACEBO</u>		<u>TEM/IECA</u>	
	(n=12)		(n=10)		(n=11)		(n=12)	
	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
AA	47,61	6,03	56,64	8,38	44,18	6,96	52,90	7,37
AT	45,81	9,88	36,67	10,37	43,04	7,00	48,87	7,82
ACo	31,89	6,75	42,20	5,60	48,38	6,26	41,83	8,48
AC	27,43	4,13	26,97	5,52	31,52	4,68	22,77	3,58
M	39,29	6,92	31,41	2,56	33,01	2,40	36,35	3,96
R	53,14	10,72	43,34	8,90	36,97	3,97	35,74	3,14

Tableau 7.18. Activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I ($m \pm esm$; mmol/ml/min).

<u>VDN/PLACEBO</u>		<u>VDN/IECA</u>		<u>TEM/PLACEBO</u>		<u>TEM/IECA</u>	
(n=12)		(n=10)		(n=11)		(n=12)	
m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
34,00	4,10	2,77	0,62	36,14	3,86	3,63	0,42

Tableau 7.19. Concentrations plasmatiques de noradrénaline et d'adrénaline ($m \pm esm$; pg/ml).

groupes :	<u>VDN/PLACEBO</u>		<u>VDN/IECA</u>		<u>TEM/PLACEBO</u>		<u>TEM/IECA</u>	
	(n=12)		(n=10)		(n=11)		(n=12)	
	m	esm	m	esm	m	esm	m	esm
noradrénaline	1025,3	231,1	866,6	184,2	1091,9	168,2	1025,0	189,0
adrénaline	925,0	137,0	752,3	149,0	910,0	183,0	823,0	168,0

Marie-Aude Devynck

RAPPORT

sur la Thèse de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1
présentée par Monsieur Stéphane Boutinet

Monsieur Stéphane Boutinet a développé dans ses travaux de thèse une approche mécanistique de la compliance artérielle par évaluations conjointes 1) de la concentration cytosolique d'ions calcium, principal facteur de contrôle du tonus du muscle lisse vasculaire, 2) des dépôts calciques sur les fibres élastiques de la paroi vasculaire et 3) de la capacité d'un fragment aortique à amortir un signal de pression pulsée. Il s'agit là d'une étude originale, mettant en jeu des connaissances complémentaires, rarement maîtrisées simultanément. Les implications physiologiques et pathologiques de cette étude sont importantes. Il s'agit en effet de mieux comprendre les modifications cardio-vasculaires liées au vieillissement ou à des pathologies telles que l'hypertension ou l'athérosclérose.

La démarche expérimentale est prudente et bien documentée. Le modèle utilisé est un segment de l'artère carotide de rat, déendothélialisé mécaniquement, soumis *in vitro* à une pression pulsée, et suivi en terme de concentration calcique par incorporation préalable d'un indicateur fluorescent. Il s'agit donc d'une extension des modèles précédemment mis au point sur l'artère caudale dans le laboratoire du Professeur J. Atkinson. La compliance est appréciée par la capacité d'amortissement d'un signal de pression pulsée.

Ni l'augmentation, statique ou dynamique, de la pression intraluminale, ni l'inactivation métabolique du segment artériel par inhibition mitochondriale n'ont induit de variations apparentes de la concentration cytosolique d'ions Ca^{2+} , alors que le système répond ainsi que la théorie le prévoit au traitement par un ionophore calcique, à la stimulation par la noradrénaline et à l'addition d'un chélateur calcique.

Les rôles respectifs de l'état contractile des cellules musculaires lisses et de l'altération des propriétés élastiques dans la baisse de compliànce liée au vieillissement ont été examinées en comparant les propriétés mécaniques de fragments carotidiens, la concentration apparente d'ions calciques dans le cytosol des cellules vasculaires et le calcium tissulaire total chez des rats de 2, 12 et 24 mois. L'influence de la calcification artérielle a également été recherchée dans un modèle d'hypercalcinoe vasculaire accélérée produite par administration de vitamine D₃ et de nicotine, traité ou non chroniquement par un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Les résultats obtenus indiquent un rôle majeur du dépôt calcique dans la matrice extracellulaire et un rôle mineur de la concentration cytosolique vasculaire d'ions calcium dans la rigidification artérielle observée lors du vieillissement ou celle plus marquée observée dans ce modèle d'hypercalcinoe. L'approche pharmacologique a révélé une absence d'effets nets sur les paramètres morphologiques, mécaniques et calciques de l'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine étudié.

Cette étude effectuée par Stéphane Boutinet porte sur un problème particulièrement complexe, d'abord expérimental difficile mais d'importance fondamentale. Les résultats, attendus ou inattendus, sont bien discutés, avec prudence, et dans une optique élargie de physiopathologie vasculaire.

Cette thèse intéressante mérite d'être soutenue.

à Paris, le 15 février 1995,



Marie-Aude Devynck

Directeur de Recherche

Directeur de l'URA CNRS 1482

Rapport de pré-soutenance de la thèse de doctorat de l'Université Henri Poincaré - Nancy I de Monsieur Stéphane Boutinet

Le manuscrit de Monsieur Boutinet décrit les résultats qu'il a obtenu dans l'étude du rôle du calcium dans la compliance de l'artère carotide de rat, grâce au développement d'une approche technologique originale.

Monsieur Boutinet a mis au point un système de mesure simultanée de la compliance artérielle et de la concentration cytoplasmique du calcium. La combinaison de ces deux approches est nouvelle et permet de mesurer deux paramètres différents, caractéristiques de l'état fonctionnel de l'artère, dans des conditions rigoureusement identiques. L'intérêt de cette approche bi-directionnelle est encore plus évident dans l'étude de l'influence de facteurs physio-pathologiques tels que l'hypertension artérielle ou le vieillissement, dont on sait qu'ils modifient la réactivité vasculaire.

Les propriétés élastiques de la paroi artérielle et les méthodes permettant de les étudier sont amplement décrites, avec références à de nombreuses données bibliographiques bien actualisées, dans un chapitre dense que j'aurais peut-être aimé mieux organisé. Les mécanismes de contrôle du taux de calcium cytosolique sont abordés de manière plus succincte.

Les méthodologies que Monsieur Boutinet a appliquées sont décrites avec beaucoup de sens critique et avec le souci constant d'établir une comparaison avec les résultats obtenus par d'autres techniques. Les études préliminaires qui ont été réalisées par Monsieur Boutinet montrent le soin qui a été apporté à la vérification des différents paramètres expérimentaux afin de donner aux résultats toute leur valeur.

Monsieur Boutinet a appliqué les techniques qu'il a mises au point à l'étude du rôle du calcium dans les effets de l'âge sur la capacité d'amortissement artériel d'un signal de

pression pulsée. Avec un nombre relativement restreint d'expériences, ce qui est la preuve de la validité de son modèle, il a pu décrire les modifications qui surviennent au cours du vieillissement à la fois dans les propriétés élastiques de l'artère carotide de rat et dans le taux de calcium cytoplasmique. Il a montré que, aussi bien au cours du vieillissement que dans un modèle de vieillissement vasculaire induit par un traitement par la vitamine D₃ et la nicotine, la capacité d'amortissement d'un signal de pression pulsée est diminuée, alors que la concentration cytosolique du calcium n'est pas affectée. Il semble donc que le calcium cytosolique ne joue pas un rôle régulateur important dans les modifications de la capacité d'amortissement artériel qui surviennent lors du vieillissement. Si cette conclusion s'applique à une artère en condition de repos, le travail de Monsieur Boutinet montre qu'elle ne peut être étendue à des situations dans lesquelles les cellules musculaires sont stimulées soit par un agoniste soit par le calcium. Il faut cependant être conscient que le risque majeur d'une approche bi-directionnelle du type de celle qui a été développée dans ce travail est la tentation d'établir l'existence de relations causales sur la base de relations temporelles. L'introduction de la mesure d'autres paramètres tels que le calcium total et les études morphométriques a permis d'éviter cet écueil.

J'aimerais enfin souligner combien j'ai trouvé intéressante et agréable la lecture du manuscrit soumis par Monsieur Boutinet. Je me permettrais cependant de suggérer qu'il soit soumis à une re-lecture critique dans le but d'en améliorer la forme, qui, loin d'être de mauvaise qualité, pourrait trouver tout bénéfice dans certaines corrections grammaticales et stylistiques.

En conclusion, j'estime que le travail soumis par Monsieur Boutinet est d'une très bonne qualité scientifique.

Professeur Bernard Waeber, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Division Hypertension, 1011 Lausanne, Suisse.

Rapport de la thèse intitulée "Rôle du calcium intracellulaire dans la compliance de l'artère carotide de rat; effets d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I", présentée par Monsieur Stéphane Boutinet.

J'ai lu avec beaucoup d'intérêt et de plaisir le mémoire de Mr Boutinet doctorant. Un travail considérable et d'excellente qualité a été accompli. J'ai vraiment apprécié la présentation claire des éléments connus jusqu'à ce jour, la description précise des méthodes et des résultats ainsi que la discussion bien documentée et enrichissante des données. Les illustrations sont nombreuses, facilitant grandement la lecture et la compréhension de la thèse.

Le chapitre I est très utile. Il décrit de manière simple les connaissances actuelles sur les composants de la paroi artérielle, les mécanismes impliqués dans la régulation du tonus vasculaire ainsi que les moyens à disposition pour étudier les propriétés visco-élastiques des artères. Ce chapitre est très bien équilibré. Il donne suffisamment de détails pour que le non-spécialiste puisse comprendre. Les schémas explicatifs sont par ailleurs judicieusement choisis et la bibliographie est à jour.

Avec le chapitre II commence la description du travail du doctorant. La mise au point des techniques utilisées est complète. L'approche est originale car elle associe la mesure *in vitro* de la compliance de la carotide de rat à pression pulsée à celle du calcium intracellulaire. A ma connaissance, de telles études n'ont pas été réalisées au préalable. La technique de mesure de la capacité d'amortissement carotidien du signal de pression pulsée est bien validée. Quant à la méthode de mesure du calcium intracellulaire dans un segment artériel, elle a été validée dans un papier publié dans un journal réputé, Mr Boutinet figurant comme co-auteur (*Am J Physiol* 265: C1689-C1702, 1993). Quelques observations méritent d'être relevées. Notamment le calcium libre à l'intérieur de la cellule musculaire lisse de la carotide ne semble pas être influencé par la pression pulsée, quel que soit le niveau de la pression intraluminaire. Par ailleurs, la stimulation alpha-adrénergique par la noradrénaline augmente comme attendu le calcium libre intracellulaire et diminue la capacité d'amortissement artériel sans

altération concomitante de la pression artérielle moyenne. Je n'ai aucun doute que ces résultats vont donner lieu à une publication de valeur.

Le chapitre III a traité à l'étude du couplage entre le calcium libre intracellulaire et la capacité d'amortissement artériel au cours du vieillissement chez le rat. De nombreux paramètres ont en outre été évalués pour caractériser les changements morphologiques de la paroi artérielle. Il y a vraiment peu d'études qui fournissent autant d'informations en même temps. Il est intéressant de voir que les modifications liées à l'âge sont relativement modérées, du moins en ce qui concerne les propriétés visco-élastiques de la paroi artérielle et des variations du calcium cytosolique. Là encore, les observations vont certainement être publiées dans un journal scientifique international.

Le chapitre IV examine l'effet d'une intervention pharmacologique, à savoir le blocage du système rénine-angiotensine par le périndopril, dans un modèle de surcharge calcique vasculaire. La capacité d'amortissement artériel est diminuée dans ce modèle, l'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine n'ayant pas d'effet préventif à cet égard, ni d'ailleurs sur les paramètres morphologiques et fonctionnels de l'artère carotide. Cette étude est à ma connaissance unique et représente la continuation logique de la description première du modèle par le Prof. J. Atkinson (*Am J Physiol* 266: H540-H547, 1994).

En résumé, j'ai été impressionné par l'étendue des connaissances et du travail du doctorant ainsi que par l'originalité de la démarche scientifique. Mr Boutinet a pris la peine de valider les techniques compliquées qu'il a choisi d'utiliser pour répondre à ses questions.

Je considère ce travail de thèse remarquable et suis heureux d'apporter mon soutien inconditionnel à la candidature de Mr Boutinet comme Docteur de l'Université de Nancy I.

Dr Alberto AVOLIO
Graduate School of Biomedical Engineering
The University of New South Wales
Sydney 2052, Australie

Thèse de Monsieur Stéphane BOUTINET : "Rôle du calcium intracellulaire dans la compliance de l'artère carotide de rat ; effets d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I".

Cette thèse présente une étude sur la relation entre le calcium et les propriétés mécaniques de base de la paroi artérielle. Elle a été menée *in vitro* sur l'artère carotide de rat. La présentation de cette thèse est claire avec un excellent rappel actualisé de la littérature concernant l'hémodynamique artériel et la biomécanique de la paroi artérielle. La thèse décrit un travail original avec des conclusions spécifiques reliées aux effets du calcium intracellulaire et extracellulaire sur les modifications des propriétés mécaniques de la paroi artérielle. Les principales conclusions sont que le calcium intracellulaire influence la capacité de l'artère carotide de rat à amortir un signal de pression oscillatoire et que la perte de l'élasticité (apparaissant avec l'âge par exemple) pourrait être due partiellement à l'accumulation de dépôts extracellulaires de calcium sur les fibres élastiques. Les effets bénéfiques d'un traitement par un inhibiteur de l'enzyme de conversion, tels qu'une réduction de la pression artérielle systolique et de l'hypertrophie cardiaque, ne semblent pas être reliés à des modifications significatives de la paroi artérielle dans cette préparation.

La partie essentielle de ce travail concerne la technique expérimentale qui permet des mesures simultanées du calcium intracellulaire et de la pression à partir de laquelle sont dérivés les indices de compliance et d'amortissement artériel. Les techniques de mesure du calcium intracellulaire ont été précédemment décrites dans plusieurs publications provenant du même laboratoire et ont été largement évaluées. Le candidat discute de façon détaillée aussi bien la méthodologie que les résultats obtenus. Cependant, le résultat décrit sur la Figure 2.19B pourrait amener à une explication plus étendue car celui-ci semble remettre en cause certaines conclusions tirées dans la thèse.

De façon général, cette étude a montré des résultats significatifs et importants qui enrichissent nos connaissances sur la contribution du calcium dans les propriétés fonctionnelles actives et passives de la paroi artérielle.

Assessment

Theses: *Role of intracellular calcium in the compliance of the rat carotid artery; effects of an angiotensin converting enzyme inhibitor.*

Stéphane Boutinet

General comments

This thesis presents an investigation on the relationship between calcium and basic mechanical properties of the arterial wall as conducted in an *in-vitro* experimental preparation of the rat carotid artery. The presentation is clear and thorough with an excellent overview of the relevant literature and related fields encompassing arterial haemodynamics and elementary wall biomechanics. The thesis reports original work with a number of specific conclusions related to the effect of both intracellular and extracellular calcium on altered mechanical properties of the arterial wall. Essentially the main conclusions appear to be that intracellular calcium influences the capacity of the rat carotid artery to dampen an oscillatory pressure signal and that the loss of elasticity (as occurs in ageing) could be partly due to accumulation of extracellular calcium deposits on the elastic fibres. The beneficial effects of the ACE inhibitor treatment, such as reduction of both systolic pressure and cardiac hypertrophy, do not seem to be related to significant wall alteration in this preparation.

The essential part of the work revolves around the preparation which allows concurrent measurements of wall calcium content and intraluminal pressure from which are derived indices of compliance and damping. The techniques of calcium measurement have been previously described in a number of publications from the same laboratory and appear to have been extensively evaluated. Although the candidate offers extensive discussion on the methodology and results obtained, a particular result (see below) might require further explanation as it puts into question some of the basic elements of the whole investigation. Overall, however, the investigation has produced significant and important results which enhance the knowledge of the important contribution of calcium to both active and passive functional properties of the arterial wall.

Specific comments

1. It is not immediately clear what is the frequency of both "fast" and "slow" oscillations as described on pages 100 and 101. For example there is no time information for Figs 2.11 & 4.9.
2. The main problem in accepting the overall results of the investigation lies in trying to explain the results shown in Fig 2.19B. The decrease in $[Ca^{2+}]_i$ with increasing intraluminal pressure and decrease in damping capacity is difficult to understand, given the reported technical sophistication with which the measurements are conducted. This unusual result is indeed acknowledged and an attempt is made on page 118 to highlight this. However, it is not sufficient to mention the result without a satisfactory explanation. If the technique is adequate there must be some reason related to the biophysics of the smooth muscle cell. If this is so, for example there is no evidence of a myogenic response of the cell, then how does this affect the other results obtained with the same preparation. Since the response to noradrenaline stimulation

indicates a response which is consistent with the known effect of intracellular calcium and muscle contraction, that is, contraction is associated with an *increase* in $[Ca^{2+}]_i$ and decreased damping capacity, it might be worthwhile to consider possible artefacts in the measurement of intracellular calcium. Indeed these are addressed in general terms when describing the technique, but in this specific case the following issues might be explored to obtain a reasonable explanation for the result:

(a) Motion artefacts.

It appears that this issue was addressed in some detail in a previous publication from the same laboratory (Capeville-Atkinson et al, 1993). However, this study dealt with *longitudinal* movement and showed no effect on calcium concentration as measured with the fura-2 fluorescent probe. In the preparation described in the thesis the motion is circumferential. How, then, are the calcium concentrations affected when calculated from fluorescent measurements when there is a change in wall thickness and when the beam traverses the wall twice (at right angles). Although it is mentioned (page 84) that the beam width of 3 mm is sufficient to accommodate maximal diameters of 1.5 mm obtained at pressures greater than 100 mm Hg, it is not clear how substantial changes in cross-sectional area and wall dimensions affect measurements.

(b) Low calcium concentrations.

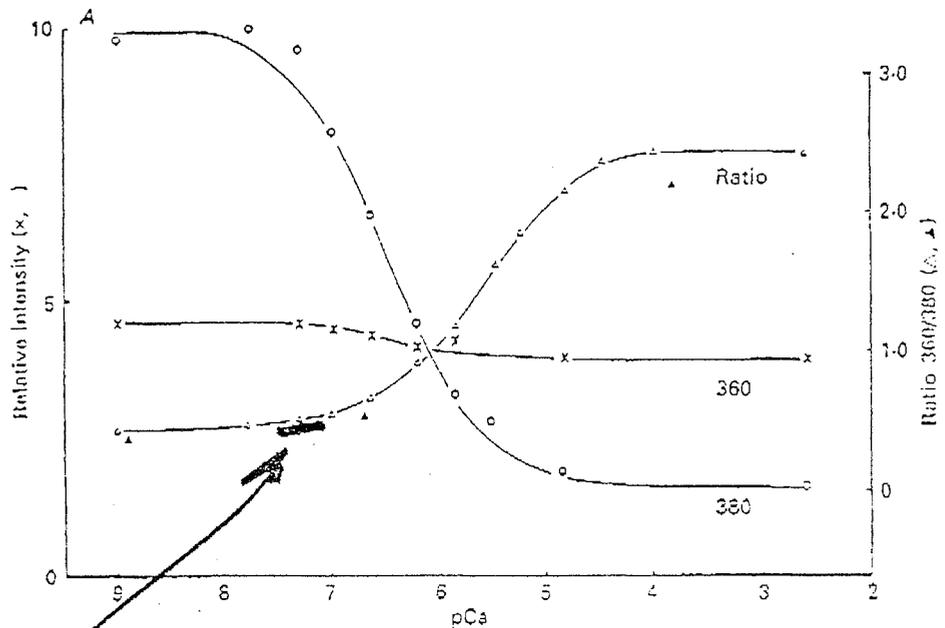
Williams et al (Journal of Physiology (1990); 428:243-256) report a calibration curve of the ratio of Fura-2 fluorescence emission at 360 and 380 nm and $[Ca^{2+}]$ of the solution (copy attached). It appears that the range reported for results of Fig 2.19B of 98 and 37 nM, corresponding to pCa of approximately 7 and 7.4 is in a narrow range of the curve and at a portion where the sensitivity is low. Is this relevant here? Admittedly the errors bars in Fig 2.19B at high PIM are such as to indicate a significant difference from values at low PIM, that is, it indicates that the sensitivity of the technique may be adequate even at these low values of $[Ca^{2+}]$. It would be beneficial if these issues could be clarified. [Presumably the calibration curve for 340 and 380 nm, as used in this investigation, would not be drastically different to that shown by Williams et al].

These issues would need to be clarified in the light of the significance of the overall results and conclusions of the investigation.

Dr. A. Avolio
Graduate School of Biomedical Engineering
University of New South Wales
Sydney 2052
AUSTRALIA

20/2/1995

CALCIUM IN DYSTROPHIC MUSCLE



RANGE OF MEASUREMENT

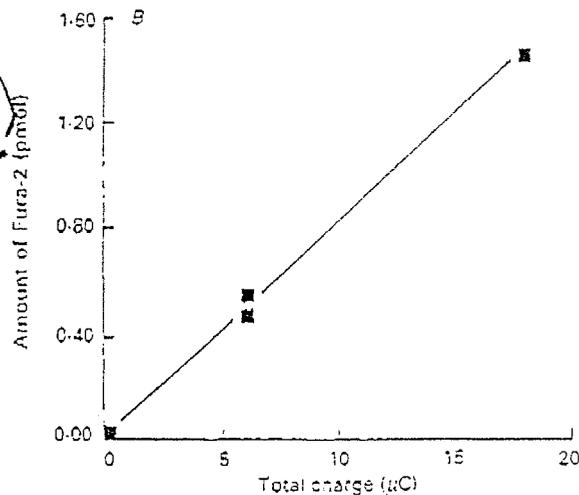


Fig. 1. *A.* calibration curve relating the ratio (Δ) of Fura-2 fluorescence emission excited at 360 and 380 nm to the $[Ca^{2+}]$ of the calibrating solutions. The relative intensity levels recorded at 360 nm (\times) and 380 nm (\circ) are also shown. $[Ca^{2+}]$ was buffered with 10 mM-EGTA and free Ca^{2+} levels were determined by potentiometric titration (Stephenson & Williams, 1981). The calibrating solution also contained (mM): K^+ , 100; Na^+ , 90; Mg^{2+} , 1; HEPES, 10, pH 7.10. The ratio levels determined in three single fibres containing Fura-2 after treatment with Br-A23187 (10 μ M) in otherwise identical calibrating solutions are also shown (\blacktriangle). *B.* relation between amount of Fura-2 ionophoresed from a microelectrode into a solution bubble (see text) contained under paraffin oil, as a function of the total charge passed during 'test' ionophoresis periods. The amount of Fura-2 was derived from a calibration curve of fluorescence intensity for droplets of known volume and Fura-2 concentration. Total charge represents the product of current amplitude (nA) and total duration (s) of the test ionophoresis periods. Continuous lines representing theoretical curves for 1:1 binding of Ca^{2+} by Fura-2 (Hill relations for $n = 1$) were drawn through the experimental points. The ratio curve was obtained from experimental points (where available) or otherwise from these experimental curves.

Nom, Prénom : B O U T I N E T Stéphane

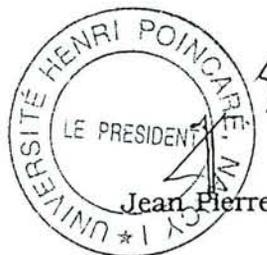
Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en "Biologie et Santé"

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 16 MARS 1995 n° 131

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1



Jean-Pierre FINANCE

RESUME

L'objectif de ce travail s'est focalisé sur le rôle du calcium intracellulaire dans la compliance carotidienne chez le rat au cours d'études *in vitro* sur les effets (1) du vieillissement vasculaire, (2) d'un traitement par la vitamine D₃ et la nicotine, et (3) d'un traitement chronique par un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, le périndopril, sur la surcharge calcique vasculaire. Pour cela nous avons développé une nouvelle technique d'évaluation de la capacité de l'artère carotide à amortir un signal de pression pulsée nous permettant de mesurer simultanément le Ca²⁺ cytosolique par l'utilisation d'une sonde fluorescente, le fura-2.

La capacité d'amortissement artériel est maximale à basse pression (25 mmHg) et minimale à partir de 100 mmHg. A basse pression, la stimulation par la noradrénaline induit une augmentation du niveau de Ca²⁺ intracellulaire et une baisse conjointe de la capacité d'amortissement artériel, indiquant le rôle modulateur du Ca²⁺ intracellulaire. Les effets du vieillissement vasculaire tels qu'une rigidification de l'artère carotide et une calcification pariétale sont nettement accentués lors d'un traitement vitamine D₃-nicotine avec en plus une hypertrophie ventriculaire gauche. Cette calcification pariétale, qui se caractérise par un dépôt de calcium sur les fibres élastiques, aboutit à une perte de la capacité d'amortissement artériel, peu marquée au cours du vieillissement vasculaire mais très prononcée après le traitement vitamine D₃-nicotine. La concentration de Ca²⁺ cytosolique de base ne semble pas être significativement modifiée dans les deux cas. La stimulation par la noradrénaline entraîne une augmentation de Ca²⁺ cytosolique et une baisse de la capacité d'amortissement artériel. La réactivité vasculaire augmente avec la maturation mais n'est pas altérée par le vieillissement. Au contraire, cette réactivité est annulée après le traitement vitamine D₃-nicotine.

Le traitement chronique par le périndopril n'a aucun effet sur la calcification, la capacité d'amortissement artériel et la réactivité vasculaire de l'artère carotide. Seule la pression artérielle systolique et la masse cardiaque sont diminuées par ce traitement.

En conclusion, le Ca²⁺ cytosolique peut jouer un rôle important dans la modulation de la capacité d'amortissement artériel. Cependant, ce rôle devient mineur lors d'altérations fonctionnelles de la matrice extracellulaire notamment des fibres élastiques.

Mots clés : calcium cytosolique, capacité d'amortissement artériel, vieillissement, calcinose, inhibiteur de l'enzyme de conversion.