



Insulino-résistance et vieillissement cardiovasculaire : un traitement chronique par le resvératrol peut-il les améliorer ?

Stéphanie Baron

► To cite this version:

Stéphanie Baron. Insulino-résistance et vieillissement cardiovasculaire : un traitement chronique par le resvératrol peut-il les améliorer ?. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05T093 . tel-01002731

HAL Id: tel-01002731

<https://theses.hal.science/tel-01002731>

Submitted on 6 Jun 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes

Ecole Doctorale GC2ID

*Equipe Viva « Vieillissement Vasculaire »,
EA 4466 «Stress cellulaire : Physiopathologie, Stratégies
nutritionnelles et Thérapeutiques innovantes »*

Insulino-résistance et vieillissement cardiovasculaire : un traitement chronique par le resvératrol peut-il les améliorer ?

Par Stéphanie Baron

Thèse de doctorat de Physiologie

Dirigée par Valérie Nivet-Antoine

Présentée et soutenue publiquement le 27 Novembre 2013

Devant un jury composé de :

M^{me} le Dr Marie-Josèphe AMIOT-CARLIN

M. le Dr Patrick LACOLLEY

M. le Dr Daniel HENRION

M. le Pr Jean-Louis BEAUDEUX

M^{me} le Dr Valérie NIVET-ANTOINE

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Mme le Dr Valérie Nivet-Antoine qui a dirigé ce travail. Ce fut un plaisir de travailler avec toi pendant ces années.

Je remercie Mme le Dr Marie-Josèphe Amiot-Carlin et M. le Dr Patrick Lacolley d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Merci à M. le Docteur Daniel Henrion d'avoir accepté de participer à ce jury et plus particulièrement pour vos conseils et votre expérience.

Je tiens à remercier M. le Professeur Jean-Louis Beaudeau. Merci de m'avoir accepté dans votre équipe et de juger le travail qui en est issu.

Un grand merci à ceux avec qui j'ai travaillé au quotidien, Françoise et Tatiana en tête, ce fut un plaisir, ainsi qu'à toute l'équipe de physiologie, M. le Dr Charles-Henry Cottart, M. le Pr Jean-Pierre Clot, Mmes les Dr Muriel Laromiguière et Monique Pressac.

Merci également à tous ceux qui avec qui j'ai eu l'occasion de travailler, M. le Docteur Bruno Saubamea et l'équipe du SCICM Virginie Mignon et René Lay-Kuen, Mme Chantal Martin et toute l'équipe de l'animalerie grâce à qui j'ai appris à connaître les souris, l'équipe de la Plate-forme d'imagerie du Petit Animal de l'Institut Cochin, Gilles Renault et Carmen Marchiol, l'équipe du Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Charles Foix que j'ai envahi quelquefois.

Enfin, je tiens à remercier le service de Physiologie-Explorations fonctionnelles de l'Hôpital Européen Georges Pompidou, M. les Professeurs Gérard Friedlander et Pascal Houillier qui m'ont permis de réaliser ce travail ainsi que tous mes collègues du service.

Table des matières

TABLE DES ILLUSTRATIONS	1
1. Liste des figures	1
2. Liste des tableaux	2
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	3
INTRODUCTION.....	6
Première partie : Le vieillissement	7
1. Epidémiologie	7
2. Les théories du vieillissement	8
2.1. La théorie génétique du vieillissement.....	9
2.2. La théorie de la réduction télomérique.....	9
2.3. La théorie radicalaire du vieillissement	9
2.3.1. Les producteurs d'espères réactives de l'oxygène	10
2.3.2. Les systèmes anti-oxydants	10
2.3.2.1. La superoxyde dismutase	10
2.3.2.2. La catalase.....	11
2.3.2.3. La glutathion peroxydase.....	11
2.3.2.4. La thioredoxine	11
2.3.2.5. L'hème oxygénase	11
2.3.3. Le déséquilibre de la balance redox.....	12
3. Le vieillissement métabolique.....	14
3.1. Le métabolisme du glucose	14
3.1.1. L'insuline	14
3.1.2. Les pathologies de l'homéostasie glucidique.....	16
3.1.2.1. L'insulino-résistance	16
3.1.2.2. L'intolérance au glucose du sujet âgé.....	17
3.1.3. Le rôle du stress oxydant dans l'homéostasie glucidique.....	17
3.1.4. Le rôle des « nouvelles adipokines » et leur implication dans l'insulino-résistance.....	19
3.1.4.1. La leptine	19
3.1.4.2. La résistine	20
3.2. La dénutrition du sujet âgé.....	21
4. Le vieillissement cardiovasculaire	22
4.1. L'arbre artériel	23
4.1.1. Les différents types d'artères	23

4.1.1.1.	Les artères élastiques	23
4.1.1.2.	Les artères musculaires	23
4.1.1.3.	Les artérioles.....	23
4.1.1.4.	Les capillaires.....	23
4.1.2.	Histologie des artères	24
4.1.2.1.	L'intima	24
4.1.2.2.	La média.....	24
4.1.2.3.	L'adventice.....	24
4.1.3.	Les constituants cellulaires des artères	25
4.1.3.1.	Les cellules endothéliales	25
4.1.3.1.1.	Les agents vasodilatateurs	26
4.1.3.1.2.	Les agents vasoconstricteurs	27
4.1.3.2.	Les cellules musculaires lisses.....	27
4.1.3.3.	La matrice extra-cellulaire	28
4.1.3.3.1.	L'élastine	28
4.1.3.3.2.	Les collagènes	28
4.1.3.3.3.	Les protéoglycanes.....	28
4.1.3.3.4.	Les glycosaminoglycanes	28
4.1.3.3.5.	Les glycoprotéines de structure	29
4.2.	Le vieillissement artériel.....	29
4.2.1.	La dysfonction endothéliale.....	29
4.2.1.1.	L'augmentation du stress oxydant et la diminution de la biodisponibilité du $\cdot\text{NO}$	29
4.2.1.2.	L'augmentation de l'action de l'endothéline 1	31
4.2.1.3.	L'insulino-résistance	31
4.2.2.	Le remaniement de la matrice extra-cellulaire	32
4.2.3.	L'athérosclérose	34
4.2.4.	L'artériosclérose.....	36
4.3.	L'atteinte cardiaque liée au vieillissement artériel.....	38
4.3.1.	L'insuffisance cardiaque systolique	40
4.3.2.	L'insuffisance cardiaque diastolique	40
Deuxième partie : Le resvératrol		43
1.	Généralités	43
1.1.	Structure et métabolisme.....	43
1.2.	Sources.....	44
1.3.	Toxicité.....	44
2.	Propriétés biologiques.....	45
2.1.	Anti-oxydant	45
2.2.	Vasodilatateur	46

2.3. Anti-agrégant plaquettaire	46
2.4. Anti-inflammatoire	47
2.5. Effet sur l'homéostasie lipidique	47
2.6. Effet sur l'homéostasie glucidique.....	48
2.7. Mimétique de restriction calorique	49
3. Les études cliniques.....	50
OBJECTIFS	53
METHODOLOGIE	56
RESULTATS.....	59
ARTICLE 1	60
Résumé.....	60
Discussion et perspectives.....	71
ARTICLE 2	72
Résumé.....	72
Discussion et perspectives.....	93
ARTICLE 3	94
Résumé.....	94
Discussion et perspectives.....	122
CONCLUSION GENERALE.....	123
BIBLIOGRAPHIE	129
ANNEXES	151
1. ANNEXE 1 : MATERIEL ET METHODES	152
1.1. Suivi longitudinal.....	152
1.2. Test de tolérance au glucose	152
1.3. Exploration de l'activité locomotrice.....	152
1.4. Echographie-doppler cardiovasculaire	153
1.4.1. Exploration vasculaire	153
1.4.2. Exploration cardiaque.....	154
1.5. Mesure de la pression artérielle	155
1.6. Exploration de la réactivité artérielle	155
1.7. Euthanasie	156
1.8. Dosages systémiques.....	156
1.9. Analyse histologique des artères	157
1.9.1. Coloration à l'hémalum-éosine	157
1.9.2. Coloration au rouge Sirius.....	157
1.10. Analyse de la calcification aortique	157

1.11. Analyse de l'expression des gènes.....	158
1.12. Analyse immunohistochimique des artères	159
1.12.1. Analyse de l'expression protéique.....	159
1.12.2. Analyse de la production aortique de radicaux superoxydes.....	160
1.13. Analyse de l'expression protéique hépatique du TNF α : Western Blot	161
ANNEXE 2 : Le resvératrol induit une augmentation de l'oxydation du NADH mitochondrial dépendant du complexe 1, responsable de l'activation des sirtuines dans les cellules hépatiques.....	162

TABLE DES ILLUSTRATIONS

1. Liste des figures

<i>Figure 1 :</i>	Evolution de la répartition de la population française en fonction de l'âge entre 1910 et 2050	7
<i>Figure 2 :</i>	Evolution de la part des plus de 65 ans à travers le monde	8
<i>Figure 3 :</i>	Principaux producteurs d'espèces réactives de l'oxygène	10
<i>Figure 4 :</i>	Mécanismes d'élimination des espèces réactives de l'oxygène	12
<i>Figure 5 :</i>	La théorie radicalaire du vieillissement	13
<i>Figure 6 :</i>	Mécanisme d'action de l'insuline	15
<i>Figure 7 :</i>	Les mécanismes d'inactivation de la signalisation de l'insuline	16
<i>Figure 8 :</i>	Voie de signalisation de la leptine	20
<i>Figure 9 :</i>	Biosynthèse du NO par la NOS	26
<i>Figure 10 :</i>	La NADPH oxydase	30
<i>Figure 11 :</i>	Effet de la signalisation de l'insuline sur les artères	32
<i>Figure 12 :</i>	Formation et évolution de la plaque d'athérome	35
<i>Figure 13 :</i>	Mécanisme de formation de l'artériosclérose et ses conséquences	38
<i>Figure 14 :</i>	Continuum vieillissement et atteinte cardio-vasculaire	41
<i>Figure 15 :</i>	Structure chimique du resvératrol	43
<i>Figure 16 :</i>	Effets protecteurs cardiovasculaires du resvératrol	49
<i>Figure 17 :</i>	Echographie-doppler vasculaire	153
<i>Figure 18 :</i>	Echographie-doppler cardiaque	154

2. Liste des tableaux

<i>Tableau I :</i>	Structure histologique des différents types d'artères	25
<i>Tableau II :</i>	Les métalloprotéases matricielles	33
<i>Tableau III :</i>	Classification histologique de l'athérosclérose (American Heart Association)	36
<i>Tableau IV :</i>	Classification de l'insuffisance cardiaque (American Heart Association)	39
<i>Tableau V :</i>	Classification de l'insuffisance cardiaque (New York Heart Association)	39
<i>Tableau VI :</i>	Relations entre le vieillissement cardiovasculaire et les pathologies cardiovasculaires	41
<i>Tableau VII :</i>	Sources alimentaires de trans-resvératrol	44
<i>Tableau VIII :</i>	Principales études cliniques menées avec le resvératrol	51
<i>Tableau IX :</i>	Randomisation des animaux	58

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADMA : Asymétrique diméthylarginine
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine Di-phosphate
AHA : American Heart Association
AHR : Récepteur aux Arylhydrocarbones
AMPc : Adénosine mono-phosphate cyclique
AMPK : AMP-Activated Protein Kinases
ATP : Adénosine tri-phosphate
BH₃ : trihydrobioptérine
BH₄ : tétrahydrobioptérine
BMP-2 : Bone Morphogenetic Protein-2
CML : cellule musculaire lisse
COX : cyclo-oxygénase
DDAH 2 : Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2
EDHF : facteur hyperpolarisant endothélial
EIM : épaisseur intima-média
ERN : espèce Réactive de l'Azote
ERO : espèce Réactive de l'Oxygène
ET-1 : endothéline-1
FAD : Flavin-Adenine Dinucleotide
FMN : Flavin Mononucleotide
GIP : Gastric Inhibitory Peptide
GLP-1 : Glucagon-Like Peptide 1
GLUT 4 : Glucose Transporter Type 4
GMP : guanosine 5' mono-phosphate
GSH : glutathion
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HAS : Haute Autorité de Santé
HDL : High Density Lipoprotein
HIF-1 : Hypoxia-Inducible Factor 1
HTA : hypertension artérielle

IL1 : interleukine 1

IL6 : interleukine 6

IR : Récepteur de l'insuline

IRS : Substrat du récepteur de l'insuline

JAK 2 : Janus Kinase

JNK : JUN N terminal Kinase

KO : Knock Out

LDL : Low Density Lipoprotein

$\cdot\text{OH}$: Radical superoxyde

MAP : Mitogen Activated Protein

MEC : matrice extra-cellulaire

MGP : Matrix Gla-Protein

MMP : métalloprotéase matricielle

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells

$\cdot\text{NO}$: monoxyde d'azote

NOS : NO synthase

NOS II : NOS inductible

NOS III : NOS endothéliale

ONOO^- : peroxynitrite

NYHA : New York American Association

OPG : ostéoprotégérine

PA : pression artérielle

PAI-1 / 2 : Plasminogen Activator Inhibitor 1 / 2

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PGC1 α : Peroxisome-proliférateur-activated receptor-Gamma Co-activator 1 alpha

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PGE2 : prostaglandine E2

PGI2 : prostacycline I₂

PGH2 : endoperoxyde H₂

PYY : polypeptide YY

RANK : Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B

RANKL : RANK ligand

Runx 2 : run-related transcription factor 2

SIRT : Silent Information Regulator mating Type

SOD : superoxyde dismutase

TBP-2 : Thioredoxin Binding Protein 2 (=TXNIP)

TGF β : Transforming Growth Factor Beta

TIMP : Tissue Inhibitors of MetalloProteinases

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

TRX : thioredoxine

t-PA : activateur tissulaire du plasminogène

TXNIP : Thioredoxin Interacting Protein (=TBP-2)

u-PA : activateur du plasminogène de type urokinase

VCAM-3 : Vascular Cell Adhesion Molecule 3

INTRODUCTION

Première partie : Le vieillissement

1. Epidémiologie

L'espérance de vie a considérablement augmenté ces dernières années ; si elle était de 72,9 ans pour les hommes et 81,0 ans pour les femmes en 1990 ; en 2011, elle est respectivement de 78,4 et 84,8 ans (Données INSEE 2011) avec pour conséquence de considérables modifications de la pyramide des âges. En effet, en 2010, la France compte 14,7 millions d'individus de plus de 60 ans, ce qui représente près d'une personne sur quatre ; les plus de 75 ans, quant à eux, constituent 8,9 % de la population française, soit un peu plus de 5,7 millions d'individus. Les projections démographiques prévoient pour 2050 une population d'environ 70 millions de Français. Les plus de 60 ans représenteraient alors près d'un individu sur trois, et les plus de 75 ans 15,6%, soit un doublement de leur part dans la population française totale (Figure 1, Données INSEE 2010). Même si la modification de la pyramide des âges témoigne de très nettes avancées médicales, elle est également à l'origine de l'apparition d'un nouveau groupe démographique, le quatrième âge, avec des individus de 80 ans et plus.

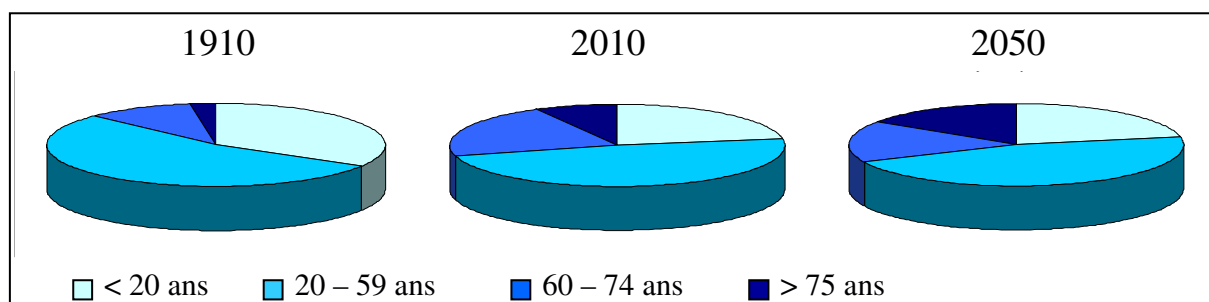


Figure 1 : Evolution de la répartition de la population française en fonction de l'âge entre 1910 et 2050 (INSEE 2010)

Les tendances sont les mêmes en Europe. L'Italie et l'Allemagne qui sont respectivement au deuxième et troisième rang des populations les plus âgées dans le monde avec 19% de leur population actuelle représentée par les plus de 65 ans. En 2030, les plus de 65 ans en Europe représenteront un individu sur quatre. De la même manière, aux Etats-Unis où les projections pour 2030 prévoient 72 millions d'individus de plus de 65 ans, soit 19,3% de la population et 82 millions en 2050 dont 19,4 millions d'individus de plus de 85 ans (1, 2). A travers le monde, quelle que soit la zone géographique, le vieillissement de la population est indéniable comme en atteste la figure 2.

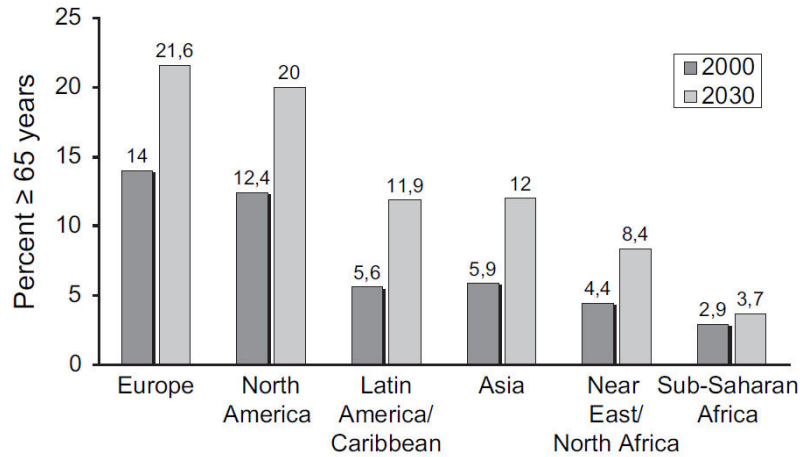


Figure 2 : Evolution de la part des plus de 65 ans à travers le monde (2).

Si dans la population française générale la première cause de mortalité est représentée par les tumeurs (30% des décès), elle est suivie de près par les maladies du système cardiovasculaire responsables de 28% des décès ; chez les plus de 65 ans, ce sont les pathologies cardiovasculaires qui constituent la première cause de mortalité (30,3 % des décès), avec une part qui croît avec l'âge (respectivement 18,6%, 31,1%, 37,5 et 38,0% chez les 65-74 ans, 75-84 ans, 85-94 ans et les plus de 95 ans (Données INSEE 2006)). Ainsi, en France métropolitaine, les pathologies cardiovasculaires constituent la première cause de consultations médicales en ville chez les plus de 65 ans, avec respectivement 58,0 et 53,8 % des motifs de visites chez les hommes et les femmes de cette tranche d'âge (3). Les plus de 75 ans présentent de nombreuses spécificités qui impliquent une prise en charge particulière, c'est pourquoi une meilleure compréhension des mécanismes du vieillissement, et en particulier du vieillissement cardiovasculaire, est indispensable.

2. Les théories du vieillissement

Le vieillissement est un processus physiologique qui correspond à la transformation d'un individu jeune et en bonne santé en un individu fragile avec une diminution des réserves de la plupart des systèmes physiologiques et une vulnérabilité aux maladies et à la mort qui augmente de façon exponentielle. Les premières hypothèses concernant les processus impliqués dans le vieillissement datent des années 1890 et du travail de Weismann qui développait la théorie de la mort programmée suggérant que l'espèce avait un bénéfice à avoir une espérance de vie limitée, favorisant les jeunes aux dépens des plus âgés (4). De nombreuses théories ont été proposées mais trois concepts principaux se dégagent.

2.1. La théorie génétique du vieillissement

La « théorie de l'usure » appliquée aux gènes correspond à l'accumulation de mutations somatiques responsables de dommages cellulaires. Curtis et Crowley ont été les premiers à l'évoquer dès les années 60 (5). L'accumulation de mutations dans l'ADN augmente avec l'âge (6, 7). Elle résulte d'un déséquilibre entre deux processus : la génération de mutations d'une part, et la réparation de ces mutations par les organites cellulaires d'autre part. Ces mutations peuvent être très différentes, allant de la simple mutation silencieuse à l'altération de longues séquences chromosomiques, ayant toutes une fréquence augmentée avec l'âge (8). Leurs causes sont nombreuses : erreurs dans les mécanismes de réplication, induction par l'environnement, agents chimiques et/ou biologiques (UV, agents ionisant, stress oxydant, ...). En parallèle de l'augmentation des mutations, les réparations tendraient à diminuer avec l'âge (9, 10). Enfin, chez les espèces ayant une longévité accrue, ces mécanismes de réparation ne diminueraient pas, participant à la longévité de ces espèces (11, 12).

2.2. La théorie de la réduction télomérique

La théorie de la réduction télomérique place au centre du processus le raccourcissement des extrémités des chromosomes, séquence nucléotidique spécifique (13, 14). Ils stabilisent les chromosomes mais leur réplication n'est pas complète au fil des divisions cellulaires (15). Dès les années 60, des modèles de cultures cellulaires de fibroblastes présentaient un nombre limité de divisions cellulaires possibles (16). L'absence ou quasi-absence de télomérase dans la majorité des cellules ne permet pas la « réparation » des télomères, conduisant à un ralentissement de la division cellulaire puis à son arrêt total et enfin à la mort cellulaire. Dans les cellules immortelles (cancéreuses ou germinales), ces télomérases sont présentes, permettant une réplication illimitée de ces cellules.

2.3. La théorie radicalaire du vieillissement

Dans la théorie radicalaire du vieillissement, le stress oxydant jouerait un rôle prépondérant. Elle a été initialement proposée par Harman en 1956 (17). Le métabolisme, via le transport des électrons et l'oxydation des acides gras, ainsi que l'environnement, par les polluants, le tabac ou les radiations ionisantes, sont à l'origine d'une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans l'organisme. Les plus courants sont les radicaux superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et hydroxyle $\cdot OH$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le monoxyde d'azote $\cdot NO$. Leur accumulation est responsable de dommages au niveau de l'ADN, des lipides et des protéines, et de la modulation de l'expression de nombreux gènes via des facteurs de transcription redox sensibles (NF κ B, AP-1, ...). Les espèces réactives de l'azote (ERN) ont été mises en évidence beaucoup plus récemment. Les peroxynitrites (ONOO $^-$) en sont l'élément central. Ils sont

issus de la réaction entre les radicaux $\text{NO}^\bullet$ et $\text{O}_2^\bullet$. Le $\text{NO}_2^\bullet$ pourrait également intervenir dans le stress nitrosant qui se manifeste essentiellement par la nitrosylation des protéines par les peroxynitrites. Ce stress oxydant et nitrosant est lié au déséquilibre de la balance entre la production des ERO/ERN et leur détoxification par les mécanismes anti-oxydants.

2.3.1. Les producteurs d'espères réactives de l'oxygène

De nombreux mécanismes enzymatiques sont responsables de la production des ERO : la phosphorylation oxydative, le métabolisme énergétique aérobie, la xanthine oxydase, la NADPH oxydase, les cyclooxygénases. Ces enzymes et mécanismes sont résumés dans la figure 3.

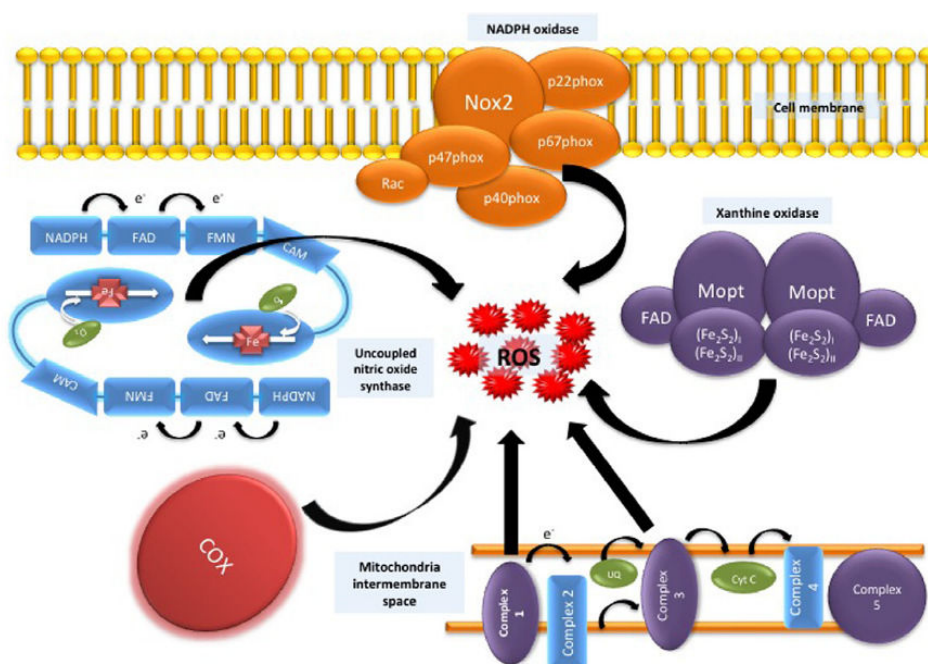


Figure 3 : Principaux producteurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (18)

2.3.2. Les systèmes anti-oxydants

2.3.2.1. La superoxyde dismutase

Les superoxydes dismutases (SOD) sont les principaux piègeurs des radicaux superoxydes $\text{O}_2^\bullet$ dans le vaisseau sanguin. Trois isoformes existent. La Cu-Zn SOD (SOD1) est principalement cytosolique mais peut transloquer vers la mitochondrie en cas de stress oxydant majeur dans ce compartiment. La Mn-SOD (SOD2) est le principal anti-oxydant de la mitochondrie chez les mammifères. Enfin, la Cu-Zn-SOD extra-cellulaire (SOD3), quant à elle, est le principal piègeur de radicaux libres dans l'espace extra-cellulaire. Ces enzymes catalysent la dismutation de l' $\text{O}_2^\bullet$ en eau et peroxyde d'hydrogène. Des modèles inactivés

pour ces gènes (Cu-Zn SOD et Mn-SOD) ont permis de mettre en évidence leur rôle prépondérant dans le maintien des fonctions endothéliales (19, 20).

2.3.2.2. *La catalase*

La catalase catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène. Les bénéfices de sa surexpression ont été mis en évidence dans le ralentissement du développement de l'athérosclérose et dans l'augmentation de la durée de vie chez la souris (21).

2.3.2.3. *La glutathion peroxydase*

La glutathion peroxydase réduit le peroxyde d'hydrogène en eau et les hydroperoxydes en alcool en oxydant le glutathion réduit (GSH) riche en cystéines. La restauration du glutathion sous sa forme réduite est réalisée par la glutathion réductase avec comme cofacteur le NADPH, H⁺.

2.3.2.4. *La thioredoxine*

La thioredoxine a des effets anti-oxydants. En effet, la forme réduite possède deux résidus cystéine, qui lors de leur oxydation produisent un pont disulfure en réduisant les espèces réactives de l'oxygène. La restauration de la thioredoxine réduite est réalisée par la thioredoxine réductase qui possède également deux résidus cystéine.

2.3.2.5. *L'hème oxygénase*

L'hème oxygénase catalyse la première réaction de la dégradation de l'hème en produisant du CO, de la biliverdine et des ions Fe⁺⁺. Son activité est induite par le stress oxydant. La biliverdine, convertie en bilirubine, agirait comme piègeur des ERO mais également comme inhibiteur de la NADPH oxydase. (22).

Ces enzymes anti-oxydantes et leurs mécanismes d'action sont résumés dans la figure 4 ci-après.

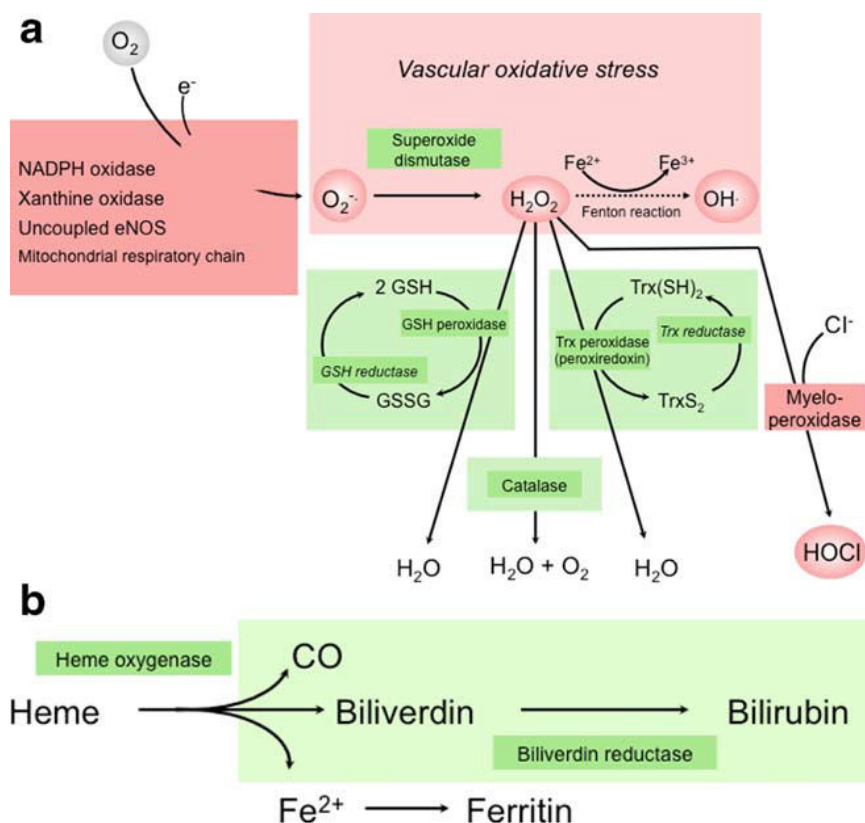


Figure 4 : Mécanismes d'élimination des espèces réactives de l'oxygène (23)

Avec l'âge, il est communément admis que ces mécanismes anti-oxydants sont moins efficaces. En effet, plusieurs études ont montré la diminution des concentrations de glutathion et la diminution de l'induction des enzymes anti-oxydantes avec le vieillissement (24, 25). En outre, les apports alimentaires d'anti-oxydants non enzymatiques (vitamines C et E, flavoprotéines, ...) ont tendance à diminuer, concourant à la diminution des capacités anti-oxydantes de l'organisme.

2.3.3. Le déséquilibre de la balance redox

Que ce soit par augmentation de production ou par des défauts de dégradation, les ERO augmentent avec l'âge, ainsi que les dommages qu'ils induisent (26). Ainsi, comme résumé dans la figure 5, le stress oxydant est responsable de dommages au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides, conduisant à l'altération des mécanismes de défense de l'organisme et des structures cellulaires. L'ensemble de ces phénomènes aboutit à la perte des fonctions normales et au vieillissement puis à la pathologie, comme décrit dans la figure 5.

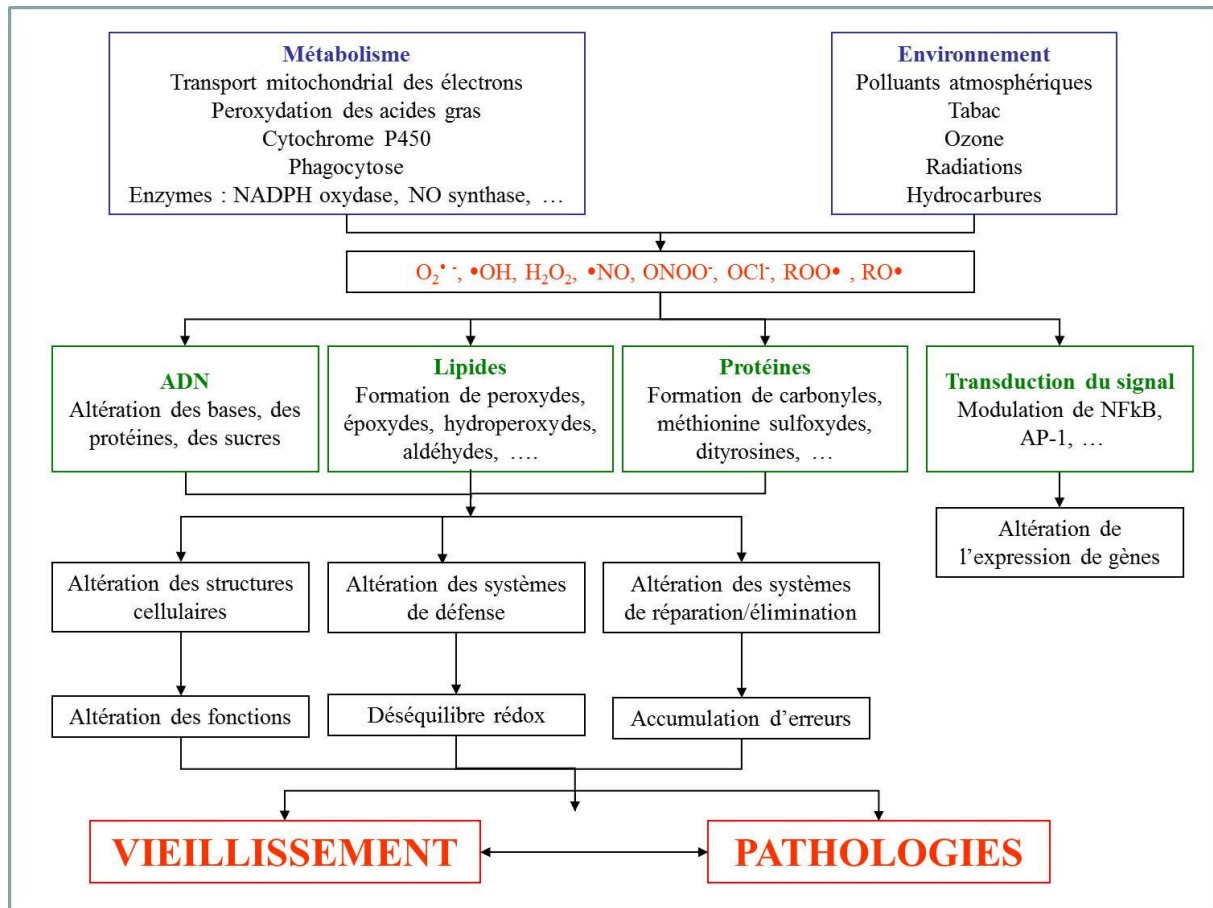


Figure 5 : La théorie radicalaire du vieillissement (d'après (27))

Finally, the genetic and radical theories of aging are intimately linked, oxidative stress being also itself implicated in DNA mutations.

3. Le vieillissement métabolique

3.1. Le métabolisme du glucose

Les pathologies liées au métabolisme du glucose voient leur fréquence augmenter avec l'âge. Dans le monde, le diabète de type 2 touche 310 millions d'individus. Dans la survenue de ces atteintes, de nombreux éléments sont mis en jeu. En particulier, l'insuline tient un rôle central dans le maintien de l'homéostasie glucidique ; la diminution de sa sécrétion aussi bien que la diminution de ses actions interviennent de manière prépondérante dans la physiopathologie des altérations de l'homéostasie glucidique.

3.1.1. L'insuline

L'insuline est une hormone synthétisée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Elle contrôle en partie l'homéostasie énergétique et le métabolisme des glucides et des lipides. Elle est sécrétée en réponse à une augmentation de la concentration en glucose ; elle réduit la néoglucogenèse hépatique et augmente la captation du glucose dans le muscle squelettique et le foie (28, 29). L'insuline régule également la glycogénogenèse, la lipogenèse ainsi que la synthèse protéique (30).

L'action de l'insuline passe par son interaction avec son récepteur, IR (insulin receptor), membranaire exprimé sur trois tissus principaux : le foie, le muscle et le tissu adipeux. L'activité tyrosine kinase de son récepteur permet son autophosphorylation puis dans un second temps la phosphorylation des résidus tyrosine des protéines substrats IRS. Cette phosphorylation d'IR aboutit à l'activation de la voie de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) qui active elle-même Akt aboutissant aux différentes voies de synthèse liées à l'insuline. La phosphorylation d'Akt induit entre autre la translocation de GLUT4, un des transporteurs du glucose, stimulant la captation du glucose (31). Cette voie d'activation est celle qui est en priorité impliquée dans les effets métaboliques de l'insuline. Une autre voie de signalisation majeure de l'insuline fait intervenir la voie des Mitogen Activated Protein (MAP) kinases via l'intervention de Ras-Raf-ERK1/2. Cette seconde voie serait majoritairement impliquée dans les effets nucléaires, de croissance et de différenciation cellulaires.

L'activation des différentes voies de signalisation liées au récepteur de l'insuline conduit à de nombreux effets physiologiques. L'insuline stimule la synthèse protéique, la synthèse de glycogène, le transport du glucose, la transcription de gènes et l'expression génique. L'insuline présente également une action anti-lipolytique et anti-apoptotique (Cf. figure 6).

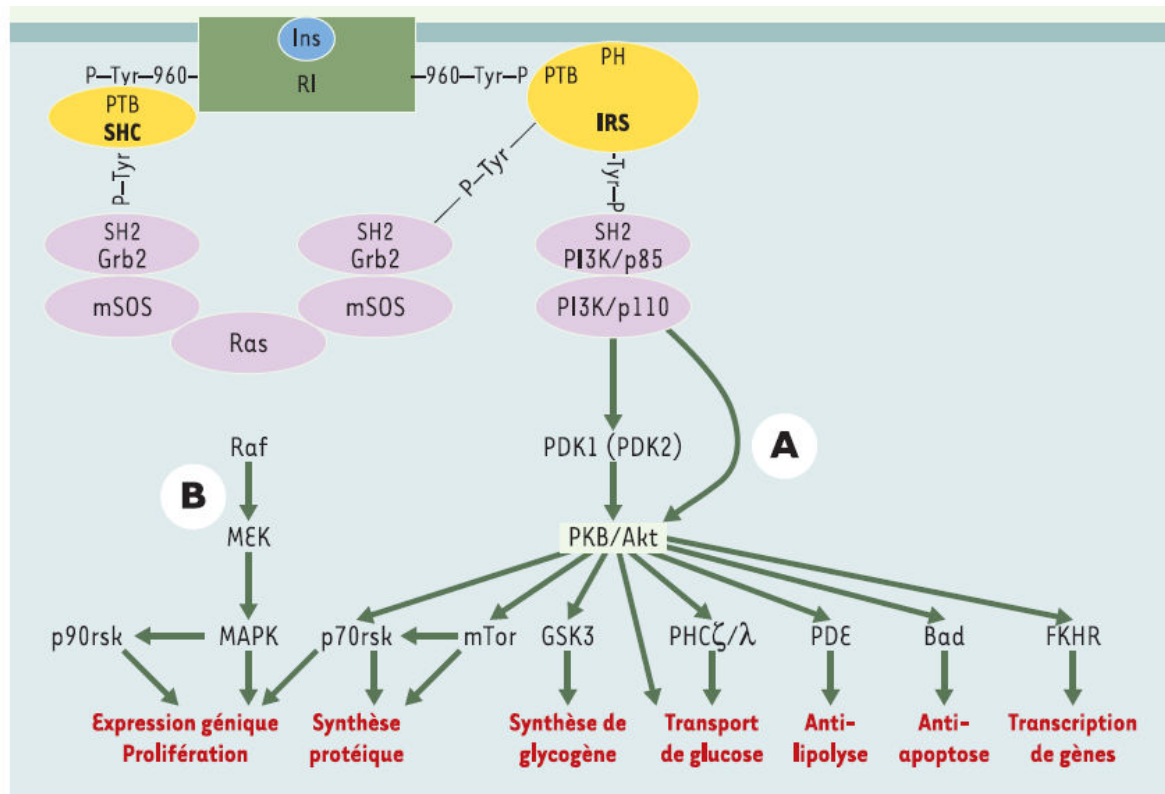


Figure 6 : Mécanisme d'action de l'insuline (32)

A l'inverse, plusieurs mécanismes permettent une désactivation de la voie de signalisation de l'insuline. La voie principale est la phosphorylation des résidus sérine-thréonine de son récepteur IR qui jouerait un rôle antagoniste à la phosphorylation sur les tyrosines (33). Ces phosphorylations seraient réalisées par des kinases telles que la PKC, $IKK\beta$, MAP kinase et JNK (34). Les signaux capables d'induire le découplage du récepteur de l'insuline sont nombreux. Parmi eux, on note les acides gras libres associés au diacylglycérol et l'acylCoA, le glucose, l'hyperinsulinisme ainsi que des cytokines inflammatoires, en particulier, le $TNF\alpha$ et l' $IL1\beta$ (35). La déphosphorylation du récepteur et des protéines IRS intervient également dans ce processus, elle est réalisée par des tyrosines phosphatases comme les phosphatases PTP1B cytosoliques et les Leukocytes common Antigen-Related molecule membranaires (36). D'autres mécanismes moins décrits tels que la déphosphorylation des phosphoinositides ou la réversion du signal de la PI3K, seraient également impliqués dans le contrôle négatif de la signalisation de l'insuline. Ces mécanismes sont résumés dans la figure 7(36).

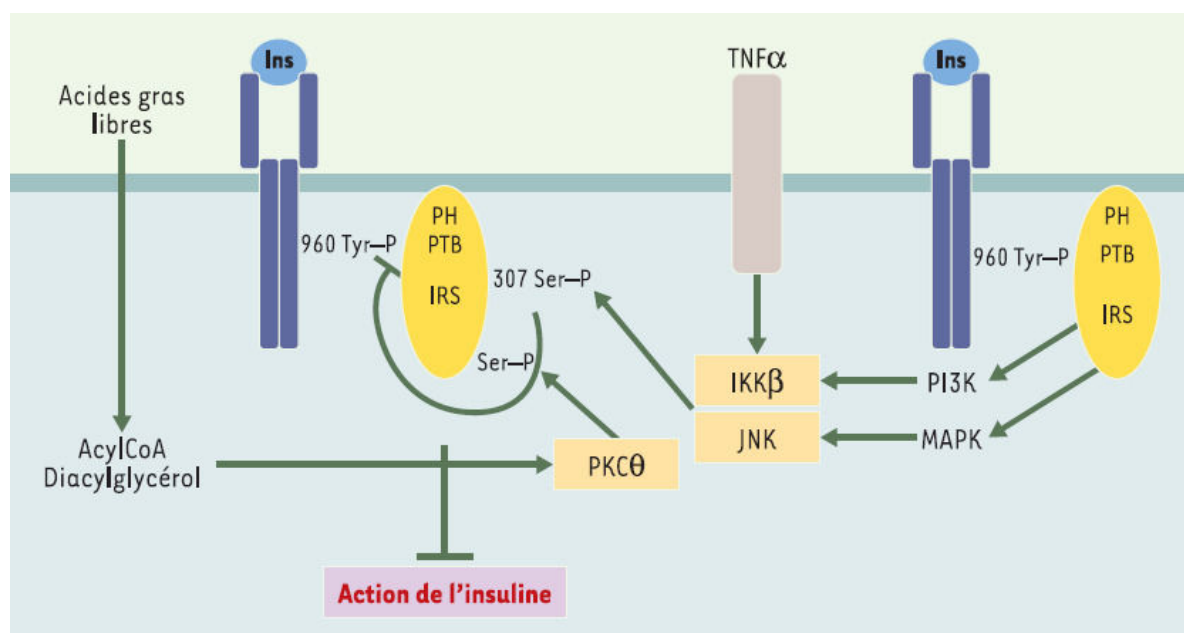


Figure 7 : Les mécanismes d'inactivation de la signalisation de l'insuline (32)

3.1.2. Les pathologies de l'homéostasie glucidique

3.1.2.1. L'insulino-résistance

Bien que communément utilisé, le terme d'insulino-résistance fait débat car sa définition exacte partage encore la communauté scientifique. Selon l'OMS, l'insulino-résistance est définie dans des conditions d'euglycémie et d'hyperinsulinisme ; elle correspond à une captation du glucose inférieure à celle du dernier quartile de la population contrôle de l'étude. Le groupe européen pour l'étude de l'insulino-résistance (EGIR) a proposé une définition alternative applicable chez les sujets non diabétiques uniquement (insulinémie à jeun supérieure à celle du quartile supérieur des sujets non diabétiques appariés pour l'âge et le sexe (37).

L'insulino-résistance constitue la première étape de l'installation du diabète de type 2, dit « non insulino-dépendant ». Cette pathologie touche plusieurs centaines de millions d'individus dans le monde. En France, sa prévalence atteint 4% (38). Cette pathologie évolutive se caractérise par trois stades successifs (39) :

- 1) Une insulino-résistance initiale qui conduit à un état d'hyperinsulinisme sans modification de la glycémie
- 2) Une élévation de la production hépatique de glucose
- 3) Un déficit de sécrétion d'insuline, l'insulinopénie, plus tardif, qui conduit à la nécessité d'entreprendre une insulinothérapie.

Dans le diabète non insulino-dépendant, l'insulino-résistance est essentiellement musculaire et a pour point central la synthèse de glycogène. Elle est la conséquence pour partie de l'accumulation de graisse au niveau du muscle (par une diminution de la β oxydation par déficit d'activité des enzymes clés (40)) et du tissu adipeux viscéral.

3.1.2.2. *L'intolérance au glucose du sujet âgé*

La notion d'intolérance au glucose existe depuis les années 1920 et les travaux de Spence mettant en évidence une altération du métabolisme du glucose dès l'âge de 60 ans (41). L'intolérance au glucose semble être caractérisée par une diminution de la sensibilité à l'action de l'insuline avec une augmentation de l'insulino-sécrétion (42). Ainsi, le métabolisme du glucose dans le muscle squelettique serait altéré (43, 44) avec une augmentation des lipides intra-musculaires (45-48). L'accumulation d'acides gras libres conduirait à l'activation de sérine kinases responsable des altérations de la voie de signalisation de l'insuline dans le muscle (49-51) et dans le foie (52). Ces phénomènes concourent à la diminution du transport du glucose dans le muscle (53), à la diminution de la synthèse musculaire de glycogène (54, 55) et à l'absence de suppression de la production hépatique de glucose par l'insuline (56-58). La sécrétion du glucagon par les cellules α des îlots de Langerhans semblerait également impliquée dans cette intolérance au glucose (59). En effet, il existerait une hypersécrétion basale de glucagon (60) ainsi qu'un défaut de suppression de la sécrétion post-prandiale du glucagon (61-63). Ce phénomène peut avoir plusieurs origines. Le défaut d'action paracrine de médiateurs sécrétés par les cellules β peut être invoqué, comme l'insuline, mais également l'acide gamma-amino-butyrique ou le zinc (64).

Le diagnostic de l'intolérance au glucose est fondé sur la réalisation d'une hyperglycémie provoquée par voie orale avec une charge de 75 g de glucose (65). Lors de cette épreuve, la glycémie à jeun est normale mais la glycémie deux heures après la charge de glucose reste élevée (comprise entre 7,8 et 11,1 mmol/L).

3.1.3. Le rôle du stress oxydant dans l'homéostasie glucidique

Plusieurs études ont évoqué le lien entre l'insulino-résistance et le stress oxydant (66-68). Houstis et al. ont montré le bénéfice du traitement du stress oxydant dans plusieurs modèles d'insulino-résistance (69). Martins évoque le rôle prépondérant de la mitochondrie dans le développement de l'insulino-résistance (70). Dans le pancréas, les cellules β des îlots de Langerhans sont particulièrement sensibles au stress oxydant de par l'importante phosphorylation oxydative nécessaire pour leur fonctionnement et le peu de systèmes anti-

oxydants présents (71, 72). Dans ces cellules, les ERO sont responsables d'une diminution de l'insulino-sécrétion en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose (73-75), de la diminution d'expression de gènes clés des cellules β (76) et d'une induction de la mort cellulaire (77). Dans le muscle squelettique, l'altération des fonctions mitochondriales conduirait à une augmentation du stress oxydant et nitrosant, mais également à une augmentation des dérivés des acides gras libres. Ces derniers, avec le stress oxydant, participeraient à l'activation de kinases qui phosphorylerait les sérines du récepteur de l'insuline IR concourant à la diminution de la phosphorylation sur les tyrosines et donc à une diminution de la réponse à l'insuline. De plus, les ERO stimuleraient la phosphorylation sur les thréonines des JNK (78) et seraient impliquées dans l'insulino-résistance (79, 80). Par ailleurs, le stress oxydant est responsable d'une diminution de la captation du glucose aussi bien dans le muscle que dans le tissu adipeux (81, 82). Dans le muscle, le stress oxydant serait à l'origine d'une peroxydation lipidique accrue et d'une réaction inflammatoire au niveau du muscle squelettique (69). La xanthine oxydase serait particulièrement impliquée dans ce processus (83). Dans le tissu adipeux, les ERO participeraient à la dysrégulation de la production des adipocytokines et à l'augmentation du stress oxydant systémique (84). Ces ERO adipeux pourraient être issus d'une production accrue par la NADPH oxydase, elle-même potentiellement activée par l'augmentation des acides gras libres. Les ERO participeraient au défaut d'activation de la PI3K et d'Akt, au défaut de la lipogenèse, de la captation du glucose et de la translocation de GLUT 4 à la membrane plasmique.

D'autres mécanismes peuvent expliquer le lien entre l'insulino-résistance et le stress oxydant. TXNIP (Thioredoxin interacting protein), aussi appelé Thioredoxin Binding Protein 2 (TBP-2), est une protéine ubiquitaire qui intervient dans la régulation de la balance redox par son action inhibitrice sur la thioredoxine (Trx) (85). En effet, TXNIP se lie aux résidus riches en cystéine de Trx et empêche ainsi son activité disulfide réductase qui permet de maintenir sous formes réduites les composés thiols (86). TXNIP appartient à la famille des α -arrestines et possède d'autres fonctions comme de réguler la croissance, la différenciation cellulaire et l'apoptose. TXNIP est également liée au métabolisme du glucose. En effet, un élément de réponse aux carbohydrates est présent dans le promoteur de TXNIP (87, 88). Sa surexpression est induite par l'hyperglycémie et associée au diabète. Sa surexpression induirait une augmentation du stress oxydant par diminution de l'activité de Trx ainsi qu'une apoptose accrue (89, 90). Dans le pancréas, sa surexpression induirait l'apoptose de cellules β et une diminution de l'insulino-sécrétion (91-93). Les souris inactivées pour Txnip présentent des

hypoglycémies à jeun, confirmant l'implication de TXNIP dans l'homéostasie glucidique (94). Dans le muscle squelettique, son absence permet une meilleure captation du glucose via GLUT 1 (95). Au niveau du tissu adipeux, la délétion de Txnip induirait une augmentation de l'adiposité et de l'adipogenèse mais avec une préservation de l'insulino-sensibilité (96).

Cependant, tous les effets de TXNIP ne semblent pas liés à son interaction avec la Trx. Chez la souris mutée pour le gène Txnip (TXNIP C247S), TXNIP ne peut pas se lier à la Trx. On observe malgré tout une altération de l'homéostasie glucidique, laissant supposer une activité de TXNIP indépendante de son interaction avec la thioredoxine (97).

3.1.4. Le rôle des « nouvelles adipokines » et leur implication dans l'insulino-résistance

Les adipokines ont récemment été mises en évidence ; leur intérêt dans la physiopathologie de l'insulino-résistance est majeur. Parmi elle, l'adiponectine, sécrétée par le tissu adipeux semble jouer un rôle important en augmentant la captation du glucose via GLUT 4 et la glycolyse non oxydative (98) et en diminuant la néoglucogenèse (99). Sur le plan cardiovasculaire, des concentrations élevées d'adiponectine seraient corrélés avec une diminution du risque d'infarctus du myocarde chez l'homme (100). Cependant, son étude est rendue difficile par la multiplicité des formes existantes (trimère, hexamère, multimère, ...) (101) ; les formes de haut poids moléculaire étant celles qui semblent être responsables des principales propriétés biologiques (102, 103).

3.1.4.1. *La leptine*

La leptine a été mise en évidence pour la première fois en 1994 par Zhang (104). Cette hormone est synthétisée par le tissu adipeux sous le contrôle du gène ob (104). Elle est bien connue pour son rôle dans la régulation de l'appétit et la prise alimentaire, en particulier chez la souris (105) et a également été reliée à la dénutrition du sujet âgé (106). Sa production est proportionnelle à la masse adipeuse (107). En parallèle de ses effets anorexigènes, la leptine a également des effets sur le système cardiovasculaire avec une augmentation du NO au niveau endothélial ainsi que l'augmentation de l'angiogenèse (108). Le récepteur de la leptine est issu du gène db. Il est principalement situé dans le système nerveux central, mais également dans les adipocytes et les cellules endothéliales. Il appartient à la famille des récepteurs des cytokines. Son activation induit le recrutement de JAK2 conduisant à l'activation de deux voies de signalisation : celle de STAT 3, induisant la prise alimentaire et la production hépatique de glucose, et celle de l'insuline, principalement via la PI3K (109-111), en particulier en supprimant la lipogenèse (112) (Cf. figure 8). L'absence de leptine ou

l'inactivation de son récepteur induit une hyperphagie massive et une obésité dans les modèles murins (113) aussi bien que chez l'Homme (114, 115).

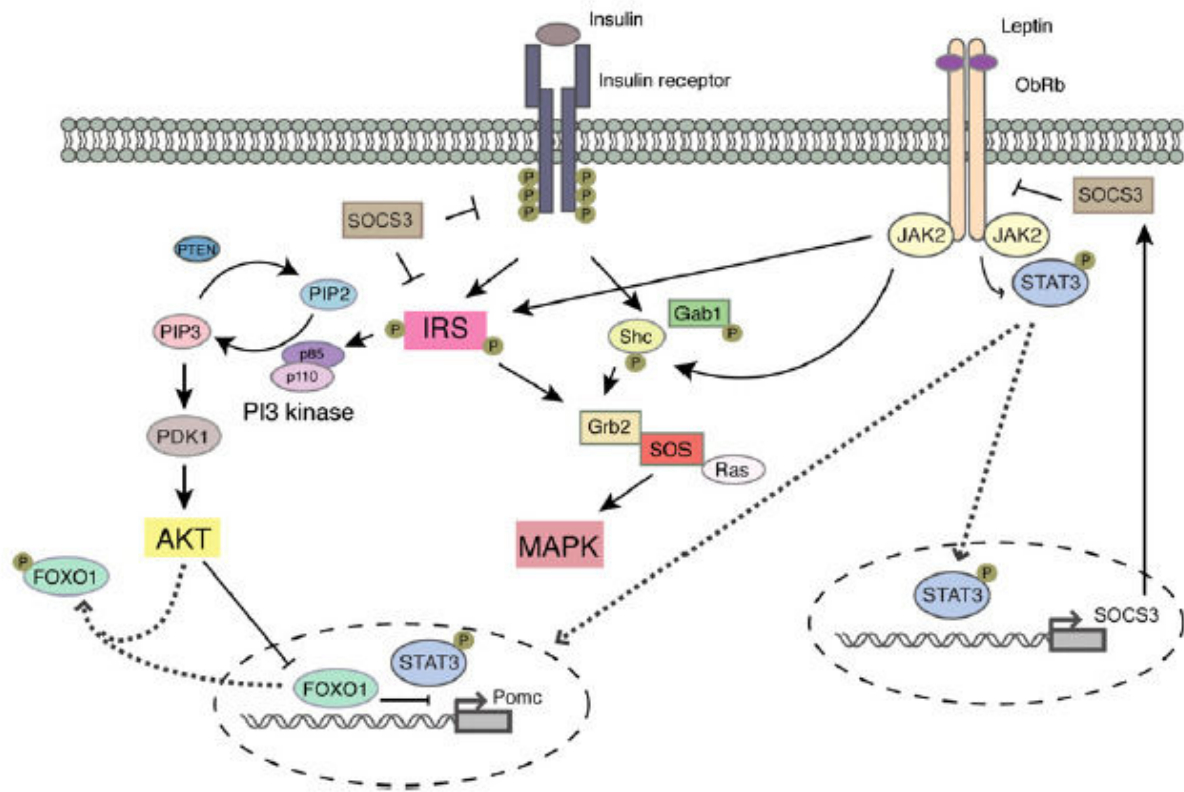


Figure 8 : Voie de signalisation de la leptine (116)

3.1.4.2. La résistine

La résistine est un polypeptide de 12 kDa riche en cystéines qui appartient à la famille des « resisitine like molecules » ou des protéines FIZZ (Found in Inflammatory Zone) (117). Chez les rongeurs, elle est sécrétée par le tissu adipeux blanc et est responsable d'une diminution de la sensibilité à l'insuline (118). Chez l'Homme, la résistine est principalement sécrétée par les monocytes et macrophages (119) et présente donc une augmentation de sa concentration sérique circulante dans un contexte inflammatoire (120). Des concentrations élevées seraient associées à une atteinte coronaire (121). De plus, des études *in vitro* ont mis en évidence son action pro-athérogène sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages. La résistine a également été montrée comme induisant la prolifération des cellules musculaires lisses des artères (122). Des études cliniques autant que des travaux *in vitro* ont montré le lien entre la résistinémie et l'atteinte cardiovasculaire, en particulier avec la calcification coronaire (123).

3.2. La dénutrition du sujet âgé

La dénutrition protéino-énergétique est un phénomène communément observé dans la population âgée. Elle est le résultat d'un déséquilibre entre les apports et les besoins de l'organisme. Elle se caractérise, entre autres, par une perte de poids (124) et une diminution importante des apports alimentaires (jusqu'à 30% entre 20 et 80 ans (125)). En France, sa prévalence en ville varie entre 4 et 10% selon les études; cette prévalence est supérieure dans la population institutionnalisée (15 à 38%) et encore d'avantage dans la population hospitalisée (30 à 70%) (126). Cette dénutrition constitue un facteur de risque majeur pour de nombreuses pathologies du sujet âgé et reste prédictive de la perte d'autonomie et de la mortalité (127).

Trois phénomènes principaux sont impliqués dans le développement et l'installation de cette dénutrition. Tout d'abord, l'insuffisance des apports alimentaires est à l'origine de la perte de poids involontaire et de l'installation d'une dénutrition d'origine exogène. Elle a plusieurs étiologies comme la perte du goût et l'anorexie du sujet âgé (128, 129). Sur le plan neuronal, de nombreux médiateurs seraient impliqués dans le contrôle de l'appétit et de la prise alimentaire. Des modifications hormonales telles que celle du polypeptide YY (PYY), de la ghréline, de la cholécystokinine, du GLP-1 ou du GIP interviendraient dans ce processus. PYY fait partie de la famille des neuropeptides Y. Il est produit par les cellules L du tractus gastro-intestinal (intestin grêle et colon) en réponse à une prise alimentaire et agit comme signal de satiété aussi bien chez le rat que chez l'Homme (130, 131). Des souris transgéniques surexprimant PYY présente une prise alimentaire diminuée après un jeûne ainsi qu'une augmentation de leurs capacités lipogéniques et de l'action de l'insuline (132). Enfin, PYY semble également intervenir dans l'homéostasie glucidique avec un rôle potentiel dans le maintien et la fonction des cellules β pancréatiques et leur production d'insuline (133, 134). D'autres médiateurs interviennent également dans cette régulation, dont la ghréline, synthétisée principalement par les cellules du fundus de l'estomac. Elle a pour fonction de stimuler la prise alimentaire et la prise de poids, la sécrétion d'acide digestif et la motilité gastrique.

Le second phénomène impliqué dans la dénutrition du sujet âgé est la sarcopénie. Elle est spécifique du sujet âgé et correspond à une détérioration de la composition corporelle par diminution de la synthèse protéique et aboutit à une diminution de la masse musculaire et des fonctions de l'organisme (135). Elle serait liée à la diminution de l'exercice physique avec l'âge mais également aux modifications hormonales avec un rôle important de l'insulino-résistance. Elle s'installerait progressivement et deviendrait chronique au cours du

vieillesse. Enfin, la cachexie intervient dans le cadre de pathologies aiguës (infections, sepsis, ...) avec une libération massive de cytokines inflammatoires telles que l'IL1, l'IL6 ou le TNF α , responsables d'une dépense énergétique majeure (136). Elle se caractérise par une perte involontaire de masse non grasse par augmentation du catabolisme (137). Ainsi, la cachexie est liée aux états inflammatoires et amplifiée par une augmentation de la demande énergétique et protéique et va entraîner une dénutrition dite endogène. Elle amplifie donc le processus de sarcopénie et de dénutrition exogène.

L'évaluation et la prise en charge de la dénutrition du sujet âgé a fait l'objet d'un consensus spécifique à cette catégorie de population par la Haute Autorité de Santé en 2007(126). Quatre éléments principaux interviennent dans le diagnostic de cette dénutrition. On prend en compte une perte de poids (supérieure à 5% en 1 mois ou 10% en 6 mois), un indice de masse corporelle < 21 kg/m², une albuminémie < 35 g/L et une évaluation par un questionnaire tel que le Mini Nutritional Assessment. Le stade de la dénutrition sévère est franchi lorsque la perte de poids atteint 10% en 1 mois ou 15% en 6 mois, l'indice de masse corporelle est inférieur à 18 kg/m² ou l'albuminémie < 30 g/L. La prise en charge nutritionnelle de la personne âgée dénutrie a pour objectif d'atteindre un apport énergétique de l'ordre de 30 à 40 kcal/kg/jr avec un apport protéique de 1,5 à 2 g/kg/jr.

Cette dénutrition fait partie d'un syndrome plus global, le « frailty syndrome » décrit dès le milieu des années 90 (138). Sa définition associe une perte involontaire de poids, de masse musculaire, un épuisement et un déclin des fonctions physiques et intellectuelles (139). Son évaluation est réalisée à l'aide d'une échelle FRAIL qui prend en compte la « Fatigue » (F), la « Résistance » (R) correspondant à une incapacité physique comme monter un escalier, l'« Ambulation » (A) correspondant à l'incapacité à marcher sur une courte distance, la maladie « Illness » (I) évaluée par cinq comorbidités ou plus ainsi que la perte de poids, « Loss » (L) supérieure à 5% (140).

4. Le vieillissement cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est un élément fondamental pour le fonctionnement de l'organisme. Il permet l'irrigation et l'oxygénation des différents organes et tissus. Il est composé du cœur et d'un réseau complexe d'artères et de veines. Les pathologies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité quelle que soit l'origine géographique des individus (rapport OMS 2009). En Europe, elles représentent 40% des causes de décès (141). L'atteinte coronaire et l'accident vasculaire cérébral représentent respectivement 50 et

25 % des décès d'origine cardiovasculaire en Europe. Dans le monde, les atteintes coronaires représentent 6,3 millions de décès annuels et les accidents vasculaires cérébraux 4,4 millions en 1990 selon l'étude Burden (142). Les projections issues de cette étude montrent qu'en 2020 ces deux pathologies seraient toujours les principales causes de mortalité (143). La compréhension des mécanismes physiopathologiques inhérents au vieillissement cardiovasculaire est indispensable à la prise en charge aussi bien préventive que curative de ces pathologies.

4.1. L'arbre artériel

4.1.1. Les différents types d'artères

Le réseau artériel est composé de différents types d'artères : les artères élastiques, les artères musculaires, les artérioles et enfin les capillaires.

4.1.1.1. Les artères élastiques

Les artères élastiques, ou conductrices, sont situées à la sortie du cœur et correspondent à l'aorte et ses principales ramifications (tronc brachio-céphalique, artères sous-clavières, artères rénales et pulmonaires). Elles ont le diamètre le plus important et la plus grande élasticité de par l'importante présence d'élastine et de cellules musculaires lisses.

4.1.1.2. Les artères musculaires

Les artères musculaires, ou distributrices, ont un calibre moyen et constituent les ramifications des artères élastiques avec, entre autres, les artères radiales, fémorales ou tibiales. Elles contiennent un important contingent de cellules musculaires lisses mais peu d'élastine en comparaison avec les artères de conduction. Elles sont également appelées artères de résistance car ce sont elles qui absorbent l'onde de pression et sont donc les plus sollicitées.

4.1.1.3. Les artérioles

Les artérioles s'ouvrent sur le lit capillaire, organisé en réseau, qui irrigue tissus et organes. Chez l'Homme, leur diamètre est inférieur à 0,3 mm. Leur rôle vasomoteur est prépondérant puisqu'elles sont essentiellement responsables des résistances périphériques et donc du maintien de la pression artérielle.

4.1.1.4. Les capillaires

Les capillaires se subdivisent également en différentes catégories en fonction de leur perméabilité. Les capillaires continus se situent dans les muscles, les tissus nerveux, les poumons, le tissu conjonctif, et les glandes exocrines. Ce sont les capillaires les moins

perméables. Les capillaires fenestrés se trouvent dans les glomérules rénaux, les intestins et les glandes endocrines. Leur perméabilité est intermédiaire. Enfin, les capillaires sinusoides, les plus perméables, sont présents dans le foie, la moelle osseuse, la rate, les ganglions lymphatiques et le cortex surrénal.

4.1.2. Histologie des artères

Sur le plan histologique, les artères sont toutes composées de trois couches de tissus concentriques distinctes dont l'importance varie en fonction du type d'artère. L'ensemble des caractéristiques histologiques est résumé dans le tableau I.

4.1.2.1. *L'intima*

La tunique la plus interne, l'intima, est constituée d'un endothélium composée d'une monocouche de cellules endothéliales qui tapisse la lumière et réduit au minimum la friction avec le sang. Dans les artères élastiques, cet endothélium repose sur une couche conjonctive sous-endothéliale faite de cellules musculaires lisses (CML) particulières, les cellules myointimales. La limitante élastique interne permet la délimitation de l'intima et de la média.

4.1.2.2. *La média*

La tunique moyenne, la média, est la plus épaisse. Elle est constituée de CML pour 30% de son volume. Ces CML contrôlent le tonus et les résistances vasculaires et baignent dans une matrice extracellulaire (MEC). Selon le type d'artère, la structure de la média peut différer légèrement. Les artères élastiques présentent un empilement d'unités lamellaires transversales, les feuillets musculo-élastiques, formant les unités fonctionnelles de la média. Chaque feuillet est composé d'une ou deux travées de CML entourées par la MEC. Dans les artères musculaires, on retrouve les mêmes feuillets musculo-élastiques mais avec cependant une organisation moins bien définie que pour les artères élastiques.

La quantité d'élastine est le principal critère histologique distinguant ces deux types d'artères. Les artères de conduction sont riches en élastine, alors que les artères de résistance en sont beaucoup plus pauvres. Enfin, les artérioles présentent une quantité très faible de CML.

4.1.2.3. *L'adventice*

La tunique la plus externe, l'adventice, est principalement composée de fibroblastes, de fibres élastiques épaisses, de protéoglycanes et de fibres de collagène lâchement entrelacées qui renforcent le vaisseau et l'ancrent dans les structures environnantes. Cette répartition cellulaire n'est pas figée et peut évoluer en fonction des pathologies et du vieillissement.

Tableau I : Structure histologique des différents types d'artères

	Intima	Média	Adventice
Artère élastique	Epaisse, avec une couche conjonctive sous endothéliale constituée de CML spécifiques : cellules myointimales	Plusieurs dizaines de couches de lames élastiques associées à des faisceaux de fibres collagène et élastiques ainsi que CML à prolongements bifurqués : les cellules rameuses	Mince, riche en fibres élastiques
Artère musculaire	Fine	Une couche de CML enrobée de quelques fibres collagène et élastiques, délimitation par les limitantes élastiques interne et externe	Epaisse, majoritairement constituée des faisceaux de fibres de collagène avec quelques fibres élastiques
Artériole (⊙ 0,3 mm à 50 μm)	Endothélium sur la lame basale	Limitante élastique interne avec 2 à 3 couches de CML	Fine, fibres collagènes avec quelques fibres élastiques, fusionnée avec le tissu conjonctif environnant
Artériole (⊙ < 50 μm)		Absence de limitante élastique interne, une seule couche de CML	

4.1.3. Les constituants cellulaires des artères

4.1.3.1. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont le principal composant de l'endothélium artériel. Elles ont trois rôles fondamentaux. Le premier correspond à la défense mécanique de l'artère contre les contraintes mécaniques qu'elle subit (forces de cisaillement et/ou de pression). Dans ce cadre, leur réponse se fait à deux niveaux avec un mécanisme rapide qui conduit à la modification immédiate de la perméabilité ionique membranaire, et à plus long terme avec la libération des médiateurs de vasodilatation ou l'inhibition de la sécrétion de médiateurs vaso-constricteurs. La régulation de la pression artérielle est également en partie sous le contrôle des cellules endothéliales qui synthétisent le peptide natriurétique de type C en réponse au « shear stress ». Ceci aboutit à la vasodilatation de l'artère et l'inhibition de synthèse de l'endothéline. Enfin, les cellules endothéliales sont responsables du maintien de la vasomotricité en libérant des molécules qui vont avoir un effet direct tant sur les CML de la média que sur les plaquettes. Pour assurer ces différentes fonctions, la libération de nombreux médiateurs par les cellules endothéliales est indispensable au maintien des fonctions de l'endothélium mais également de la média et en particulier des CML.

4.1.3.1.1. Les agents vasodilatateurs

Le monoxyde d'azote (NO) a un rôle majeur dans la vasodilatation artérielle en diffusant librement vers le pôle basal de l'endothélium et provoque une vasodilatation du muscle lisse pariétal. Il intervient également dans le contrôle des plaquettes avec une action anti-agrégante (144). Son action vasodilatatrice est médiée par la réduction de la concentration intracellulaire de calcium dans les CML en réponse à l'activation de la GMP cyclase par le NO . Le NO au niveau vasculaire diminue également l'expression des molécules d'adhérence, atténue la production de cytokines pro-inflammatoires, diminue le recrutement des leucocytes, inhibe la prolifération des CML et s'oppose à l'apoptose. Au niveau vasculaire, le NO est produit par les NO synthases (NOS) endothéliales (eNOS ou NOS III) et inducibles (iNOS ou NOS II) (145). La NOS est une protéine homodimérique avec au cœur une structure hémique (figure 9). Le donneur d'électrons est le NADPH. Son substrat est la L-arginine à partir de laquelle, en présence de son cofacteur, la tétrahydrobioptérine (BH_4), elle peut produire du NO et de la citrulline. La restauration du BH_4 sous sa forme réduite est réalisée grâce à l'acide ascorbique.

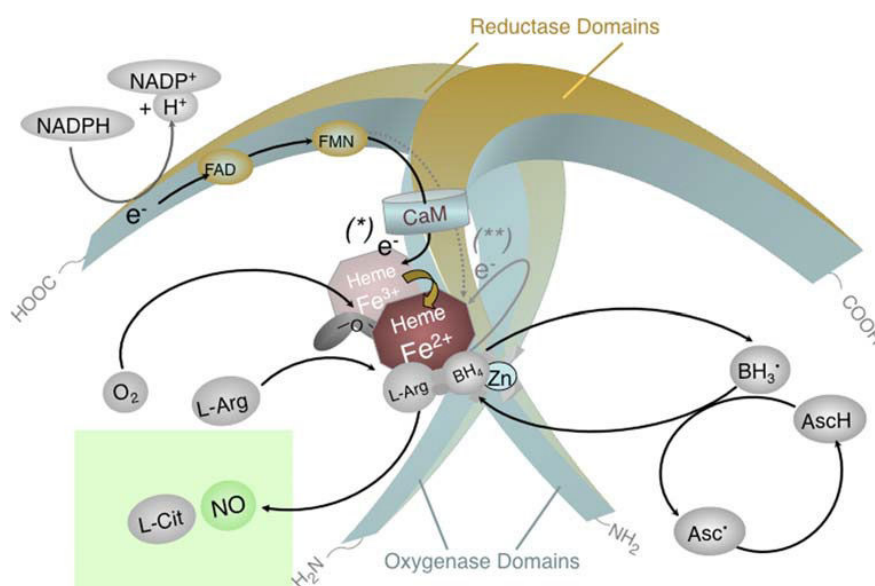


Figure 9 : Biosynthèse du NO par la NOS (23)

L'activité de la NOS III présente de nombreux régulateurs. La biodisponibilité de son substrat, la L-arginine ainsi que celle de ses cofacteurs (NADPH, FAD, FMN and BH_4) est un élément central (146). De plus, de nombreux sites de phosphorylation interviennent dans la régulation de son activité. La NOS III est d'autant plus active qu'elle est phosphorylée par une sérine kinase (en position Ser 1177) telle qu'Akt, l'AMPK ou la PKA, induisant une

augmentation de production de NO . A l'inverse, la phosphorylation sur la thréonine 495 de la NOS III, probablement par la PKC, diminue son activité.

Bien qu'élément principal de la vasodilatation, le NO n'est pas le seul médiateur de vasodilatation. En effet, la prostacycline PGI_2 a également une action vasorelaxante sur le muscle lisse sous-jacent via l'AMPc.

4.1.3.1.2. *Les agents vasoconstricteurs*

L'endothéline-1 (ET-1) induit la contraction des CML. L'ET-1 exerce également des effets pro-inflammatoires en activant les macrophages qui libèrent ainsi $\text{IL1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, IL6 ou IL8 (147-149). Elle favoriserait également le stress oxydant en augmentant l'expression de la NADPH oxydase (150). La prostaglandine endoperoxyde H_2 (PGH_2) a également une action vasoconstrictrice tout comme le facteur hyperpolarisant endothélial (EDHF) qui peuvent tous deux être produits par les cellules endothéliales.

4.1.3.2. *Les cellules musculaires lisses*

Les cellules musculaires lisses (CML) ont pour fonction principale la régulation du tonus musculaire et du diamètre des vaisseaux sanguins par leur capacité de contraction. L'entrée de calcium, donc la concentration de calcium intra-cellulaire, est un régulateur puissant de l'activité contractile des CML (151, 152). Ces dernières participent également activement au remodelage matriciel des artères, équilibre entre la dégradation assurée par les métalloprotéases matricielles (MMP) et la synthèse de la MEC. Pour assurer ces différentes fonctions, les CML présentent une grande plasticité et ont donc des phénotypes très variables (153). Les types de CML diffèrent par leur morphologie, les gènes qu'ils expriment, leur potentiel de prolifération et leur propriété de migration. Le phénotype le plus courant est le phénotype « contractile » qui permet d'assurer le maintien du tonus vasculaire. Sur le plan morphologique, ces CML sont allongées et fusiformes. Les CML de phénotype « synthétique » assurent les fonctions de prolifération, de synthèse et de migration des CML. Elles sont d'aspect épithélioïde et de forme polygonale. Elles contiennent de nombreuses organelles indispensables à leur fonction de synthèse. Ces différents phénotypes s'observent dans les différents vaisseaux aussi bien qu'à l'intérieur d'un même vaisseau. Entre ces deux extrêmes se situent nombre de phénotypes intermédiaires. Le passage du phénotype contractile vers synthétique est courant et peut être induit par de nombreux médiateurs tels que PDGF, $\text{TGF}\beta$, l'activine A, les rétinoïdes, l'angiotensine II ou le $\text{TNF}\alpha$. Ce « switch phénotypique » interviendrait dans les pathologies du vaisseau.

Les CML sont également à l'origine de la production de la prostacycline I_2 (PGI_2) par les PGI_2 synthase comme la COX-2. Dans un contexte de dysfonction endothéliale majeure, en particulier d'inflammation systémique, elle est libérée pour maintenir une vasodilatation suffisante (154).

4.1.3.3. *La matrice extra-cellulaire*

La matrice extra-cellulaire (MEC) joue un rôle prépondérant dans les propriétés des artères. Elle est composée d'élastine, de fibres de collagène, de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes et de glycoprotéines de structure.

4.1.3.3.1. *L'élastine*

L'élastine est une protéine non glycosylée, fortement hydrophobe principalement présente dans les artères de gros calibre. Elle est synthétisée par les CML et les cellules endothéliales par polymérisation de tropoélastine. Son renouvellement est très long car sa demi-vie est de l'ordre de 50 ans. Elle joue un rôle prépondérant dans la compliance de la paroi de l'artère car elle est le constituant majeur des fibres élastiques (avec également des microfibrilles de fibrilline). L'élastine peut représenter jusqu'à 40% des artères de conduction (155). Il a été montré que le contenu en élastine des artères diminuait avec l'âge (156).

4.1.3.3.2. *Les collagènes*

Il existe 28 types de collagènes différents. L'unité de base est le tropocollagène composé de trois chaînes en triple hélice. Les types de collagène sont variables selon les structures. Dans la média, on retrouve essentiellement les collagènes de types I, III et V (collagènes fibrillaires, garant de la résistance de la paroi artérielle) associés à du collagène non fibrillaire comme le collagène de type IV qui forme les lames basales. Ces fibres de collagène permettent le maintien de la résistance mécanique de l'artère.

4.1.3.3.3. *Les protéoglycanes*

Dans la média, on retrouve essentiellement la décorine, le perlécan et le versican. Ces molécules anioniques assurent l'hydratation du tissu et participe à la déformabilité de la paroi.

4.1.3.3.4. *Les glycosaminoglycanes*

Ce sont des polysaccharides plus ou moins glycosylés et sulfatés. Parmi eux, on note la chondroïtine, l'acide hyaluronique, la dermatane sulfate, l'héparane et l'héparine sulfate, la kératane sulfate.

4.1.3.3.5. *Les glycoprotéines de structure*

Elles permettent les interactions entre les différents composants de l'artère. La laminine est formée de trois chaînes polypeptidiques reliées par des ponts disulfures. Les fibronectines constituent une famille hétérogène de glycoprotéines issues de l'épissage alternatif d'un gène commun. Ces deux types de molécules sont en grande partie responsables de la cohésion de la paroi artérielle. L'entactine et le nidogène, glycoprotéines sulfatées, complètent la MEC.

4.2. Le vieillissement artériel

Le vieillissement cardiovasculaire est la conséquence de plusieurs mécanismes chronologiques et intimement intriqués. La première étape de l'atteinte cardiovasculaire est la dysfonction endothéliale, puis intervient le remaniement de la matrice et plus tardivement la calcification de la média.

4.2.1. La dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale correspond à une inadaptation de l'endothélium à son rôle par une diminution de la biodisponibilité du NO , une augmentation du stress oxydant, une augmentation de l'expression des molécules pro-inflammatoires et pro-thrombotiques, conduisant à une vasoréactivité anormale (157). Cette dysfonction endothéliale constitue la première étape de l'atteinte cardio-vasculaire.

4.2.1.1. *L'augmentation du stress oxydant et la diminution de la biodisponibilité du NO*

Le stress oxydant tient un rôle important dans la survenue de la dysfonction endothéliale (158, 159). Dans la cellule endothéliale, les producteurs d'ERO sont nombreux : la xanthine oxydase, le découplage de la eNOS, les cyclooxygénases et surtout la phosphorylation oxydative par la mitochondrie (160). Cependant, la NADPH oxydase (NOX) joue un rôle prépondérant au niveau vasculaire. Il s'agit de flavo-enzymes qui catalysent la réduction de l'oxygène pour produire des radicaux superoxydes (Figure 10). Il en existe cinq isoformes (NOX 1 à 5), en fonction de leur localisation. Les deux isoformes les plus importantes pour le système cardio-vasculaire sont la NOX1, présente dans les CML, et la NOX4, exprimée dans le cœur, les cellules endothéliales, les CML et les fibroblastes (161). Les principales sous-unités de ces NOX sont p22-phox, p40-phox, p47-phox, p67-phox, et Rac.

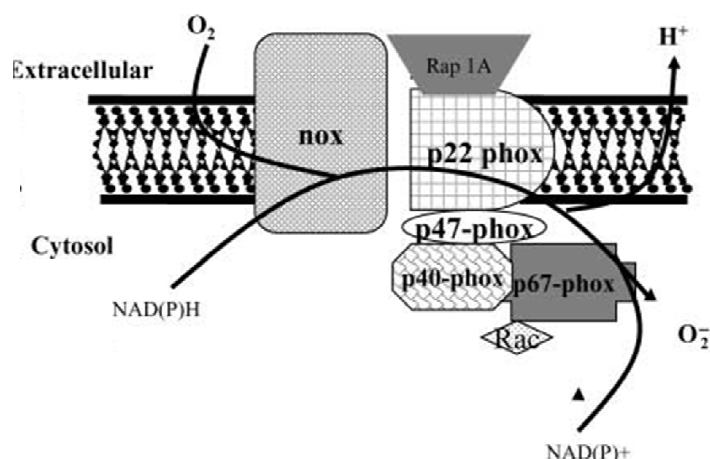


Figure 10 : La NADPH oxydase (161)

Le stress oxydant issu de l'activité de ces NOX a plusieurs conséquences. D'une part, les radicaux superoxydes $O_2^{\cdot-}$ forment, avec le $\cdot NO$, des peroxynitrites ($ONOO^-$) participant à la diminution de la biodisponibilité du $\cdot NO$. Par ailleurs, ces peroxynitrites et le stress nitrosant plus généralement sont responsables de la nitrosylation des protéines, participant ainsi à la dysfonction endothéliale (162). Les peroxynitrites interviennent également dans la régulation de l'activité de la NOS III en stimulant sa phosphorylation inactivatrice sur la sérine 1179 (163). Les peroxynitrites, et plus généralement les ERO, régulent l'activité de la NOS à plusieurs autres niveaux. En effet, la L-arginine, le substrat des NOS, est également celui de l'argininase, présente dans les cellules endothéliales. L'activité de cette enzyme est augmentée par les peroxynitrites ($ONOO^-$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), participant à la diminution de la synthèse du $\cdot NO$ (164). Les ERO contribuent également à l'oxydation de la tétrahydrobioptérine (BH_4), le cofacteur des NOS, en trihydrobioptérine (BH_3), diminuant les capacités de synthèse du $\cdot NO$. La supplémentation en BH_4 est donc une option pour réduire la dysfonction endothéliale comme démontré tant sur des modèles animaux (165, 166) que chez l'Homme (167). La PKC intervient également dans la diminution d'activité de la NOS par une phosphorylation inactivatrice sur la thréonine 495. Avec l'âge, la biosynthèse du $\cdot NO$ par la NOS III est ainsi diminuée (168).

Enfin, le stress oxydant participe au découplage de la NOS, en augmentant la concentration d'asymétrique diméthyl-arginine (ADMA) produite par la DDAH2 (169). Ce découplage de la NOS, également favorisé par le déficit en BH_4 , aboutit à une modification de son activité et conduit à la formation des radicaux superoxydes à la place du $\cdot NO$, participant ainsi à la production des ERO et à l'auto-entretien du stress oxydant vasculaire (170).

Comme évoqué précédemment, la diminution des capacités anti-oxydantes intervient également dans l'augmentation du stress oxydant.

4.2.1.2. *L'augmentation de l'action de l'endothéline 1*

Les effets de l'endothéline 1 (ET-1) avec le vieillissement sont soumis à controverse. Certains auteurs ont montré une diminution de la réponse avec l'âge (171, 172) ; d'autres décrivent une absence de modification sur l'aorte de rat âgé (173). Cependant, l'augmentation de la concentration d'ET-1 ainsi que l'augmentation de l'expression de ses récepteurs a été mise en évidence dans plusieurs atteintes vasculaires liées au vieillissement (174, 175). L'expression de l'ET-1 est sous la dépendance de facteurs de transcription tels que AP-1, HIF-1, NFκB, NFAT ou encore GATA-2 et GATA-4 (176). La réponse à l'ET-1 est augmentée dans les coronaires de rats âgés (177). Son expression a été montrée comme étant augmentée dans plusieurs modèles de vieillissement (178). L'action vasoconstrictrice de l'ET-1 serait liée à son interaction avec les NADPH oxydases. En effet, l'activation du récepteur ET-A à l'ET-1 conduirait à une augmentation de la concentration intra-cellulaire de calcium par la stimulation des canaux calciques de type L, aboutissant à l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase (179). L'action de l'ET-1 passerait également par une augmentation de médiateurs inflammatoires tels que l'IL1, l'IL6, TNFα, l'adhérence des cellules (180).

4.2.1.3. *L'insulino-résistance*

L'insulino-résistance est également impliquée dans la dysfonction endothéliale (181). En effet, la voie PI3K de l'insuline favorise la production de [•]NO (182). Cette voie aboutit, entre autres, à la phosphorylation d'Akt, une des sérine kinases responsable de la phosphorylation activatrice de la NOS III sur la sérine 1177. En parallèle, la voie de la MAPK est impliquée dans la régulation de la sécrétion de l'endothéline-1, ainsi que PAI-1, VCAM-3 et E-selectine. Dans un contexte d'insulino-résistance, la voie de la PI3K est diminuée alors que celle de la MAPK est conservée voire même accentuée, participant à la dysfonction endothéliale en diminuant la biodisponibilité du [•]NO et en augmentant les effets de l'ET-1 (183, 184). L'ET-1 interviendrait également dans l'insulino-résistance en interférant dans la phosphorylation d'IRS-1, en diminuant la translocation de GLUT4, donc la captation du glucose, et en réduisant l'activité de la voie de la PI3K (185-187) et favorisant ainsi la voie MAPK. L'ensemble de ces mécanismes est résumé dans la figure 11 ci-après.

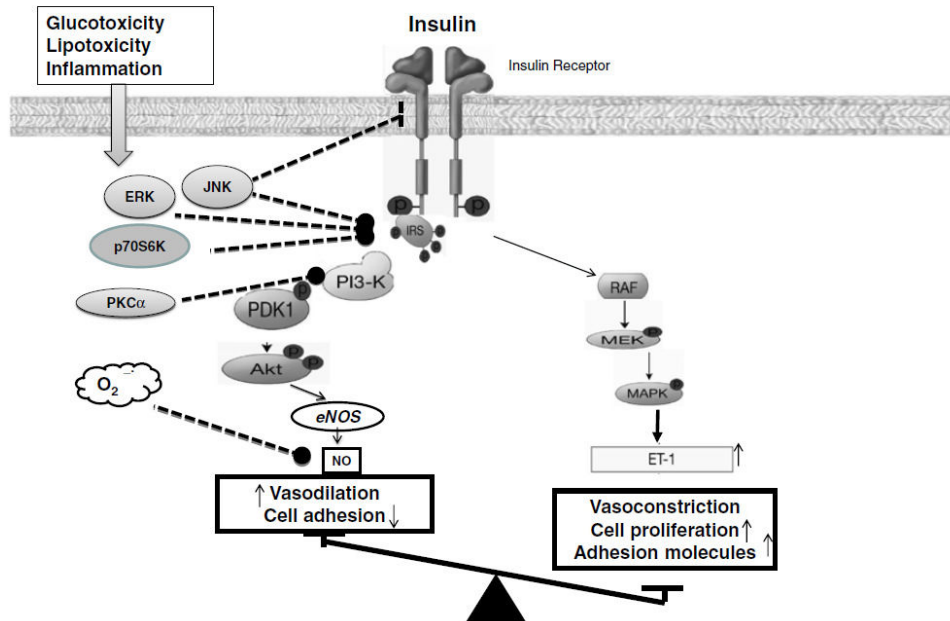


Figure 11 : Effet de la signalisation de l'insuline sur les artères (188)

4.2.2. Le remaniement de la matrice extra-cellulaire

La MEC est un élément essentiel aussi bien pour l'artère saine que pathologique. Elle assure la cohésion de la paroi artérielle et intervient dans la croissance et la différenciation cellulaires. Sa qualité dépend de l'équilibre entre les processus de synthèse par les cellules pariétales et de dégradation par différents systèmes d'enzymes protéolytiques, aboutissant à un renouvellement très lent de cette MEC. Parmi les enzymes qui interviennent dans la dégradation de la MEC, on note la plasmine, les sérine protéases leucocytaires, la phagocytose et les métalloprotéases matricielles (MMP).

La voie du plasminogène passe par son activation en plasmine grâce à l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA) ou tissulaire (au t-PA). La plasmine présente également des inhibiteurs aussi bien plasmatiques ($\alpha 2$ macroglobuline, $\alpha 1$ anti-protéase, $\alpha 2$ anti-plasmine) que cellulaires (PAI-1 et PAI-2). Les sérine protéases comme l'élastase et la cathepsine G clivent entre autres le collagène IV, la fibronectine et l'héparane sulfate. La phagocytose pourrait également avoir un rôle dans la dégradation de la MEC. Chez l'Homme, 16 MMP différentes sont répertoriées ; elles ont en commun de nombreuses caractéristiques car elles sont issues d'un gène ancestral unique. La structure est commune avec un ion zinc dans le domaine catalytique. Elles ont pour rôle de dégrader la MEC à pH physiologique. On distingue six groupes de MMP selon leur activité protéolytique, résumés dans le tableau II.

Tableau II : Les métalloprotéases matricielles

	Mécanisme	Autre nom	MMP	Actions et substrats
Gélatinases (ou collagénases de type IV)	Clivage in vitro du collagène dénaturé, mais moins efficaces sur le collagène IV (composant principal des membranes basales)	Gélatinase A	2	Gélatine, collagènes IV, V, VII, X, XI, élastine, fibronectine, protéoglycanes,
		Gélatinase B	9	Gélatine, collagènes IV et V, élastine, fibronectine, protéoglycanes
Collagénases	Clivage de la triple hélice du collagène natif (I, II et III)	1 (= interstitium)	1	Collagènes I, II, III, VII, X, gélatine, protéoglycanes
		2 (= leucocyte)	8	Collagènes I, II, III et protéoglycanes
		3	13	Collagènes I, II et III (essentiellement dans les processus tumoraux)
Stromélysines	Dégradation puissante en particulier pour les protéoglycanes	1	3	Protéoglycanes, fibronectine, laminine, élastine, gélatine, collagènes II, IV, V, IX, X
		2	10	Protéoglycanes, fibronectine, laminine, élastine, gélatine, collagènes II, IV, V, IX, X
		3	11	Gélatine, fibronectine, protéoglycanes
Matrilysines	Dégradation de la presque totalité des composants de la MEC	1	7	Gélatine, fibronectine, laminine, collagène IV, protéoglycanes (expression essentiellement
		2	27	
Métalloélastase			12	Elastine, collagène IV, fibronectine, vitronectine, laminine
Métalloprotéases membranaires	Dégradation de la progélatinase A, pour faciliter les phénomènes de migration cellulaire.	MT-1-MP	14	Collagène I, II, III, fibronectine, vitronectine, laminine, MMP-2, MMP-13
		MT-2-MP	15	Laminine, fibronectine, MMP-2
		MT-3-MP	16	MMP-2
		MT-4-MP	17	MMP-2
		MT-5-MP	24	MMP-2

L'activité des MMP est régulée à trois niveaux. Leur expression dépend de nombreux médiateurs inflammatoires (IL1, PDGF, TNF α , ...). Leur activation se fait en cascades (189). En effet, les MMP sont synthétisées puis sécrétées sous forme de zymogènes qui sont activés par protéolyse par une sérine protéase, une autre MMP déjà active ou par des métaux inorganiques. Enfin, leur inhibition spécifique est assurée par les TIMP, (TIMP-1 à TIMP-4), qui bloquent le site catalytique des MMP et inhibent ainsi leur activité. Dans le cadre de l'exploration des mécanismes du vieillissement, les principaux éléments régulateurs de la MEC sont les MMP-2 et 9, qui peuvent être activées par les radicaux libres, ainsi que TIMP-1, le principal inhibiteur.

La dysfonction endothéliale et ses facteurs, aussi bien que le remaniement de la matrice concourent à la survenue de deux grands types d'atteintes calcifiantes : l'athérosclérose et l'artériosclérose.

4.2.3. L'athérosclérose

L'athérosclérose est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibres consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôt calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la média (définition OMS 1954). Elle peut atteindre tout le réseau artériel mais touche principalement les coronaires et les artères irriguant le cerveau et les membres inférieurs. Son évolution est lente. De nombreux paramètres sont impliqués dans l'athérogenèse, les plus importants étant l'hypercholestérolémie et l'inflammation. On cite également l'hypertension artérielle, l'hyperhomocystéinémie, le tabagisme, le diabète ou l'obésité (190). Le stress oxydant jouerait également un rôle prépondérant dans ce processus (191, 192). En effet, les ERO produits par la NADPH oxydase vasculaire en particulier interviendraient dans l'adhésion et la migration des monocytes et macrophages, dans la prolifération des CML et fibroblastes ainsi que dans le remodelage de la matrice (193).

La strie lipidique est la première étape de la formation de la plaque d'athérome. Elle est réversible et commence dès l'enfance. Il s'agit de l'infiltration passive sous-endothéliale de lipoprotéines de faible densité (LDL-cholestérol). Ce processus est directement en relation avec leur concentration sanguine. Ces LDL subissent des modifications chimiques, en particulier une oxydation, formant des LDL-oxydées. Elles sont responsables du recrutement des monocytes sanguins au niveau de l'intima. Ces derniers évoluent en macrophages qui phagocytent d'autres LDL-oxydées formant ainsi des cellules spumeuses. Ces cellules sont également responsables d'une libération de cytokines pro-inflammatoires qui participent au

recrutement d'autres monocytes circulants (auto-amplification), via des molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1, P-selectine), à l'attraction et à la prolifération des CML de la média vers l'intima et à la dégradation de la MEC par les MMP.

La plaque d'athérome simple, l'étape suivante, est constituée d'un centre lipidique (cellules spumeuses, macrophages, CML et lymphocytes) puis d'une chape fibreuse (fibroblastes, collagène fibrillaire, protéoglycanes, élastine et CML) qui rigidifie la lésion. Elle est responsable d'un épaissement focal de l'intima. La couche endothéliale qui la recouvre est encore saine et la plaque stable.

Le mécanisme de formation et l'évolution de la plaque d'athérome sont représentés dans la figure 12.

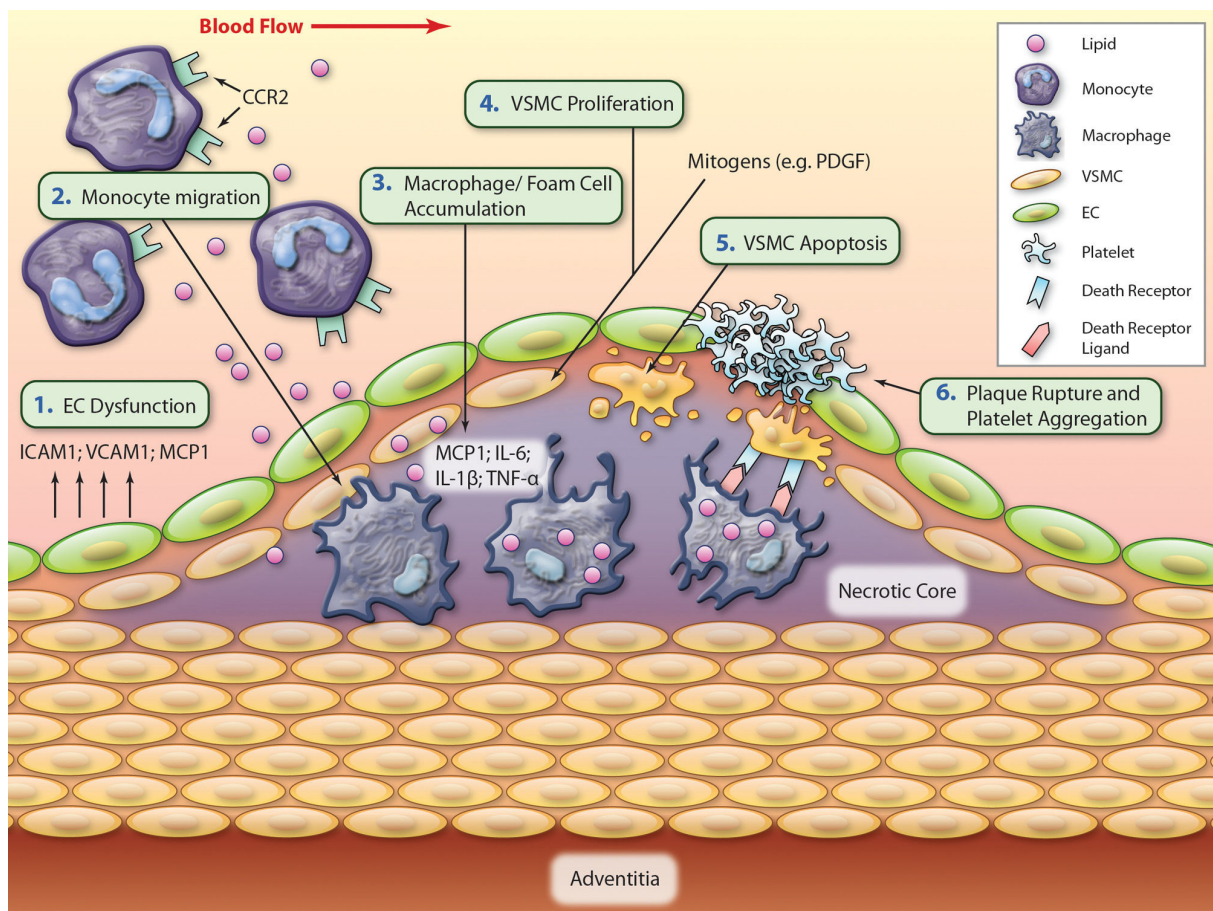


Figure 12 : Formation et évolution de la plaque d'athérome (194)

Cette strie lipidique évolue ensuite vers la lésion fibrolipidique puis la lésion compliquée, qui pourra aller jusqu'à la thrombose.

L'American Heart Association (AHA) a ainsi défini une classification de l'athérosclérose en 6 stades lésionnels successifs (195).

Tableau III : Classification histologique de l'athérosclérose (American Heart Association) (d'après (195))

STADES	CARACTERISTIQUES
I	Rares cellules spumeuses dans l'intima des artères de gros et moyen calibres, visibles uniquement en microscopie
II	Accumulation de petits amas de cellules spumeuses dans la couche superficielle sous-endothéliale de l'intima des artères = strie lipidique
III	Accumulation de lipides extracellulaires en faible quantité sous les cellules spumeuses
IV	Première lésion dite avancée : formation du centre lipidique
V	Plaque fibrolipidique (définition OMS) : centre lipidique + chape fibreuse + cellules endothéliales
Va	Plaque fibrolipidique classique
Vb	Plaque fibrolipidique + calcifications
Vc	Plaque fibreuse (absence ou quasi-absence de centre lipidique)
VI	Plaque d'athérosclérose compliquée
Via	Ulcération : perte de substance en surface de la plaque
VIb	Hématome intra-plaque : collection sanguine, en particulier au niveau du centre lipidique de la plaque
VIc	Thrombose : perte du revêtement endothélial anti-thrombotique

4.2.4. L'artériosclérose

L'artériosclérose correspond à une rigidification et un épaississement de la paroi artérielle. Elle se situe au niveau de la média et touche l'ensemble de l'arbre artériel. Elle se manifeste entre autres par une augmentation de l'épaisseur intima-média (EIM) (196). L'hyperplasie cellulaire serait le phénomène principalement impliqué dans ce processus en association avec une augmentation du tissu conjonctif (197). Cet épaississement de la média s'accompagne d'une perte progressive d'élasticité résultant à la fois de la dégradation de l'élastine et de sa calcification, deux mécanismes qui sont intimement liés.

L'élastolyse est responsable de la dégradation des lamelles d'élastine (198). Cette fragmentation de l'élastine augmente avec l'âge dans l'aorte humaine (199). Elle est à l'origine de la libération des produits de dégradation de l'élastine, qui participent à l'amplification de l'élastolyse par l'activation en particulier de la MMP-2 (200). Ils exercent un rôle chimiotactique et pro-prolifératif vis-à-vis des fibroblastes et des CML (201-203).

L'élastolyse est également un des facteurs déclenchant de la calcification de la média, l'élastocalcinose. Elle est la conséquence d'un déséquilibre entre les facteurs pro- et anti-calcifiants, conduisant à une augmentation liée à l'âge des concentrations de calcium et phosphore dans les artères (204, 205). Les peptides solubles dérivés de l'élastine, issus de la lyse par les MMP favorisent ce processus (206) en induisant la transformation de CML et de fibroblastes vers le phénotype pro-ostéoblastique (207-209). Ainsi, le traitement par des inhibiteurs de MMP atténuerait la calcification aortique dans un modèle de rat traité par la vitamine D₃ (210). L'hyperphosphatémie est également impliquée dans les phénomènes de calcification car elle favorise le changement de phénotype des CML (qui acquièrent alors un profil ostéochondrogénique) et l'induction de leur apoptose (211, 212). Ces cellules ostéoblastes-like synthétisent alors de nombreuses protéines régulatrices de l'activité d'ostéogenèse comme les phosphatases alcalines, l'ostéopontine, l'ostéocalcine, (213) et possèdent de nombreux marqueurs à leur surface, tels que Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2), run-related transcription factor 2 (Runx2) (214), ou la MMP-2 (215). Les phosphatases alcalines exercent leur rôle pro-calcifiant en lysant le pyrophosphate inorganique, inhibiteur de calcification, en phosphate inorganique et amplifient ainsi le phénomène de calcification. BMP-2 est activée par les ERO et interviendrait également dans le processus de calcification (216). La Matrix Gla-Protein (MGP) inhibe le signal de BMP-2 et exerce donc un rôle anti-calcifiant (217, 218). Son action est indispensable à l'inhibition de la calcification vasculaire comme en témoigne le modèle murin MGP^{-/-} (219). En plus du pyrophosphate et de la MGP, l'ostéoprotégérine (OPG) aurait également un rôle inhibiteur de calcification vasculaire (220). Bien que ce système soit particulièrement décrit dans le remodelage osseux, il interviendrait également dans les mécanismes de calcification vasculaire. En effet, des souris inactivées pour l'OPG présentent, en plus de leur phénotype osseux ostéoporotique, une calcification artérielle massive (221). Au niveau osseux, l'OPG intervient dans le système RANK-RANKL-OPG. RANKL, synthétisé par les ostéoblastes, fait partie de la famille du TNF α . Sa liaison à son récepteur RANK sur les précurseurs ostéoclastiques les active conduisant à une augmentation de l'ostéorésorption. L'ostéoblaste synthétise et libère l'OPG, ligand leurre de RANKL, conduisant à une diminution d'activation des ostéoclastes et de l'ostéorésorption.

Ces phénomènes de calcification de la média sont responsables d'importantes conséquences cardiovasculaires comme résumé dans la figure 13. Cette calcification conduit à une dilatation des artères et leur rigidification, et donc à une augmentation de la pression pulsée. Cette

dernière est directement en cause dans certains des mécanismes d'altérations de la fonction cardiaque.

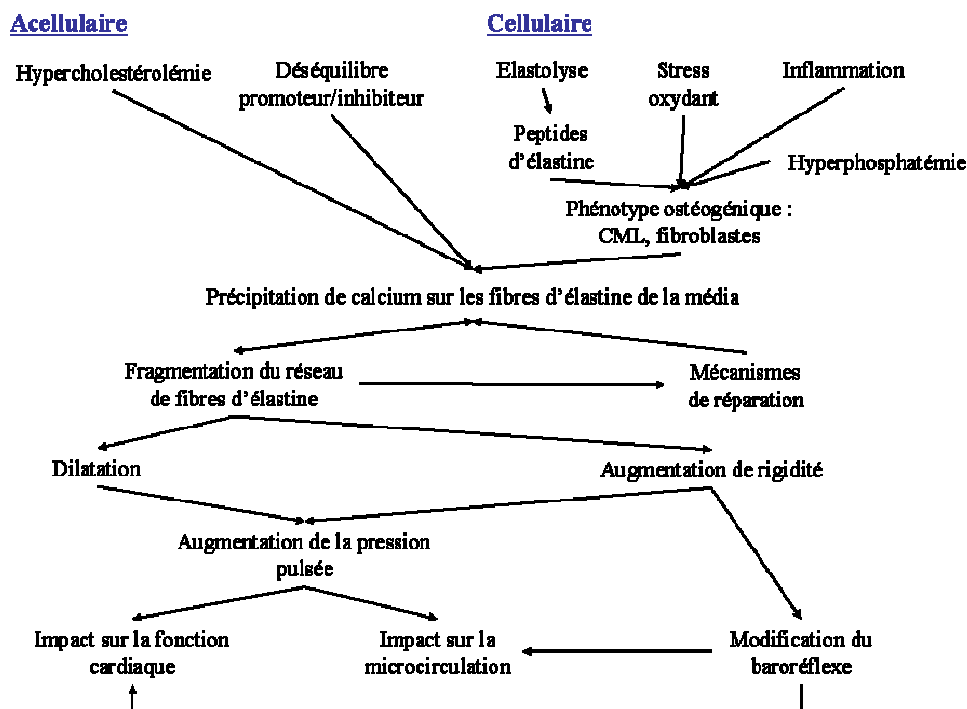


Figure 13 : Mécanisme de formation de l'artériosclérose et ses conséquences (d'après(222))

4.3. L'atteinte cardiaque liée au vieillissement artériel

Le cœur constitue la continuité de l'arbre artério-veineux. Les atteintes artérielles liées au vieillissement décrites précédemment ont donc naturellement des répercussions sur la fonction cardiaque. L'insuffisance cardiaque constitue une des conséquences majeures de ces atteintes. L'étude Framingham a montré une augmentation de sa prévalence avec l'âge (223). Aux Etats-Unis, elle touche 3 à 20 individus pour 1000 dans la population générale, mais atteint 100 pour 1000 chez les plus de 65 ans (224). L'incidence annuelle varie entre 1 et 5 pour 1000 individus et l'incidence relative double tous les dix ans à partir de l'âge de 45 ans. Plusieurs phénomènes concourent à cette augmentation de prévalence : les risques biologiques associés au vieillissement, l'exposition prolongée aux facteurs de risque cardiovasculaire par l'augmentation de l'espérance de vie, et l'association accrue des comorbidités avec l'âge (225).

Plusieurs définitions de l'insuffisance cardiaque se sont succédées. La plus ancienne date de 1933 ; l'insuffisance cardiaque correspond alors à une condition pour laquelle le cœur n'arrive

pas à décharger son contenu dans les conditions adéquates (Thomas Lewis). Les définitions les plus récentes, comme celle de la société européenne de cardiologie en 1995, la définissent par ses symptômes : preuves objectives de dysfonction cardiaque et réponse à un traitement dirigé contre cette insuffisance cardiaque. Cliniquement, l'insuffisance cardiaque est caractérisée par l'association à une tachypnée, une dyspnée, de bronchospasmes et/ou à une toux associée à des œdèmes. Selon l'American Heart Association (AHA) et l'American College of Cardiology (ACC), l'insuffisance cardiaque est un syndrome clinique complexe résultant de désordres fonctionnels ou structuraux cardiaques qui gênent le remplissage ou l'éjection des ventricules (226). L'insuffisance cardiaque a été classée en quatre stades par deux sociétés savantes. La classification AHA est basée sur la clinique et les modifications cardiaques (Tableau IV) :

Tableau IV : Classification de l'insuffisance cardiaque (American Heart Association) (227)

Stade	Description
A	Haut risque de survenue d'atteinte structurale cardiaque
B	Atteinte structurale cardiaque présente, mais asymptomatique
C	Dyspnée, fatigue, congestion associées à une atteinte structurale cardiaque
D	Insuffisance cardiaque réfractaire, inefficacité thérapeutique

La classification New York Heart Association (NYHA) est basée sur les capacités physiques des patients (Tableau V) :

Tableau V : Classification de l'insuffisance cardiaque (New York Heart Association) (227)

Stade	Description
I	Pas de limitation de l'activité physique
II	Limitation modérée de l'activité physique
III	Limitation de l'activité physique marquée, confortable au repos
IV	Activité physique impossible, symptômes même au repos

En plus des modifications cardiaques intrinsèques (fibrose, apoptose des cardiomyocytes, ...) deux causes principales à l'insuffisance cardiaque se dégagent : l'hypertension et l'atteinte des coronaires, toutes deux accrues avec l'âge. Les patients présentant une hypertension ont tendance à développer une hypertrophie ventriculaire gauche concentrique associée à une atteinte diastolique sans modification de la fonction systolique. En revanche, l'atteinte coronaire, et encore plus après un infarctus du myocarde, conduit principalement à une

atteinte ventriculaire gauche à type de cardiopathie dilatée avec une atteinte systolique (diminution de la fraction d'éjection) (225). Ainsi, deux catégories d'insuffisance cardiaque se dégagent : l'insuffisance cardiaque systolique et l'insuffisance cardiaque diastolique avec une fonction systolique préservée (228).

4.3.1. L'insuffisance cardiaque systolique

L'atteinte coronaire est un des facteurs principaux de l'atteinte systolique. L'athérosclérose y joue un rôle prépondérant. En effet, à long terme, l'athérosclérose, par la diminution de compliance de l'aorte, est responsable d'une augmentation de la précharge cardiaque et de la diminution de la pression artérielle diastolique, conduisant à une diminution de la perfusion des artères coronaires, donc du cœur (229). En aigu, l'érosion ou la rupture de la plaque d'athérome, conduisent à une activation de la coagulation, initiée avec les plaquettes et sont donc responsables d'accidents thrombotiques aigus (accident vasculaire cérébral ischémique, ischémie aiguë des membres inférieurs) et en particulier d'infarctus du myocarde, donc un défaut de perfusion du cœur. Si l'âge est un élément important dans ce processus, ce type d'atteinte s'observe malgré tout plus précocement que l'atteinte diastolique.

4.3.2. L'insuffisance cardiaque diastolique

L'atteinte diastolique est plus directement reliée à l'âge que l'atteinte systolique. En effet, l'hypertension en constitue le facteur principal de survenue. Parmi plusieurs phénomènes intervenant dans l'installation de cette hypertension, la rigidification des artères tient une place capitale. En effet, la rigidification de l'aorte et la réflexion accélérée de l'onde de pression qui en découle ont des conséquences sur la pression artérielle avec une augmentation de la pression systolique et de la pression pulsée, conduisant à une altération de la fonction diastolique cardiaque (230, 231). En effet, l'élévation de la postcharge cardiaque associée à une atteinte coronaire liée à la chute de pression artérielle diastolique, conduit à l'hypertrophie ventriculaire (232). Bien que l'augmentation de la masse du ventricule gauche fasse toujours débat (233), l'épaississement des parois myocardiques liée à l'augmentation de la taille des cardiomyocytes semble constante avec surtout une augmentation de l'épaisseur du septum inter-ventriculaire (234). Ceci semblerait lié également à une augmentation de l'apoptose des cardiomyocytes avec l'âge, une augmentation de la quantité de collagène et de la fibrose (235). La diminution du remplissage diastolique du ventricule gauche découlerait de la diminution de compliance diastolique ainsi que de l'augmentation de l'épaisseur du mur ventriculaire gauche.

Tableau VI : Relations entre le vieillissement cardiovasculaire et les pathologies cardiovasculaires (d'après (233))

Changements liés à l'âge	Mécanismes possibles	Pathologies possiblement liées
Augmentation de la rigidité artérielle	Augmentation de la fragmentation de l'élastine (élastase, collagène, ...)	Hypertension systolique
Augmentation de l'épaisseur du mur du ventricule gauche	Augmentation de la taille des cardiomyocytes et diminution de leur nombre, dépôts focaux de collagène	Diminution précoce du remplissage du ventricule gauche en diastole
Altération du tonus vasculaire	Diminution du NO, diminution de la réponse β adrénergique	Rigidification artérielle, hypertension
Diminution de la réserve cardiovasculaire	Augmentation de la charge vasculaire, diminution intrinsèque de la contractilité myocardique, diminution des réponses β adrénergiques	Diminution du seuil pour l'insuffisance cardiaque

Dans le cadre du vieillissement, ces deux phénomènes sont souvent associés avec une atteinte coronaire responsable d'une cardiopathie dilatée et une hypertension artérielle, en particulier une augmentation de la pression pulsée, qui conduit à une hypertrophie concentrique (236).

L'ensemble de ces phénomènes est résumés dans la figure 14 ci-dessous.

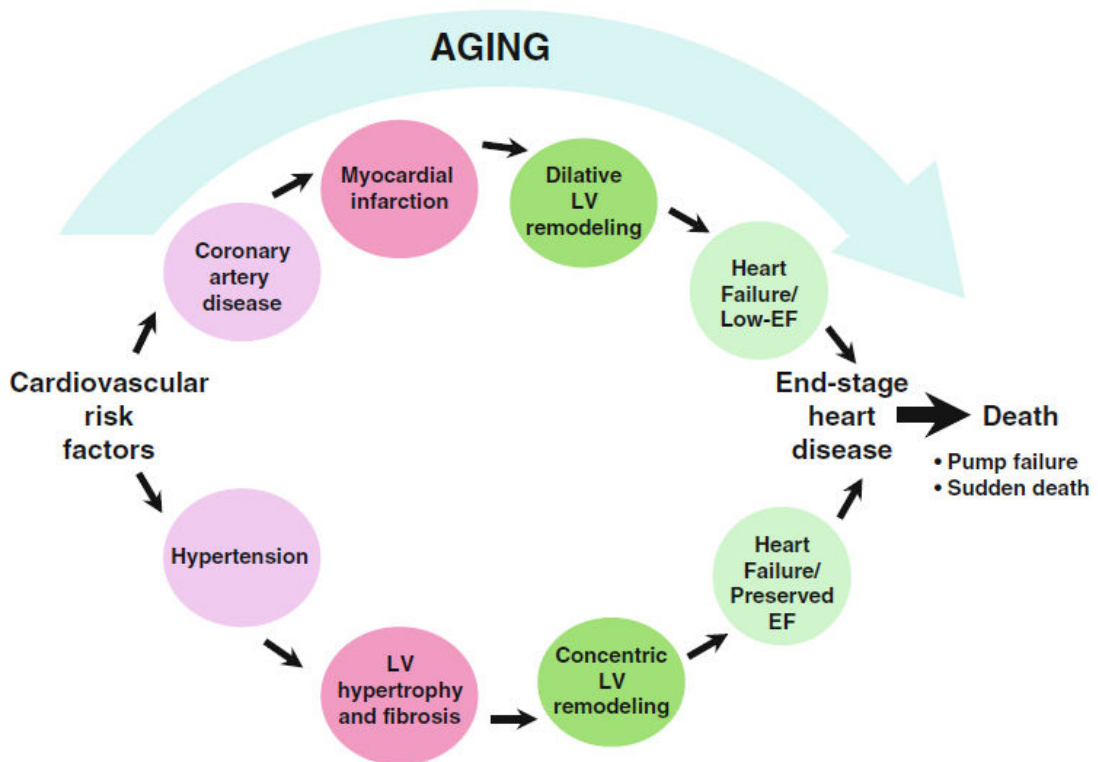


Figure 14 : Continuum vieillissement et atteinte cardio-vasculaire (228)

L'ensemble de ces altérations cardiovasculaires est donc responsable d'insuffisance cardiaque, d'accidents ischémiques en particulier d'infarctus du myocarde ou d'accidents vasculaires cérébraux.

Deuxième partie : Le resvératrol

Connu depuis des siècles dans la médecine chinoise, le resvératrol a été plus récemment redécouvert dans les années 90 dans le contexte du « paradoxe français » (237), avec pas moins de 5800 publications référencées dans Pubmed depuis 1990. Ce sont ses propriétés potentielles dans la prévention des maladies cardiovasculaires et son implication dans l'effet cardio-protecteur du vin rouge qui lui confèrent son intérêt initial (238). Ses propriétés sont nombreuses et ont conduit à un intérêt grandissant autour de cette molécule. Cependant, nous nous intéresserons exclusivement aux propriétés qui peuvent avoir un intérêt dans le cadre de la physiopathologie métabolique et cardiovasculaire.

1. Généralités

1.1. Structure et métabolisme

Le resvératrol, 3,5,4'-trihydroxystilbène, ($C_{14}H_{12}O_3$) présente une structure en $C_6-C_2-C_6$ et une masse molaire de 228,2 g/mol. Deux isomères *cis* et *trans* existent (Cf. figure 15) ; la forme *trans* étant la plus couramment décrite et celle supposée présenter l'activité biologique.

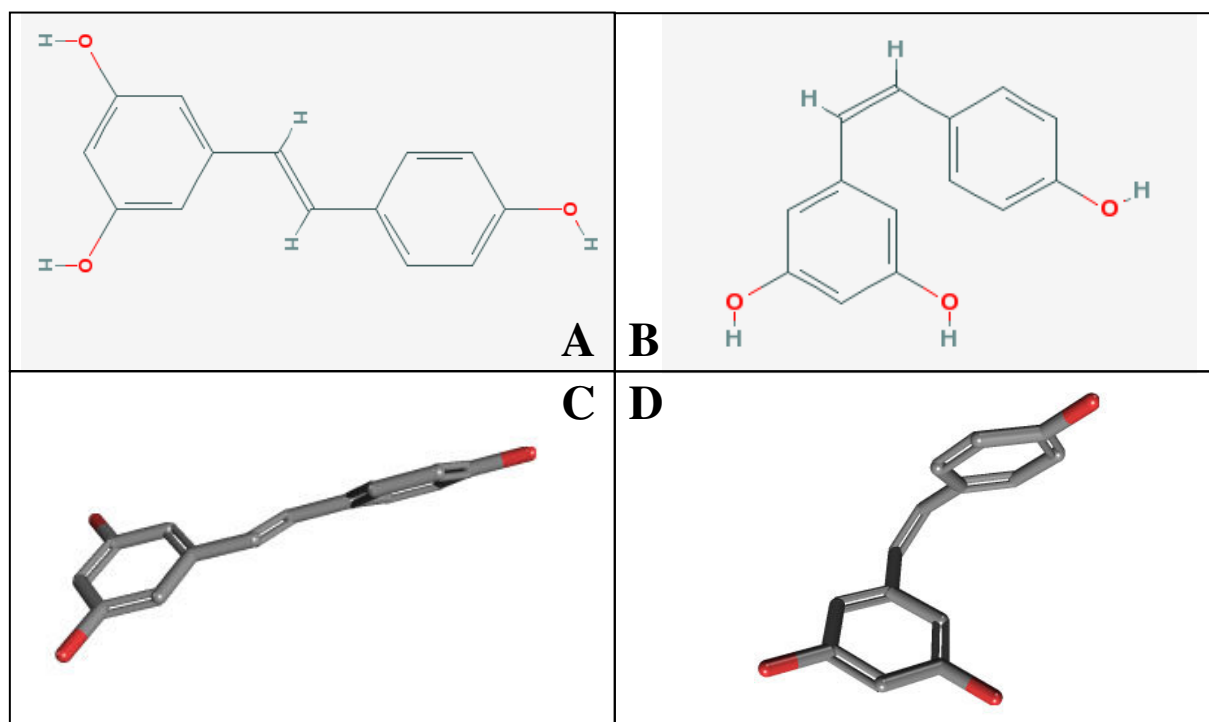


Figure 15 : Structure chimique du resvératrol : A et C : isomère *trans*, B et D : isomère *cis*.

L'isomère *trans* est la forme la plus stable (239) et celle qui est majoritairement retrouvée dans les vins rouges (240, 241). L'isomérisation en forme *cis* se fait par les rayonnements

ultra-violets et donne une molécule peu stable. Le resvératrol est lipophile, ce qui conditionne son absorption digestive, tout comme la présence ou non d'aliments ou l'association à l'alcool. Ce composé est rapidement métabolisé et donne de nombreux dérivés, variables selon les espèces et selon les individus. Son devenir dans l'organisme a été principalement étudié chez l'Homme mais peu chez l'animal (quelques études chez le rat) (242). Le resvératrol est présent au niveau plasmatique majoritairement sous forme liée aux LDL et aux protéines plasmatiques et peu sous forme libre (243). Le cycle entéro-hépatique mis en évidence chez l'Homme et le rat intervient également dans la biodisponibilité de la molécule et sa métabolisation (244). Chez l'Homme, les principaux métabolites sont les dérivés glucoronides et sulfatés.

1.2. Sources

Ce polyphénol a été isolé pour la première fois en 1940 dans la racine de l'hellébore blanc (*Veratrum grandiflorum*). Dans les années soixante, il est ensuite identifié dans la racine de *Polygonum cupsidatum*, utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise et japonaise. On le retrouve également dans de nombreux autres végétaux à des concentrations plus ou moins importantes, tel que les myrtilles, les noisettes, la rhubarbe (Cf. Tableau VII). Cette molécule est présente dans la peau du raisin rouge à raison de quelques microgrammes par gramme de fruit, et dans le vin (quelques milligrammes par litre) où elle serait impliquée, avec d'autres substances, dans le « paradoxe français ». Cette molécule est une phytoalexine car elle est synthétisée par ces plantes en cas d'agression (stress, infections fongiques, radiations ultra-violet, ...).

Tableau VII : Sources alimentaires de trans-resvératrol (d'après (238))

SOURCE	TRANS-RESVERATROL
Racine sèche de rhubarbe	3,9 mg/g
<i>Polygonum cupsidatum</i>	0,524 mg/g
Raisin	0,1 à 3,54 µg/g
Houblon	0,5 à 1,0 µg/g
Cacahuète	0,02 à 1,92 µg/g
Pistache	0,09 à 1,67 µg/g
Myrtille	Jusqu'à 32 ng/g

1.3. Toxicité

Chez l'animal, sa toxicité a été évaluée chez 120 rats à des doses comprises entre 0,3 et 3g/kg/jour *per os* pendant 4 semaines (245). Une néphrotoxicité majeure est observée chez les animaux traités par les doses les plus fortes (démontrée au niveau plasmatique et par

histologie rénale), une atteinte hépatique modérée est également mise en évidence dans ce même groupe (augmentation des transaminases, phosphatases alcalines sans modification histologique hépatique). Avec des doses moindres pendant un mois chez le rat (20 mg/kg/jour), l'équipe de Juan n'a mis en évidence qu'une augmentation isolée des ASAT sans autre modification du bilan hépatique (246). Chez le lapin ou le rat, trois mois de traitement avec des doses de 750 mg/kg/jour n'ont pas conduit à la mise en évidence d'effets toxiques ni d'altérations des fonctions reproductrices (247).

Chez l'Homme, l'utilisation de fortes doses (plusieurs grammes par jour) a été évaluée et n'a pas montré d'effets délétères majeurs. Vaz da Silva rapporte trois événements avec désordre électrolytique mineur, rhinopharyngite et rash érythémateux chez 3 de ses 24 patients avec une administration unique de 400 mg (248). De même, avec 1 gramme, on a pu observer des augmentations mineures de bilirubinémie et de transaminases chez deux des 40 patients (249). Enfin, des prises répétées à des doses de l'ordre de 25 à 150 mg chez 40 volontaires ont révélé quelques migraines, somnolences ou myalgies sans imputabilité réelle (250).

2. Propriétés biologiques

Les propriétés cardio-protectrices du resvératrol sont évoquées dans le « paradoxe français ». En effet, un régime riche en lipides, en particulier en acides gras saturés, associé à une consommation modérée de vin rouge présenterait un faible risque cardiovasculaire. Ce paradoxe pourrait être lié à la présence de polyphénols dans le vin rouge, et en particulier au resvératrol. Cette molécule a de nombreuses propriétés biologiques pouvant expliquer ses effets protecteurs cardiovasculaires : antioxydant, vasodilatateur, anti-agrégant plaquettaire, anti-inflammatoire, améliorant les bilans lipidiques et glycémiques.

2.1. Anti-oxydant

Les propriétés anti-oxydantes du resvératrol ont été largement étudiées et font intervenir différents mécanismes. Le resvératrol peut piéger les radicaux libres, comme les vitamines C et E, mais est plus puissant qu'elles sur les radicaux peroxydes lipidiques (251). Son action sur les radicaux $\cdot\text{OH}$ et $\text{O}_2\cdot^-$ est également importante et témoigne de son action anti-oxydante directe (252). Il limiterait l'oxydation des LDL, largement impliquées dans l'athérogenèse (253). Le resvératrol exerce également son action anti-oxydante en inhibant la production des ERO. En effet, le resvératrol pourrait inhiber l'action du complexe III de la mitochondrie et ainsi diminuer la production radicalaire liée à la phosphorylation oxydative (254). *In vitro*, il a été montré que le resvératrol à des concentrations de l'ordre du micromolaire diminuerait l'activité d'enzymes productrices d'ERO telles que de la NAD(P)H oxydase, de

l'hypoxanthine/xanthine oxydase, ou de la myéloperoxydase. La propriété principale du resvératrol reste cependant sa capacité à diminuer les ERO et ainsi à améliorer la biodisponibilité du NO . Cette augmentation de la biodisponibilité du NO est probablement à l'origine d'une grande partie de ses propriétés. Par ailleurs, le resvératrol serait également inducteur de systèmes anti-oxydants comme la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion réductase et la glutathion peroxydase (168, 255, 256). La concentration de glutathion serait augmentée dans les cardiomyocytes avec des doses de resvératrol de l'ordre de 25 à 100 μM . A des doses de 100 μM , le resvératrol induirait l'expression génique de la catalase et protégerait contre la cytotoxicité et l'accumulation intracellulaire d'ERO (257).

Malgré ses effets anti-oxydants, le resvératrol peut aussi avoir une action pro-oxydante à des doses plus importantes. En effet, dans le cadre de l'ischémie-reperfusion hépatique des doses de 0,2 mg/kg sont anti-oxydantes, alors que des doses de 20 mg/kg sont pro-oxydantes (258). Effectivement, le groupe phénol de la molécule de resvératrol peut être oxydé par la peroxydase/ H_2O_2 en radical phénoxy (259). Ce phénoxy co-oxyde ensuite le glutathion GSH en glutathion oxydé $\text{GS}^\bullet$, pour ensuite former le radical disulfide $\text{GSSG}^\bullet$. Ce radical disulfide produit ensuite du superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ et GSSG. Ce même effet pro-oxydant a été montré *in vitro* sur l'oxydation des LDL humaines par la peroxydase avec des concentrations de resvératrol de 1 à 10 μM (260).

2.2. Vasodilatateur

Le resvératrol est connu pour être un puissant vasodilatateur de par sa capacité à augmenter la biodisponibilité du NO par une augmentation d'expression de la NOS III dans des artères de souris (261, 262) et une diminution de l'expression de la NADPH oxydase (263). Entre autres mécanismes, il a été montré que le resvératrol pouvait moduler l'activité de la DDAH2, principal producteur d'ADMA, un puissant inhibiteur de la NOS III (264). Certains travaux suggèreraient que l'AMPK, activé par le resvératrol serait responsable de la phosphorylation de la NOS III et de son augmentation d'activité alors que d'autres supportent l'hypothèse que l'activation de la PKA serait impliquée dans ce processus.

2.3. Anti-agrégant plaquettaire

L'agrégation plaquettaire peut être induite par de nombreux activateurs tels que le collagène, l'ADP ou la thrombine. Une agrégation excessive se montre délétère en créant thrombose et athérosclérose (265). Le resvératrol diminuerait l'adhésion au collagène de type I et au fibrinogène (266, 267), l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine (266, 268), le processus de sécrétion (269) ainsi que la synthèse d'eicosanoïdes (266). L'effet anti-oxydant du resvératrol pourrait être une des causes de son activité anti-agrégante, les ERO ayant déjà

été montrés comme des activateurs de l'agrégation plaquettaire (270, 271). Des travaux récents suggèrent que son activité anti-oxydante est responsable de son action anti-agrégante dans un modèle d'hyper-agrégabilité induite par une hyperhomocystéinémie (272). L'augmentation de la biodisponibilité du NO par le resvératrol serait également un paramètre important car il est un puissant anti-agrégant (273). Plus spécifiquement, le resvératrol inhiberait la COX 1, impliquée dans la production du thromboxane A_2 , inducteur de l'agrégation plaquettaire et vasoconstricteur, et déplacerait ainsi l'équilibre thromboxane A_2 / prostacycline (synthétisée par la COX 2) vers les prostacyclines anti-agrégantes et vasodilatatrices (274, 275).

2.4. Anti-inflammatoire

L'inflammation, à bas bruit, intervient également dans le développement des pathologies cardiovasculaires. L'activité anti-inflammatoire du resvératrol a été mise en évidence dans de nombreux modèles aussi bien *in vivo* (arthrite du lapin (276), inflammation du système respiratoire du rat par LPS (277)) qu'*in vitro* (inhibition de la synthèse et de la sécrétion d'IL6 en culture de macrophages (261)). Deux voies de signalisation peuvent expliquer les effets anti-inflammatoires du resvératrol. Pour de nombreux auteurs, l'activité anti-inflammatoire passerait par l'inhibition de NF κ B, facteur de transcription redox sensible, en partie responsable de la synthèse de TNF α , IL6 ou IL1 β (278). L'action du resvératrol passerait par une diminution de la transcription de NF κ B, préférentiellement par son effet anti-oxydant (279). Un autre facteur de transcription, Activator Protein 1 (AP-1), également induit par le stress oxydant, pourrait également être impliqué (280). Enfin, l'inhibition de la COX2 interviendrait également dans l'action anti-inflammatoire du resvératrol (281).

2.5. Effet sur l'homéostasie lipidique

L'hypercholestérolémie est un facteur de risque majeur pour les atteintes cardiovasculaires. Dans le cadre de régime enrichi en lipides, le resvératrol a montré des effets bénéfiques sur la survie globale ainsi que sur le stockage des graisses (282, 283). Dans certains cas, le resvératrol va jusqu'à diminuer la prise de poids et améliorer le bilan lipidique (282, 284, 285). Cependant, ces résultats sur la prise de poids ne sont pas retrouvés dans d'autres études (286, 287). Ses effets ont également été observés sur la masse adipeuse ainsi que sur la stéatorrhée hépatique (288). L'effet direct du resvératrol sur le métabolisme des lipides est controversé. Certaines équipes n'ont pas mis en évidence de diminution des concentrations sériques de cholestérol et/ou de triglycérides par le resvératrol (289, 290). Cependant, d'autres groupes ont montré qu'il pouvait diminuer la synthèse hépatique de triglycérides et

les dépôts de triglycérides et de cholestérol hépatiques (291). L'équipe de Yagasaki a montré que dans un modèle de rat hypercholestérolémique, les concentrations sériques de LDL seraient diminuées par le resvératrol (292). Ses effets anti-athérosclérotiques ont été montrés dans de nombreux modèles animaux (293-295). D'autres études ont démontré un effet bénéfique du resvératrol par une diminution de la peroxydation lipidique des LDL (296) ainsi que par l'inhibition de la capture des LDL oxydés par la paroi vasculaire (297). Les effets bénéfiques du resvératrol sur le plan lipidique pourraient passer par l'activation de PGC1 α via l'activation des sirtuines (298).

2.6. Effet sur l'homéostasie glucidique

Le resvératrol a été montré comme ayant des propriétés anti-diabétiques aussi bien chez la souris que chez l'humain. De plus, le resvératrol pourrait protéger les cellules β pancréatiques (299). De plus, il améliorerait également l'action de l'insuline dans de nombreux modèles animaux aussi bien avec des régimes enrichis en lipides que dans des modèles génétiquement modifiés (282, 283, 300, 301). Son action sur l'insulino-sensibilité passerait par l'adipocyte. En effet, le resvératrol est capable de diminuer la concentration d'ATP dans l'adipocyte (302) conduisant possiblement à un changement de fonction de l'adipocyte. En particulier, le resvératrol semble diminuer la conversion de glucose en lipides dans l'adipocyte, et limiter le stockage des triglycérides (303). Chez l'Homme, des études cliniques ont déjà été entreprises avec le resvératrol dans divers cadres montrant un bénéfice sur l'insulino-sensibilité (304-306). En particulier, le resvératrol induirait des gènes importants dans le maintien des fonctions mitochondriales tels que PGC1 α , qui régule la biogenèse mitochondriale en augmentant le nombre de mitochondries et leurs capacités (282, 283, 300). L'amélioration de l'homéostasie glucidique serait liée à l'activation de l'AMPK qui améliore la captation du glucose et donc la tolérance au glucose tout en inhibant la synthèse hépatique de glucose et de triglycérides (307). Le resvératrol serait à l'origine d'un relargage de catécholamines et/ou de glucagon, aboutissant à une activation de l'adénylate cyclase et ainsi de la transformation d'ATP en AMPc. Le resvératrol pourrait également inhiber l'action de certaines phosphodiésterases qui dégradent l'AMPc en AMP (308, 309). L'augmentation de la concentration intra-cellulaire d'AMPc serait à l'origine de la phosphorylation et de l'activation de l'AMPK (310). Cette activation de l'AMPK conduirait à une augmentation du NAD⁺, favorisant l'action des sirtuines, des histones déacétylases classe III, NAD⁺ dépendantes qui régulent de nombreuses voies de signalisation.

2.7. Mimétique de restriction calorique

Depuis de nombreuses années, il a été largement démontré que la restriction calorique (RC) permettait d'améliorer l'espérance de vie et de diminuer les pathologies liées au vieillissement et en particulier les pathologies cardiovasculaires. Ses bénéfices ont déjà été montrés dans de nombreux modèles animaux allant jusqu'aux primates (311-315). La RC se traduit par une diminution de l'expression de nombreux gènes du métabolisme, conduisant à une diminution de la formation de la plaque d'athérome, de l'inflammation (316), de l'insulino-résistance du tissu adipeux, et plus globalement des effets du vieillissement (317). Un grand nombre de voies de signalisation pourraient être impliquées dans les effets bénéfiques de la RC : SIRT1, IIS/PI3K/Akt, AMPK/mTOR, Erk1/2. Le resvératrol pourrait être un support pharmacologique mimant la RC en activant la voie SIRT1 et/ou AMPK (318). Chez les mammifères, bien que l'induction de certains groupes de gènes soit comparable, le bénéfice d'un traitement par le resvératrol sur l'espérance de vie reste controversé malgré des études très favorables dans de nombreux modèles (283, 318-321). D'autres études ne sont pourtant pas parvenues à démontrer le bénéfice d'un tel traitement (322, 323).

Enfin, l'ensemble de ces propriétés, résumées dans la figure 16, a conduit à mener des études cliniques visant à évaluer les effets du resvératrol sur le système cardiovasculaire ainsi que sur les facteurs de risque associés à ses pathologies.

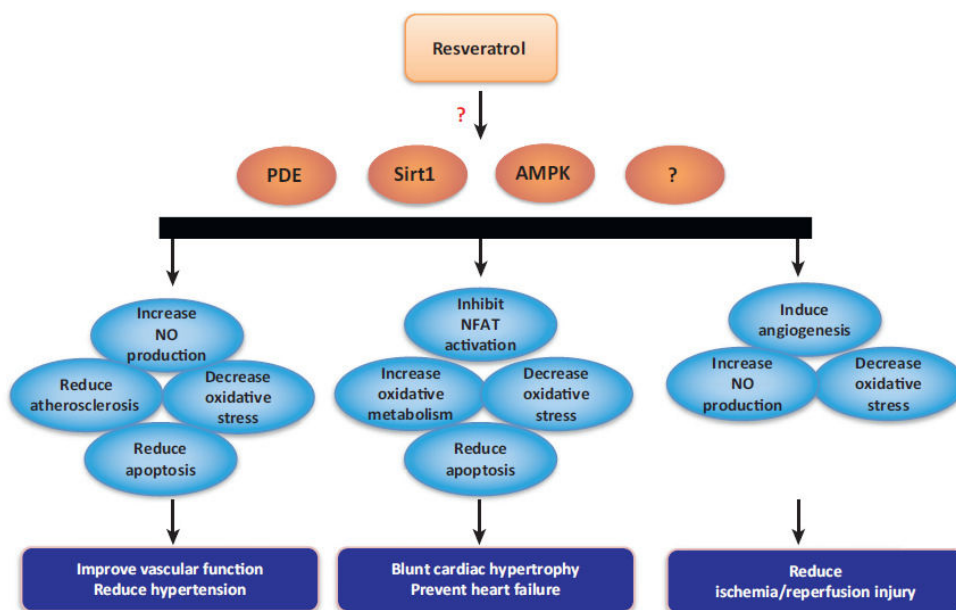


Figure 16 : Effets protecteurs cardiovasculaires du resvératrol (307)

3. Les études cliniques

Actuellement 70 études sont en cours avec des degrés d'avancement divers (Clinical Trials.gov). Les thématiques les plus abordées dans ces études sont en premier lieu l'homéostasie glucidique puis le poids et plus généralement les effets métaboliques du resvératrol. Parmi les 26 études cliniques déjà publiées, dix s'intéressent à l'action métabolique du resvératrol dans un contexte de diabète ou d'obésité pour la plupart et quatre à ses effets cardiovasculaires (Cf. Tableau VIII). Concernant le métabolisme du glucose, les résultats des 10 études qui s'y sont intéressées sont difficilement comparables. En effet, les posologies sont très variables (entre 8 mg et 2,0 g/jr) ainsi que les durées de traitement (entre 1 et 3 mois), les sujets très différents (volontaires sains, obèses, diabétiques de type 2, etc. ...). Du plus, les effectifs sont restreints avec pour le recrutement le plus important 75 individus seulement. Ainsi, certaines études démontrent un bénéfice sur l'insulino-sensibilité (304-306) alors que d'autres non (324-326). D'un point de vue cardiovasculaire, les résultats semblent plus homogènes avec majoritairement des effets bénéfiques dans les trois études qui ont étudié directement la fonction artérielle (324, 327, 328).

La seule étude qui s'intéresse à la population âgée est celle de Crandall (305). Son travail met en évidence un bénéfice du traitement par le resvératrol sur l'homéostasie glucidique et une tendance à l'amélioration des fonctions endothéliales dans ce contexte bien que l'effectif soit très restreint (10 individus). La réalisation d'études visant à évaluer les effets de l'utilisation chronique du resvératrol chez l'animal dans le cadre du vieillissement cardiovasculaire paraît donc indispensable. En effet, évaluer les bénéfices mais également les risques chez l'animal d'un tel traitement constitue une étape obligatoire avant d'éventuels essais thérapeutiques à grande échelle chez l'Homme.

Tableau VIII : Principales études cliniques menées avec le resvératrol (d'après (242))

Auteurs	Participants	Types d'étude	Sujets	Durées	Resvératrol	Effets principaux	Absence d'effet
Bhatt (329)	Diabète de type 2 avec hypoglycémiant oraux	Ouverte, randomisée, contrôlée	21 hommes + 36 femmes indiens	3 mois	250mg 1x /jr	↘ PAS, PAD, HbA1c, LDL	Poids, Triglycéride,
Brasnyo (304)	Diabète de type 2 avec IEC ou ATII	Double aveugle, randomisée, vs. placebo	19 hommes	4 semaines	5 mg 2x/jr	↘ HOMA-IR,	Insulinémie, GLP-1, GIP
Crandall (305)	Sujets âgés intolérants au glucose	Ouverte, randomisée pour les doses assignées	3 hommes + 7 femmes	4 semaines	1,0, 1,5 ou 2,0 g/jr	↘ pic glycémie post-prandial, ↗ sensibilité à l'insuline	Glycémie à jeun, poids, PA, bilan lipidique
De Groote (330)	Obèses	Aveugle, séquentielle, vs. placebo	15 hommes + 17 femmes	1 mois placebo + 1 mois resvératrol	150 mg/1x/jr	↘ GSH	Pouvoir anti-oxydant général
Fujitaka (324)	Syndrome métabolique avec traitement standard	Randomisée	25 hommes + 9 femmes	3 mois resvératrol puis 3 mois sans resvératrol	100 mg/1x/jr	↗ flux dépendante dilatation	Poids, tour de taille, PA, Glycémie à jeun, HOAM-IR, LDL, HDL, TG, HbA1c, IL6, CRP us
Ghanim (331)	Volontaires sains	Randomisée, vs. placebo	20 individus	6 semaines	40 mg/jr	↘ production ERO, ↘ expression p47-phox, liaison NFκB, ↘ TNFα, IL6, CRP	Acides gras libres, insuline, HOMA-IR, TG, cholestérol, LDL, HDL, HOMA-IR, leptine, transaminases, IL1β mononucléaires
Magyar (328)	Patients en prévention secondaire d'infarctus	Double aveugle, randomisé, vs. placebo	26 hommes + 14 femmes	3 mois	10 mg/jr	↗ fonction endothéliale, fonction ventriculaire diastolique gauche, prévient l'agrégation plaquettaire	Numération sanguine, fibrinogène, CRP, HbA1c, TNFα, cholestérol, HDL, TG, PA
Poulsen (326)	Obèses	Double aveugle, randomisée, vs. placebo	24 hommes	4 semaines	500 mg 3x/jr	Légère ↘ ARNm GLUT 4 dans le muscle	Poids, LDL, HDL, TG, leptine, adiponectine, acides gras libres, glycémie, HbA1c, HOMA-IR, insuline, ...

Auteurs	Participants	Types d'étude	Sujets	Durées	Resvératrol	Effets principaux	Absence d'effet
Timmers (306)	Obèses	Double aveugle, croisée, vs. placebo	11 hommes	30 jours	150 mg/jr	⬆ SIRT1, PGC1 α , AMPK, ⬆ HOMA-IR, TG, leptine, TNF α , PAS, PAM,...	Acides gras libres, CRP, IL1 β , IL6, IL8, adiponectine, PAD,
Tomé-Carneiro (332)	Patients sous statine avec un fort risque cardiovasculaire	Triple aveugle, randomisée, bras parallèles, dose-réponse, vs. placebo	34 hommes + 41 femmes	6 mois	8 mg/jr	⬆ LDL, LDL oxydés, ApoB, LDL ox/Apo B, ⬆ non HDL/ApoB	Cholestérol total, TG, HDL, non HDL, fonction hépatique, thyroïde, fonction rénale
Tomé-Carneiro (333)	Patients sous statine avec un fort risque cardiovasculaire	Triple aveugle, randomisée, bras parallèles, dose-réponse, vs. placebo	34 hommes + 41 femmes	1 an	8 mg/jr	⬆ CRP us, TNF α , IL6/IL10, PAI-1, ⬆ IL10, adiponectine à 6 mois uniquement	IL18
Wong (327)	Surpoids/obèse à la limite de l'hypertension artérielle	Double aveugle, croisée, randomisée, vs. placebo	14 hommes + 5 femmes ménopausées	Une prise de chaque dose à une semaine d'intervalle	0, 30, 90 et 20 mg	⬆ dilatation flux dépendante (dose dépendante)	
Yoshino (325)	Non obèse, ménopausée, tolérance normale au glucose	Double aveugle, randomisée, vs. placebo	29 femmes ménopausées	3 mois	75 mg le matin	Complexe kinésine et complexe de l'ubiquitine ligase	Poids, cholestérol, HDL, LDL, TG, insuline, adiponectine, leptine, HOMA-IR, IL6, CRP, AMPK, SIRT1,

OBJECTIFS

Comme cela a été montré précédemment, le vieillissement de la population occupe une place importante dans la survenue des pathologies cardiovasculaires. Associées à ces pathologies, de nombreuses comorbidités sont présentes particulièrement dans la population de sujets très âgés, c'est-à-dire les plus de 75 ans. Ces comorbidités sont représentées par un état de dénutrition à laquelle s'associe une intolérance au glucose. Le stress oxydant a été associé à de nombreuses formes d'insulino-résistance ainsi qu'au vieillissement artériel. Il pourrait également empêcher le succès de la renutrition des sujets très âgés. Le resvératrol, une molécule à propriétés anti-oxydantes, a montré qu'il pouvait être un outil de choix aussi bien dans l'amélioration des facteurs de risque métaboliques que plus directement sur le phénotype cardiovasculaire. Cependant, ses effets n'ont encore pas été clairement établis dans le cadre du vieillissement et en particulier dans une population très âgée.

Dans cette optique, des modèles murins de souris très âgées ont été mis en place afin d'étudier les effets du resvératrol dans cette population. La population très âgée présentant fréquemment un état de dénutrition pris en charge par un régime enrichi en protéines, l'évaluation des effets du resvératrol a également été réalisée dans ce contexte de prise en charge. L'objectif de ce travail a donc été d'évaluer les effets du resvératrol chez la souris très âgée, en présence ou en l'absence d'une prise en charge nutritionnelle, aussi bien au niveau métabolique que cardiovasculaire.

Dans une première partie, les effets d'un traitement chronique par le resvératrol seront évalués dans le modèle de vieillissement « physiologique » des souris âgées dénutries, en présence ou en l'absence d'une prise en charge nutritionnelle particulière. Nous explorerons les conséquences métaboliques aussi bien sur l'homéostasie du glucose que sur le profil lipidique, ainsi que les conséquences vasculaires avec une exploration phénotypique *in vivo* par écho-doppler et *ex vivo* sur des artères isolées avec les modifications moléculaires associées.

Dans une seconde partie, nous nous attacherons plus spécifiquement aux effets différentiels du régime enrichi en protéines et pauvre en glucides en fonction de l'âge, aussi bien au niveau métabolique que cardiovasculaire. Cette exploration sera menée dans des modèles murins avec des souris en pleine croissance ainsi que chez des souris adultes jeunes.

Enfin, dans une dernière partie, nous nous attacherons aux effets protecteurs sur le vaisseau du resvératrol dans le modèle de vieillissement des souris très âgées, sans prise en charge nutritionnelle. Nous étudierons les modifications structurales et moléculaires de l'aorte induites par le resvératrol et les conséquences cardiaques *in vivo* par écho-doppler. Enfin, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'implication d'une protéine Txnip, protéine à

l'interface du stress oxydant et du métabolisme du glucose, dans le vieillissement artériel et dans les améliorations artérielles induites par le resvératrol.

METHODOLOGIE

L'objectif de ce travail étant d'évaluer les effets d'un traitement chronique par resvératrol, associé ou non à une prise en charge nutritionnelle dans le cadre du vieillissement, un modèle murin de vieillissement physiologique a été mis en place. La souche C57BL/6 a été choisie car elle présente plusieurs atouts. En effet, cette souche a été décrite comme pouvant présenter un phénotype d'insulino-résistance (hypertension artérielle et diabète type 2) sous régime enrichi en lipides et glucides (334) ou un phénotype d'athérosclérose sous régime enrichi en lipides (335). De plus, de nombreux modèles Knock Out ont été développés sous fond C57BL/6.

La souris C57BL/6 âgée de 22 mois est une souris dont l'âge pourrait correspondre à 70 ans chez l'Homme. Une nourriture standard tout au long de son existence permet de s'affranchir des mécanismes liés à l'alimentation qui pourraient être observés avec des modifications d'alimentation. Ces animaux sont nourris toute leur vie puis pendant 3 mois par des croquettes M20 (SDS[®]) (3544 calories/g). Cette alimentation contient 57,46% de glucides, 18% de protéines et 3,15% de lipides. Au terme des 12 semaines de traitement, ces souris très âgées (25 mois) correspondraient au quatrième âge chez l'Homme. Ainsi, ce modèle peut présenter les caractéristiques d'un vieillissement « physiologique » humain avec la dénutrition couramment observée chez les sujets âgés et l'insulino-résistance. La prise en charge nutritionnelle de ces animaux a été réalisée par un régime enrichi en protéines en accès *ad libitum*. Cette pâte est riche en protéines et en graisse mais pauvre en glucides ; elle contient 35% de Saindoux, 14,5% d'huile de maïs, 37% de caséine, 10% de cellulose (brevet U8954 version 1, Safe[®]) (5713 calories/g). Selon les recommandations de la Haute Autorité de Santé dans le cadre de la dénutrition du sujet âgé, l'objectif est de parvenir à un apport énergétique de 30-40 kcal / kg / jour avec un apport en protéines de 1,2 à 1,5 g / jour, soit une augmentation de 20 à 87% par rapport à apport protéique standard chez l'adulte (0,8 à 1 g / jour). Dans cette étude, l'apport en protéines est augmenté de 72% entre le régime standard (18%) et le régime enrichi en protéines (31%) (126). Une partie des animaux reçoit du resvératrol (Yvery[®]) *per os*, incorporé dans l'alimentation, à hauteur de 0,04% en masse, dose précédemment étudiée dans le travail princeps de Baur et al. (283). Pour le régime standard, des croquettes à façon ont été réalisées par la société Safe[®] ; pour le régime « Burcelin », la poudre de resvératrol est directement incorporée à la nourriture sous forme de pâte.

Afin d'analyser les effets propres de la prise en charge de ceux inhérents à l'âge des animaux, les mêmes traitements ont été réalisés chez des animaux de 6 mois en début d'étude, soit chez des souris adultes jeunes et chez des souris jeunes de 3 mois en début de protocole.

Ainsi, sur une période de trois ans, 280 souris mâles C57BL/6J (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) de 22 mois (n=130), 6 mois (n=120) et 3 mois (n=30) ont été hébergées à l'animalerie centrale, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes. Les animaux sont maintenus à 4 ou 5 par cage avec un accès *ad libitum* à l'eau et la nourriture et une alternance jour-nuit de 12 heures (éclairage entre 8h et 20h). Après une période d'adaptation de 10 jours, les souris sont randomisées pour déterminer leur alimentation pour les douze semaines suivantes.

Tableau IX : Randomisation des animaux

	Régime Standard		Régime enrichi en protéines	
	Sans resvératrol	Resvératrol 0,04%	Sans resvératrol	Resvératrol 0,04%
Souris âgées (22 à 25 mois)	n = 33	n = 22	n = 38	n = 37
Souris adultes (6 à 9 mois)	n = 29	n = 22	n = 35	n = 34
Souris jeunes (3 à 6 mois)	n = 10	⊙	n = 10	n = 10

Ce protocole a reçu l'approbation du Comité Régional d'Ethique d'Ile-de-France (Numéro d'enregistrement : P2.VNA.060.08, valable jusqu'au 05/11/2011 puis CEEA34.SB.008.12. valable jusqu'au 10 mars 2015).

Au cours des 12 semaines de suivi des animaux, ceux-ci sont pesés toutes les deux semaines ; l'alimentation ingérée par cage est évaluée quotidiennement afin de pouvoir apprécier l'apport calorique et la consommation de resvératrol des groupes d'animaux. Au terme de cette période, les souris subissent les différentes analyses prévues pour la totalité d'entre eux ou pour une partie seulement selon les explorations réalisées. L'ensemble des méthodes utilisées sont décrites dans l'annexe 1.

RESULTATS

ARTICLE 1

Effets ambivalents du resvératrol sur les dommages artériels induits par l'insulino-résistance chez la souris âgée.

Stéphanie Baron, Tatiana Bédarida, Charles-Henry Cottart, Françoise Vibert, Emilie Vessières, Audrey Ayer, Daniel Henrion, Baptiste Hommeril, Jean-Louis Paul, Gilles Renault, Bruno Saubamea, Jean-Louis Beaudeux, Vincent Procaccio & Valérie Nivet-Antoine

Résumé

Le vieillissement conduit à une augmentation de l'insulino-résistance et une dysfonction endothéliale, avec un rôle majeur du stress oxydant. Cette étude explore les effets métaboliques et artériels d'un traitement chronique par le resvératrol (molécule connue pour restaurer l'insulino-sensibilité et diminuer le stress oxydant), dans des modèles de souris très âgées en absence ou en présence d'un régime riche en protéines. La renutrition tend à augmenter l'insulino-résistance et le risque athéromateux. Le resvératrol améliore l'insulino-sensibilité chez la souris âgée non renourrie en diminuant l'HOMA-IR et la résistinsémie alors qu'il n'améliore pas l'insulino-sensibilité des souris âgées renourries. En effet dans ce contexte de renutrition, le traitement par le resvératrol présente des effets délétères en augmentant l'inflammation systémique, la production aortique de radicaux superoxydes, et en diminuant la distensibilité aortique. En conclusion, nous avons montré que le resvératrol avait des effets bénéfiques ou délétères sur l'insulino-sensibilité et la fonction artérielle en fonction du contexte nutritionnel.

Dual Effects of Resveratrol on Arterial Damage Induced By Insulin Resistance in Aged Mice

Stephanie Baron,^{1,2} Tatiana Bedarida,¹ Charles-Henry Cottart,^{1,3} Francoise Vibert,¹ Emilie Vessieres,⁴ Audrey Ayer,⁴ Daniel Henrion,⁴ Baptiste Hommeril,⁵ Jean-Louis Paul,^{5,6} Gilles Renault,⁷ Bruno Saubamea,⁸ Jean-Louis Beaudeux,^{1,9} Vincent Procaccio,⁴ and Valerie Nivet-Antoine^{1,5}

¹Viva Team—EA 4466, Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University, France.

²Department of Physiology, Georges Pompidou European Hospital, Assistance publique—Hôpitaux de Paris, France.

³Clinical Biochemistry, Pitié-Salpêtrière - Charles Foix Hospital, Assistance publique—Hôpitaux de Paris, France.

⁴CNRS UMR 6214, INSERM U1083, Angers University, France.

⁵Department of Biochemistry, Georges Pompidou European Hospital, Assistance publique—Hôpitaux de Paris, France.

⁶EA 4529, Faculty of Pharmacy, Paris Sud University, Chateaufort-Malabry, France.

⁷Institut Cochin, CNRS UMR 8104, and INSERM U1016, Descartes University Sorbonne Paris Cité, France.

⁸Cellular and Molecular Imaging Platform, IFR 71—IMTCE Institute, Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University, France.

⁹Clinical Biochemistry, Necker Hospital, Assistance publique—Hôpitaux de Paris, France.

Address corresponding to Stephanie Baron, PharmD, Viva Team—EA 4466, Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité 75006, Paris Cedex, France. Email: stephanie.baron@egp.aphp.fr

Aging leads to increased insulin resistance and arterial dysfunction, with oxidative stress playing an important role. This study explored the metabolic and arterial effects of a chronic treatment with resveratrol, an antioxidant polyphenol compound that has been shown to restore insulin sensitivity and decrease oxidative stress, in old mice with or without a high-protein diet renutrition care. High-protein diet tended to increase insulin resistance and atheromatous risk. Resveratrol improved insulin sensitivity in old mice fed standard diet by decreasing homeostasis model of assessment-insulin resistance and resistin levels. However, resveratrol did not improve insulin resistance status in old mice receiving the high-protein diet. In contrast, resveratrol exhibited deleterious effects by increasing inflammation state and superoxide production and diminishing aortic distensibility. In conclusion, we demonstrate that resveratrol has beneficial or deleterious effects on insulin sensitivity and arterial function, depending on nutritional status in our models.

Key Words: Aging—Resveratrol—Vascular disease—Insulin resistance—Renutrition.

Received December 16, 2012; Accepted May 8, 2013

Decision Editor: Rafael de Cabo, PhD

AGING is characterized by a gradual decline of physiological functions such as glucose homeostasis. Indeed, insulin resistance frequently develops in the elderly and is often associated with protein malnutrition and cardiovascular problems (1). Oxidative stress has been linked to multiple forms of insulin resistance (2,3), especially in the elderly (4–6), and may decrease the effectiveness of renutrition in malnourished elderly patients (3,7). Oxidative stress also plays a central role in arterial dysfunction and vascular aging (8–10). High-protein supply used in renutrition care as recommended by the French health authorities (Haute Autorité de Santé) seems to have a beneficial effect on elderly comorbidities (11). However, detrimental effects of such diets on the vascular system have already been reported, but the effects during elderly renutrition care have never been explored (12).

Resveratrol, a polyphenol found in grapes, has been shown to prevent oxidative stress and inhibit inflammation, probably via NFκB inhibition, and to downregulate proteins at the interface between redox states and glucose

metabolism under stressful conditions (8,13–15). Moreover, human clinical trials have shown that resveratrol can restore insulin sensitivity (16–19). Resveratrol treatment may increase NAD⁺/NADH ratio and/or NAD⁺ biosynthesis. Resveratrol has been claimed to act upstream of AMPK, which may increase NAD⁺/NADH ratio and/or NAD⁺ biosynthesis, and resveratrol has been shown to activate SIRT1 via NAD⁺ biosynthesis (20–24). Resveratrol may also improve lipid metabolism, reduce the incidence of cardiovascular events, and partially reverse age-related metabolic conditions. However, there are reports that resveratrol activity depends on context, especially diet (25–28).

The hypothesis of our work was that resveratrol would have different effects on old arterial function according to patterns of insulin resistance. To explore this hypothesis, two murine models were proposed: old mice fed a standard diet and old mice fed a high-protein (HP) diet as renutrition care.

The aim of this study was to compare the effect of resveratrol on aging-induced and renutrition-induced insulin resistance and its consequences on the arterial system. Our

study is original because the effects of resveratrol were explored on the molecular stages of endothelial dysfunction (by studying molecular modifications caused by oxidative stress) and on the arterial consequences in terms of reactivity and distensibility (by echo-Doppler analysis).

METHODS

Experimental Animals

C57BL/6J male mice (6 and 22 months old) were obtained from Janvier (Le Genest-St-Isle, France) and treated in accordance with the European Parliament and Council Directive 2010/63/EU. They were housed in a temperature- and humidity-controlled room with a 12-h/12-h light-dark cycle and had food and water ad libitum. After 10 days of adaptation, they were randomized into five feeding groups for 12 weeks.

Two diets were provided: a standard diet M20 (SDS), delivering an 18% protein supply as given to adult mice in the animal care unit, or a HP diet (Certificate U8954, Safe), delivering a 31% protein supply that corresponds to renutrition care for elderly mice. These diets were supplemented or not with resveratrol (0.04% w/w). At the beginning of the study, the five groups were set up according to age, diet, and resveratrol treatment: a control group (6-month-old mice) fed a standard diet ($n = 20$); old mice (22 months) fed a standard diet (OS, $n = 21$); old mice (22 months) fed a standard diet plus resveratrol (OSR, $n = 20$); old mice (22 months) fed a HP diet (OD, $n = 23$); and old mice fed a HP diet plus resveratrol (ODR, $n = 22$). Food intake was measured daily to assess caloric and resveratrol intakes. This protocol was approved by the local ethics committee (Registration numbers: P2.VNA.060.08, CEEA34.SB.008.12).

At the end of the trial, 12 weeks later, after a 6-hour fasting period (from 6–12 AM), blood samples were taken from tail sections, and glucose levels were measured using a glucometer (One Touch Easy, Life Scan glucometer; One Touch Ultra test strips).

Biochemical Analyses

The vena cava was sectioned from anesthetized mice (5% isofluran inhalation). Blood samples were collected and stored for analyses of serum triglycerides, cholesterol, HDL cholesterol (Architect Ci8200, Abbott), and albumin (green bromocresol method) levels. HDL fractions were measured with a Lipoprint HDL kit (Eurobio) following the manufacturer's instructions. HDL cholesterol was divided into two subfractions: a large HDL cholesterol fraction and a nonlarge HDL cholesterol fraction, corresponding to the sum of small and intermediate HDL cholesterol. A liquid-phase multiplexed technique (Luminex Bioplex, Biorad) was used to determine the systemic parameters. Three kits were used in accordance with the manufacturer's instructions: a Mouse Serum Adipokine-3-plex kit (insulin, resistin, and leptin), a Cytokine/

Chemokine kit for KC (Keratinocyte derived Chemokine, CXCL1) and RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted, CCL5), and a Gut-Hormone kit for peptide YY (PYY), Lincoplex. An insulin resistance index (homeostasis model of assessment-insulin resistance [HOMA-IR]) was calculated as $\text{HOMA-IR} = \text{blood glucose level (mmol/L)} \times \text{insulin (mUI/L)} / 22.5$.

Staining the Aorta With Dihydroethidium

Superoxide production was measured using dihydroethidium, as described previously (29). Briefly, one segment of aorta was fresh frozen in Tissue Tek OCT Compound medium and stored at -80°C . Unfixed frozen sections (10 μm thick) were incubated for 1 hour at 37°C in a humidified chamber with dihydroethidium (10 μM in phosphate-buffered saline). Sections were counterstained with Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen, dilution 1/100) to delimit the artery. Pictures were recorded on a Leica TCS SP2 confocal microscope (excitation wavelength 488 nm, emission wavelengths of 580 and 520 nm for dihydroethidium and phalloidin, respectively). Quantification of superoxide production was carried out using NIH ImageJ software. The intensity of the dihydroethidium stain was measured within the aorta mask and divided by the surface area to obtain fluorescence-density values (arbitrary units/ μm^2).

Quantitative Real-Time PCR Analysis

Frozen segments of the liver and aorta were crushed with an Ultra-Turrax J25 instrument (Fisher-Bioblock) for 1 minute in Trizol (Invitrogen). RNA was extracted as described elsewhere (30). An aliquot of 1 μg of total RNA was treated with DNase I (Invitrogen) and converted into cDNA using Superscript II reverse transcriptase, oligo (dT)_{12–18} primers, and RNase Out Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen). cDNA products were subjected to real-time PCR (ABI 7900HT Fast Real-Time PCR). Quantitect SYBR Green PCR and Quantitect primer assay (Qiagen, Courtaboeuf, France) kits were used to quantify TNF α gene expression.

All reactions were carried out in triplicate in a final volume of 20 μL , following the manufacturer's instructions. Ribosomal Protein L4 was used as a housekeeping gene after a validation step to verify equal loading of RNA and cDNA for the reverse transcription and PCR reactions. Data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (31).

Hepatic TNF α Western Immunoblot

Liver sample preparations.—Liver fragments were crushed while still frozen, then homogenized in 10 mM phosphate buffer (pH 7.8) containing 1 mM EDTA and protease inhibitor cocktail (1%; Sigma) for 30 seconds, using an Ultra-Turrax homogenizer (Fisher-Bioblock). Homogenates were separated into several aliquots and conserved at -80°C until analysis.

Western immunoblot analysis of liver TNF α .—Samples (40 μ g of protein) were loaded onto a sodium dodecyl sulfate–acrylamide gel (15%) and subjected to electrophoresis. Gels were electroblotted to nitrocellulose membrane and probed for TNF α using rabbit anti-mouse TNF α (Abcam; 1/200) and for β -actin using chicken anti- β -actin (Abcam; 1/500), horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Sigma; 1/50,000), and anti-chicken IgG (Abcam; 1/4,000) secondary antibodies followed by chemiluminescence detection on the ECL kit using Hyperfilm MP (Amersham). Blots were scanned and their band surface areas analyzed on NIH ImageJ software using the same-sized section of the blot for each scan. The data were expressed as densitometric units relative to β -actin protein.

TNF α Aorta Labeling

Segments of aorta were embedded in Tissue Tek OCT Compound, frozen at -40°C and stored at -80°C . After fixing (paraformaldehyde 4%) and blocking, 20- μ m-thick sections were incubated with a primary antibody raised against TNF α (Abcam; 1/100). Labeling was revealed with Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen; 1/200). The endothelium was labeled with rat monoclonal anti-CD31 antibody (BD Pharmingen; 1/100) and revealed with Alexa Fluor 555 goat anti-rat IgG (dilution 1/200). Nuclei were counterstained with To-Pro3 (Invitrogen; 1/500). Negative controls (primary antibodies substituted by nonimmune IgG isotype) did not yield any detectable labeling.

Images were recorded on a Leica TCS SP2 confocal microscope. Endothelial TNF α protein expression was quantified using NIH ImageJ software. Three sections of each aorta were recorded, and four independent sectors of each section were analyzed. TNF α -staining intensities were measured within the endothelium and divided by surface area to give fluorescence-density values (in arbitrary units/ μm^2).

Arterial Reactivity Experiments

Aorta and mesenteric artery vasoreactivity experiments were carried out as previously described (32,33). Briefly, a 2-mm-long segment of aorta or second-order mesenteric artery was dissected and mounted on a wire myograph. Two wires were inserted into the lumen of the arteries and fixed to a force transducer and a micrometer, respectively. The arteries were bathed in a 5-mL organ bath containing a physiological salt solution maintained at a pH of 7.4, a pO_2 of 160 mmHg, and a pCO_2 of 37 mmHg. The optimal wall tension was then applied. Artery viability was tested using a potassium-rich solution (80 mmol/L).

A cumulative concentration–response curve to phenylephrine (0.001–10 $\mu\text{mol/L}$) was then plotted. After a washout, a concentration–response curve for the endothelium-dependent relaxing agent, acetylcholine (0.001–10 $\mu\text{mol/L}$), was plotted following phenylephrine-induced precontraction (3 $\mu\text{mol/L}$). To determine the role played by oxidative stress

in the aorta and the reactivity of the mesenteric arteries, the same experiments were then performed after preincubation with catalase (80 U/mL) and tempol (superoxide dismutase analog; 10 $\mu\text{mol/L}$). The lack of arterial responsiveness to phenylephrine precontraction revealed arterial aging and left us only a small number of workable mesenteric artery sections (50% could not be used for experiments). The major damage suffered by these arteries also limited the possibility of statistical analyses due to insufficient sample numbers.

Aortic Distensibility

Doppler echography was carried out on anesthetized mice (isofluran inhalation, induced at 3.5%, then maintained with 1.5%) with an Ultrasound Biomicroscope Vevo 770, Visual Sonic, probe 704. Internal and external diameters of the aortas were measured during systole and diastole. Distensibilities were calculated as distensibility = [systole diameter – diastole diameter]/diastole diameter.

Statistical Analyses

One-way ANOVA and Dunn's multiple comparisons test were used for statistical analyses (GraphPad Prism). Results were expressed as means $\pm$ SEM; statistical significance was set at $p \leq .05$.

RESULTS

Longitudinal Study

OS group mice showed lower caloric intake ($p < .001$; 12.3 ± 0.2 kcal/mouse/d) than controls (13.2 ± 0.2 kcal/mouse/d). OS mice exhibited weight loss during the study, whereas control mice exhibited weight gain (Table 1). There was no significant difference between the OS group and the control group in terms of survival rates at 84 days.

The caloric intake of the OD group was greater than that of OS mice (13.5 ± 0.2 kcal/mouse/d; $p < .001$) though there were no significant differences between their weights. Compared with OS mice, the survival rate of OD mice at 84 days was significantly decreased.

Resveratrol-treated mice (OSR and ODR) ingested approximately 40 mg/kg/d of resveratrol. Compared with their respective untreated matched groups, neither the OSR group nor the ODR group showed any weight modification during the 12 weeks of the study, nor changes in their caloric intake. Resveratrol treatment did not modify survival rates.

Nutritive Parameters

OS mice showed decreased (–15%) serum albumin levels and tended to show increased (+52%) serum PYY levels (Table 1). Serum leptin levels were decreased by 67%. Compared with OS mice, the OD group did not show changes in albuminemia or PYY serum levels although the serum leptin level tended to increase (+13%).

Table 1. Longitudinal Study and Nutritive Parameters

	Control	OS	OD	OSR	ODR
Survival rate at Day 84 (%)	100	95	70 [§]	100	68
Weight (Day 0) (g)	30.3±0.4	31.4±0.4	31.6±0.7	31.9±0.5	30.6±0.8
Weight change at Day 84 (g)	+1.7±0.2	-1.0±0.2***	-1.3±0.7	+0.1±0.3	-1.9±0.9
Serum albumin (g/L)	29.7±0.7	25.2±1.0*	29.0±1.4	27.1±1.0	25.9±0.7
Serum peptide YY (ng/L)	85.5±23.2	130.2±27.2	152.2±34.5	197.1±13.5	215.1±35.2
Serum leptin (ng/L)	2727±466	891±57**	1005±120	1472±193*	415±59**

Notes: Control group (9-month-old mice fed a standard diet) and groups of aged mice: OS(R), 25-month-old mice fed a standard diet, with or without resveratrol; OD(R), 25-month-old mice fed a high-protein diet, with or without resveratrol. OS mice were compared with control-group mice (* $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$); OD mice were compared with OS mice ($^{\dagger}p < .05$); OSR and ODR mice were compared with OS and OD mice, respectively ($^{\#}p < .05$; $^{\#\#}p < .001$). Mean $\pm$ SEM (Weight and Weight change [g]; Serum albumin [g/L]; Serum peptide YY and Serum leptin [ng/L]); $n = 8$ –23 per group.

Glucose regulation parameters

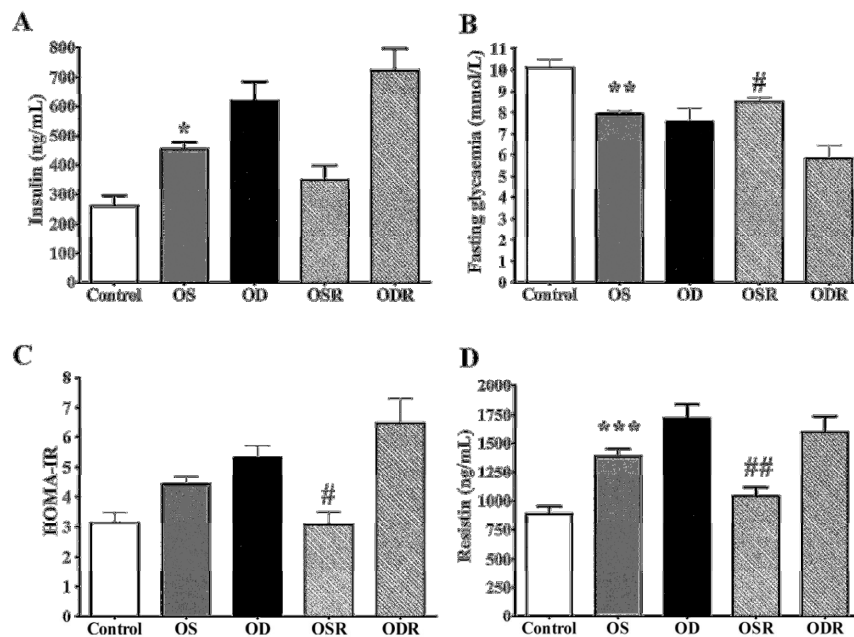


Figure 1. Glucose regulation parameters: A, insulinemia; B, fasting glycaemia; C, insulin-resistance index "HOMA-IR"; D, resistinemia in the control group (9-month-old mice fed a standard diet) and in old mice (OS(R): 25-month-old mice fed a standard diet, with or without resveratrol; OD(R): 25-month-old mice fed a high-protein diet, with or without resveratrol). OS mice were compared with control mice (* $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$); OSR and ODR mice were compared with OS and OD mice, respectively ($^{\dagger}p < .05$; $^{\#}p < .01$). Mean $\pm$ SEM (insulinemia [ng/mL]; fasting glycaemia [mmol/L]; resistinemia [ng/mL]); $n = 8$ –14 per group.

The OSR and ODR groups showed a trend of increasing PYY serum levels, at +65 and +41%, respectively, but no changes in albuminemia. Serum leptin level increased by 65% in OSR mice compared with OS mice, but it decreased by 59% in ODR mice compared with OD mice.

Glucose Regulation Parameters

Compared with the control group, OS mice had increased serum insulin and resistin levels (+73% and +56%, respectively) and increased HOMA-IR (+41%; Figure 1). OS mice had decreased fasting glycaemia (–22%) compared

with controls. Compared with OS mice, OD mice showed increased insulinemia, HOMA-IR, and resistinemia (+37%, +20%, and +24%, respectively) but no changes in fasting glycaemia levels.

Compared with the matched untreated group, OSR mice exhibited a trend toward decreased insulin that resulted in 30% lower HOMA-IR with a 25% lower resistin level, associated with increased fasting glycaemia (+8%).

The ODR group showed no significant differences to the OD group in terms of serum insulin, resistin levels, HOMA-IR, or fasting glycaemia.

Lipid Metabolism Parameters

OS mice showed decreased levels of triglycerides (−41%), total cholesterol (−21%), and HDL cholesterol (−27%) compared with controls (Figure 2). HDL cholesterol:total cholesterol ratio was decreased by 10% ($57.0 \pm 1.2\%$ vs

$51.5 \pm 1.0\%$, $p < .05$) without any modifications in HDL subfraction partitioning.

The OD group showed higher levels of triglycerides (+85%), total cholesterol (+79%), HDL cholesterol (+65%), and non-HDL cholesterol (+100%) than the OS group. HDL cholesterol:total cholesterol ratio was stable ($49.5 \pm 0.9\%$). There was no significant change in HDL subfraction partitioning even though large HDL and nonlarge HDL cholesterol concentrations were increased by +113% and 59%, respectively.

OSR and ODR mice did not show any changes in lipid parameters compared with their matched untreated groups. The only clear difference was that nonlarge HDL fraction decreased significantly (−14%), whereas large HDL fraction increased by 28% in ODR mice compared with the OD group.

Serum KC (CXCL1) and RANTES (CCL5) Levels and Liver TNF α Expression

OS mice showed no significant change in serum KC (CXCL1) or RANTES (CCL5) levels compared with controls, but hepatic TNF α gene expression was increased 2.7-fold (Figure 3). OD mice showed no significant change in serum KC or RANTES levels or hepatic TNF α gene and protein expression compared with OS mice.

OSR mice showed similar serum KC and RANTES levels to the matched non-resveratrol-treated group, whereas ODR mice showed very strongly increased serum KC (+363%) and RANTES (+55%) levels compared with OD mice. Resveratrol treatment had no effect on liver TNF α gene and protein expressions in OSR and ODR mice compared with OS and OD mice, respectively.

Aorta TNF α Expression

Compared with controls, OS mice showed 3.8-fold higher TNF α gene expression in the aorta (Figure 4) and 52% higher TNF α protein expression in the endothelium.

In OD mice, neither aortic TNF α gene expression nor endothelial TNF α protein expression were statistically different from OS.

Neither OSR nor ODR mice showed any differences in TNF α gene or protein expressions in the aorta compared with OS and OD groups, respectively.

Aorta Superoxide Generation

Superoxide production rose by 50% in OS mice compared with controls (Figure 5). Superoxide production in the aortas of OD and OS mice did not significantly vary. Resveratrol treatment had no effect on OSR mice, whereas ODR mice showed 55% higher superoxide production.

Arterial Reactivity

OS mice did not show any significant change in acetylcholine-induced dilation of the aorta, but they did show decreased dilation of the mesenteric arteries ($p < .01$) compared with

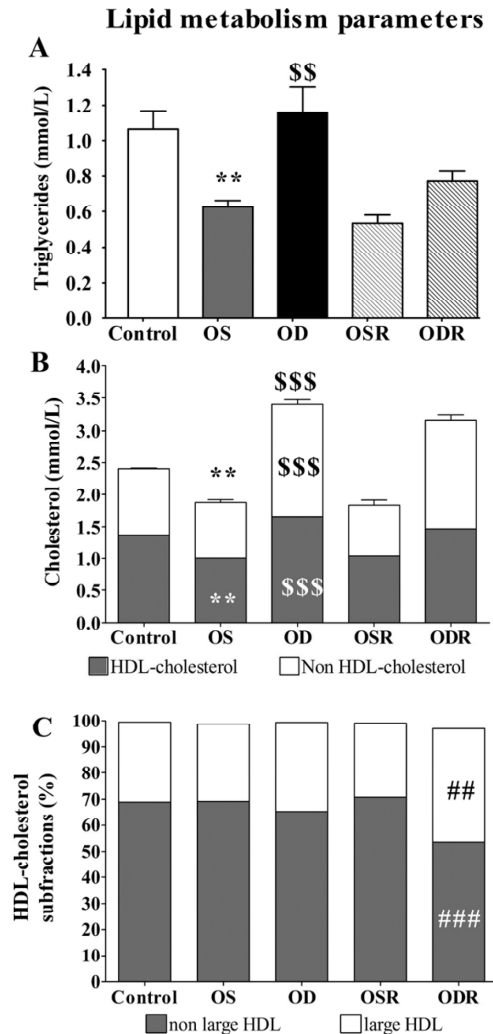


Figure 2. Lipid metabolism parameters: **A**, triglyceridemia; **B**, serum cholesterol level (total cholesterol is the sum of high-density lipoprotein [HDL] cholesterol plus non-HDL cholesterol); **C**, share of each fraction of HDL cholesterol (large and nonlarge HDL cholesterol) in the control group (9-month-old mice fed a standard diet) and in old mice (OS(R): 25-month-old mice fed a standard diet, with or without resveratrol; OD(R): 25-month-old mice fed a high-protein diet, with or without resveratrol). OS mice were compared with control mice (** $p < .01$); OD mice were compared with OS mice ($^{85}p < .01$; $^{555}p < .001$); OSR and ODR mice were compared with OS and OD groups, respectively ($^{*}p < .01$; $^{***}p < .001$). Mean $\pm$ SEM (triglyceridemia and serum cholesterol level [mmol/L]); Percentage (share of each fraction of HDL cholesterol [%]); $n = 8$ –14 per group.

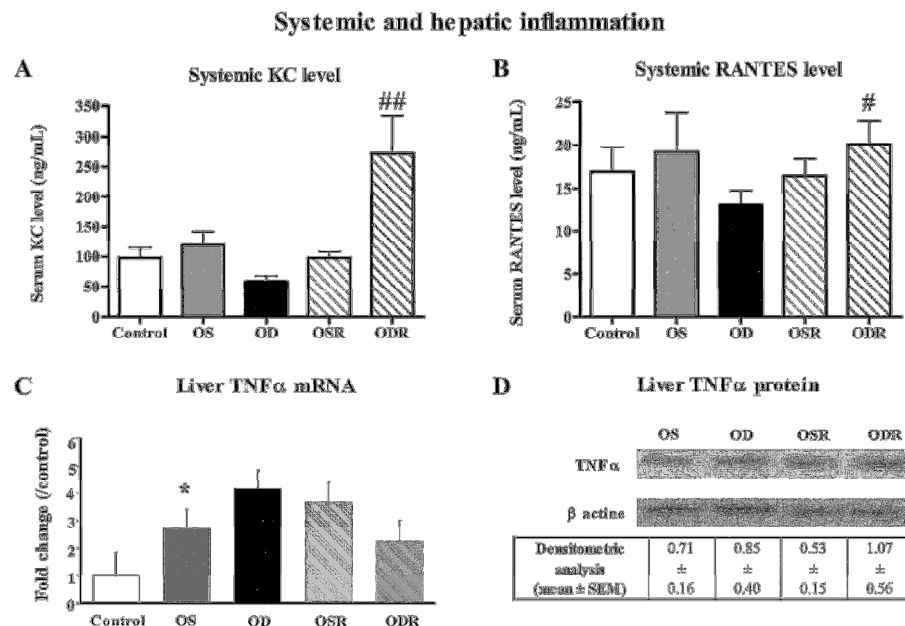


Figure 3. Systemic and hepatic inflammation: **A**, Serum KC level; **B**, Serum RANTES level; **C**, liver TNF alpha mRNA expression (results are represented as fold change compared with the control group); **D**, liver TNF alpha Western Blot; **E**, Densitometric analysis of Western Blot. Control group (9-month-old mice fed a standard diet); old mice (OS(R): 25-month-old mice fed a standard diet, with or without resveratrol; OD(R): 25-month-old mice fed a high-protein diet, with or without resveratrol). OS mice were compared to control mice ($^*p < .05$); OSR and ODR mice were compared with OS and OD mice, respectively ($^*p < .05$; $^{##}p < .01$). Mean $\pm$ SEM (Serum KC and RANTES levels [ng/mL]; liver TNF alpha mRNA expression [fold change]; liver TNF alpha Western blot [densitometric arbitrary units]); $n = 6-8$ per group.

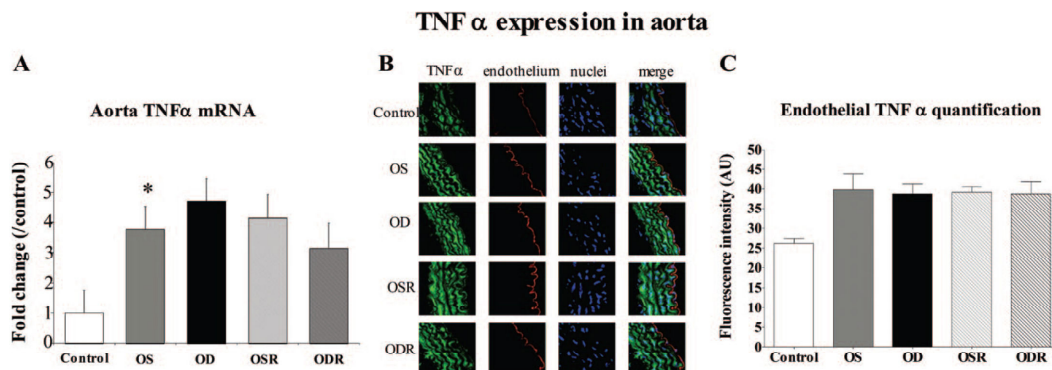


Figure 4. TNF alpha expression in aorta: **A**, aortic TNF alpha mRNA expression (results are represented as fold change compared with the control group); **B**, immunofluorescence in the aorta for TNF alpha ($\times 40$); **C**, quantification of TNF alpha protein expression in endothelium, expressed as fluorescence density. All plots represent the control group (9-month-old mice fed a standard diet) and groups with old mice (OS(R): 25-month-old mice fed a standard diet, with or without resveratrol; OD(R): 25-month-old mice fed a highprotein diet, with or without resveratrol). OS mice were compared with control mice ($^*p < .05$). Mean $\pm$ SEM (aortic TNF alpha mRNA expression [fold change]; quantification of protein expression in endothelium [fluorescence arbitrary units]); $n = 6-8$ per group.

controls group (data not shown). Acetylcholine induced dilation did not significantly change in the aorta or the mesenteric arteries in the OD group compared with OS mice.

Acetylcholine-induced dilation of the aorta and mesenteric arteries was unaffected by resveratrol treatment in

OSR and ODR mice. In OD mice, catalase–tempol preincubation did not affect acetylcholine-induced dilation of the aorta or mesenteric arteries (Figures 6A and B).

In the ODR group, catalase–tempol preincubation tended to increase acetylcholine-induced dilation of both the aorta

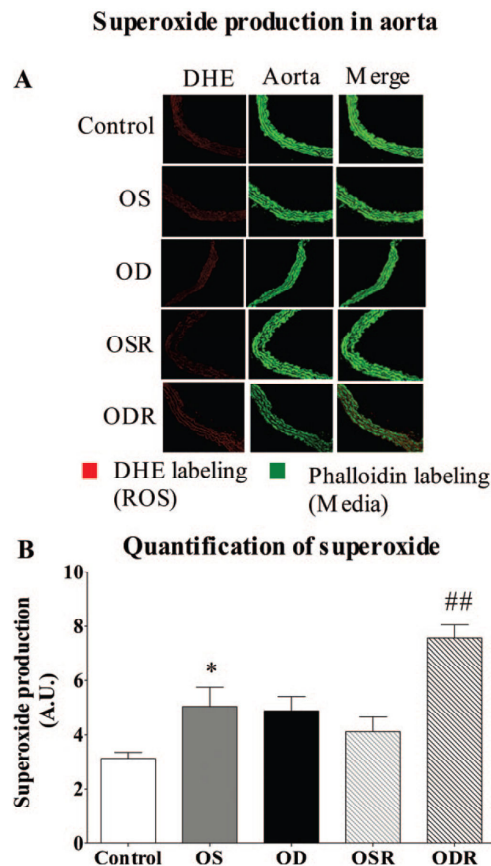


Figure 5. Superoxide production in aorta: **A**, Aorta superoxide generation according to immunofluorescence (dihydroethidium, red) and media (phalloidin, green) labeling ($\times 40$). **B**, Quantification of superoxide in the aorta, expressed as fluorescence intensity (A.U.). The plots represent the control group (9-month-old mice fed a standard diet) and groups of old mice (OS(R): 25-month-old mice fed a standard diet, with or without resveratrol; OD(R): 25-month-old mice fed a high-protein diet, with or without resveratrol); OS mice were compared with control mice (* $p < .05$); OSR and ODR mice were compared with the OS and OD mice, respectively (** $p < .01$). Mean $\pm$ SEM (quantification of superoxide in the aorta [fluorescence arbitrary units]); $n = 4-7$ per group.

and mesenteric arteries compared with the nonpreincubated group. Phenylephrine-induced contraction in the aorta tended to increase in the ODR group compared with the OD group (Figure 6C).

Aortic Distensibility

OS mice did not show modified aortic distensibility compared with controls (Figure 6D). Aortic distensibility did not change in OD mice compared with OS mice. Resveratrol treatment had no effect on OSR mice but decreased distensibility in the ODR group.

DISCUSSION

Protein–energy malnutrition affects the great majority of elderly people and is the most prevalent disorder in hospitalized elderly participants (34). This undernutrition state is associated with worse prognosis of associated chronic diseases, including cardiovascular disease that is the main cause of death in this elderly population (34,35).

Renutrition could improve morbidity and mortality in old age (36), but it proves difficult to achieve in elderly patients (37). One possible explanation is that renutrition could depend on the degree of insulin resistance, which is closely related to oxidative stress (3,10) and has already been incriminated in endothelial cell dysfunction (38,39) and vascular aging (9).

Resveratrol, a well-known antioxidant and anti-inflammatory molecule, has been shown to improve insulin sensitivity. This molecule could be a good candidate for slowing down the impairment of glucose tolerance and vascular aging, and a combination resveratrol with a renutrition strategy could have potential benefits for elderly patients.

Renutrition Care Increases Insulin Resistance, Disrupts Lipid Metabolism, and Raises Liver and Aorta Inflammation

Our aged mice (OS group) exhibited a malnutrition state characteristic of aged people, as shown by their reduced weight, hypoalbuminemia, and decreased cholesterol and leptin levels (7,40). In addition, lower triglyceride concentrations and a tendency toward increased PYY levels have been observed, as commonly seen in aged people with anorexia (41).

Focusing on glucose metabolism, hyperinsulinemia and HOMA-IR reflected a serious insulin-resistant state, which was confirmed by increased resistin levels. OS mice showed low fasting glycemia, which could be the consequence of low glucose production, especially due to insufficient gluconeogenesis (42). This may be due to the NAD⁺-pool depletion observed in the elderly, as reported in recent studies (43,44). The aortic oxidative stress and inflammation observed in OS mice (TNF α expression increased not only in the endothelium but also in whole aorta by 62%; data not shown), has been shown to be related to an insulin-resistant state (45).

To fight against malnutrition in human patients, the French institution “Haute Autorité de Santé” recommends restoring caloric intake with a protein supply (11). The HP diet used in this study restored caloric intake. However, the renutrition process can be lengthy, and success is tightly related to the patient’s age (37). In this study, the renutrition process tended to restore serum leptin and albumin levels in elderly mice (11,35). However, this HP diet is also known to induce insulin resistance (46). The trend toward increased insulin and the significantly increased serum IGF-I levels (OD 378 ± 13 pg/mL vs OS 283 ± 27 pg/mL, +34%, $p < .05$)

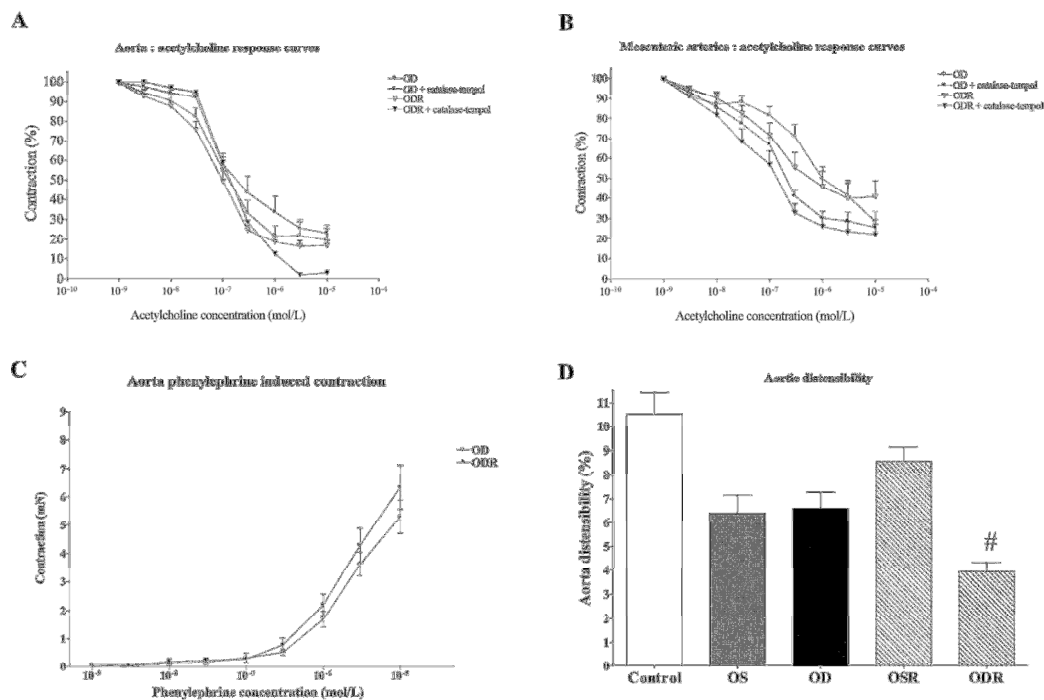


Figure 6. **A** and **B**, Effect of catalase-tempol preincubation on acetylcholine-induced dilation of the aorta (**A**) and mesenteric arteries (**B**) isolated from OD and ODR mice ($n = 6-8$ per group). Data are expressed as percentages of contraction; **C**, Aortic phenylephrine-induced contraction in OD and ODR groups ($n = 6-8$ per group); **D**, Aortic distensibility ($n = 8-11$ per group). All plots represent the control group (9-month-old mice fed a standard diet) and groups of old mice (OS(R): 25-month-old mice fed a standard diet, with or without resveratrol; OD(R): 25-month-old mice fed a high-protein diet, with or without resveratrol). OSR and ODR mice were compared with OS and OD mice, respectively ($^*p < .05$). Mean $\pm$ SEM (aorta and mesenteric arteries acetylcholine responses curves [% contraction]; aortic phenylephrine-induced contraction [%]; aortic distensibility [%]).

observed in OD mice is in accordance with the presence of an insulin resistance state and with Baur's observations made under another high-calorie diet (47). This insulin resistance associated with high triglyceride levels might be the consequence of increased free fatty acid levels, as described previously (48,49), especially in a context of low glucose supply (12). We did observe increased total cholesterol and non-HDL cholesterol levels. Large HDL fractions are enriched with apolipoprotein E and bind to LDL receptors with high affinity; large HDL fractions are the major class of plasma lipoproteins that deliver lipids to peripheral tissues (50). Thus, the rise of this HDL fraction may increase atheromatous risk under this type of HP diet, as suggested by Foo (12). Moreover, HDL cholesterol:total cholesterol ratio was reduced, which may be predictive of increased susceptibility to atherogenesis (51). These metabolic disorders are associated with increased oxidative stress and inflammation of the aorta induced by aging. They could have vascular and potent cardiovascular consequences that could be responsible for the increased mortality observed in our OD model.

Resveratrol Does not Improve Insulin Resistance and Predicts an Increased Susceptibility to Atherogenesis, Increased Oxidative Stress in the Aorta, and Diminished Aortic Distensibility in OD Mice

The benefits of resveratrol to reduce insulin resistance have been investigated in several studies (19,52,53). The resveratrol dose administered *per os* in this study was around 40 mg/kg/d for 3 months. Depending on authors, this dose would correspond to the dose used in numerous clinical studies (19,47,54) or to a lower daily dose in humans (18,55).

Our results show that resveratrol improved glucose metabolism in the OSR group. The reduction in insulin resistance in OSR mice receiving resveratrol is highlighted by the decreased HOMA-IR and resistin levels. Interestingly, these results corroborated a recent study by Crandall JP in humans, which reported that resveratrol improves insulin sensitivity and postmeal plasma glucose in old participants with age-related glucose intolerance (19). These effects of resveratrol could be the result of an increase in NAD⁺ levels, as reported by Park (28). In a previous study, we

had shown that resveratrol changes NAD⁺/NADH balance toward increasing NAD⁺ concentration in the liver mitochondria of these OSR mice (personal data, V Procaccio). An increase of NAD⁺ level enhances substrate supply to the respiratory chain by both the tricarboxylic-acid cycle and fatty-acid oxidation, hence providing more energy. The resveratrol-induced improvement of mitochondrial function and glucose tolerance could involve AMPK and/or sirtuin (20–24). In our study, resveratrol seemed to be beneficial to the malnourished state of physiological aging (OS model). By restoring insulin sensitivity, it helped maintain body weight and restore leptin levels.

Conversely, in mice fed the HP diet (ODR mice), resveratrol failed to change fasting glycemia, HOMA-IR, resistin levels, or IGF-I level, and the HP diet seemed to reduce the beneficial effects of resveratrol on insulin resistance. In ODR mice, resveratrol led to a decrease in triglyceride and leptin serum levels, in agreement with Timmers et al.'s results in humans (18). Some studies have shown that resveratrol modulates the regulation of genes related to lipid metabolism, which in the context of an atherogenic diet leads to increased lipolysis and decreased lipogenesis (23). This increased lipolysis could be responsible for the NFκB pathway activation that leads to systemic inflammation (48). ODR mice showed an inflammatory state, with increased serum KC and RANTES levels. KC, through endothelial release, has been already shown to promote atherosclerosis (56). Moreover, resveratrol supplementation increased systemic RANTES levels in ODR mice, suggesting a possible increase in monocyte adherence to endothelial cells. Resveratrol supplementation increased reactive oxygen species in ODR mice arteries, evidencing a deleterious effect of resveratrol on oxidative stress and inflammation. These data do not confirm those found in other studies (13,14,57). However, the effects of resveratrol in these studies were observed on a model of acute and pharmacologically induced inflammation and oxidative stress, whereas, in our model, the systemic low-grade inflammation induced by HP diet was not detectable. Even though total and non-HDL concentrations of cholesterol were unchanged, the HDL cholesterol fraction and the HDL cholesterol:total cholesterol ratio tended to decrease in ODR mice, thus possibly increasing atherosclerosis risk factors (51). Moreover, regarding the HDL subfractions in ODR mice, resveratrol was responsible for a shift in HDL fractions from nonlarge to larger fractions of cholesterol. Furthermore, resveratrol also tended to increase aorta phenylephrine contraction and worsened the diminishing aorta distensibility induced by aging in OD mice. Taken together, these results strongly suggest that resveratrol, when associated with HP diet in old mice, may increase the risk factors associated with atherogenesis by triggering vascular alterations and could represent an additional risk factor for the cardiovascular system when added to a HP diet.

CONCLUSION

Taken together, our data show that resveratrol could reduce insulin resistance in old age. However, our study also highlights that in a HP diet context, not only are the beneficial effects of resveratrol abrogated but, more importantly, resveratrol supplementation could have deleterious effects on arterial function.

FUNDING

This work was supported by funds from the French Ministry of Research and Technology under a 4-year contract (EA 4466, 2010–2013).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the animal facilities (Paris Descartes University) for animal care, the company Yvery for the supplying the resveratrol, the Cellular and Molecular Imaging platform of the IFR 71-IMTCE Institute, and Prof. A. Jardel, Dr. J-L. Golmard and Dr. C. Boulanger for their valuable advice.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

- Verhagen SN, Wassink AM, van der Graaf Y, Gorter PM, Visseren FL; SMART Study Group. Insulin resistance increases the occurrence of new cardiovascular events in patients with manifest arterial disease without known diabetes. the SMART study. *Cardiovasc Diabetol*. 2011;10:100.
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 2006;440:944–948.
- Hebert-Schuster M, Fabre EE, Nivet-Antoine V. Catalase polymorphisms and metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012;15:397–402.
- Abel ED, O'Shea KM, Ramasamy R. Insulin resistance: metabolic mechanisms and consequences in the heart. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:2068–2076.
- Hasegawa Y, Saito T, Ogihara T, et al. Blockade of the nuclear factor-κB pathway in the endothelium prevents insulin resistance and prolongs life spans. *Circulation*. 2012;125:1122–1133.
- Hebert-Schuster M, Cottart CH, Laguillier-Morizot C, et al. Catalase rs769214 SNP in elderly malnutrition and during renutrition: is glucagon to blame? *Free Radic Biol Med*. 2011;51:1583–1588.
- Fabre EE, Raynaud-Simon A, Golmard JL, et al. Gene polymorphisms of oxidative stress enzymes: prediction of elderly renutrition. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:1504–1512.
- Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A. Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010;65:1028–1041.
- Collins AR, Lyon CJ, Xia X, et al. Age-accelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes. *Circ Res*. 2009;104:e42–e54.
- Nivet-Antoine V, Labat C, El Shamieh S, et al. Relationship between catalase haplotype and arterial aging. *Atherosclerosis*. 2013;227:100–105.
- HAS (Haute Autorité de Santé). *Clinical Practice Guidelines. Nutritional Support Strategy for Protein-Energy Malnutrition in the Elderly*. Saint-Denis, France: HAS; 2007.
- Foo SY, Heller ER, Wykrzykowska J, et al. Vascular effects of a low-carbohydrate high-protein diet. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:15418–15423.
- Hassan-Khabbar S, Cottart CH, Wendum D, et al. Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia reperfusion: a possible strategy in liver surgery. *Liver Transpl*. 2008;14:451–459.

14. Hassan-Khabbar S, Vamy M, Cottart CH, et al. Protective effect of post-ischemic treatment with trans-resveratrol on cytokine production and neutrophil recruitment by rat liver. *Biochimie*. 2010;92:405–410.
15. Nivet-Antoine V, Cottart CH, Lemaréchal H, et al. trans-Resveratrol downregulates Txnip overexpression occurring during liver ischemia-reperfusion. *Biochimie*. 2010;92:1766–1771.
16. Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, et al. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr*. 2011;106:383–389.
17. Cottart CH, Nivet-Antoine V, Beaudeux JL. A review of recent data on the metabolism, biological effects and toxicity of resveratrol in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2013. doi:10.1002/mnfr.201200589. In press.
18. Timmers S, Konings E, Bilet L, et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab*. 2011;14:612–622.
19. Crandall JP, Oram V, Trandafirescu G, et al. Pilot study of resveratrol in older adults with impaired glucose tolerance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67:1307–1312.
20. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009;458:1056–1060.
21. Chung JH, Manganiello V, Dyck JR. Resveratrol as a calorie restriction mimetic: therapeutic implications. *Trends Cell Biol*. 2012;22:546–554.
22. Baur JA, Ungvari Z, Minor RK, Le Couteur DG, de Cabo R. Are sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan? *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11:443–461.
23. Price NL, Gomes AP, Ling AJ, et al. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab*. 2012;15:675–690.
24. Feige JN, Lagouge M, Canto C, et al. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab*. 2008;8:347–358.
25. Do GM, Kwon EY, Kim HJ, et al. Long-term effects of resveratrol supplementation on suppression of atherogenic lesion formation and cholesterol synthesis in apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374:55–59.
26. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:493–506.
27. Wang C, Wheeler CT, Alberico T, et al. The effect of resveratrol on lifespan depends on both gender and dietary nutrient composition in *Drosophila melanogaster*. *Age (Dordr)*. 2013;35:69–81.
28. Park SJ, Ahmad F, Philp A, et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*. 2012;148:421–433.
29. Nijmeh J, Moldobaeva A, Wagner EM. Role of ROS in ischemia-induced lung angiogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;299:L535–L541.
30. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156–159.
31. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402–408.
32. Loufrani L, Dubroca C, You D, et al. Absence of dystrophin in mice reduces NO-dependent vascular function and vascular density: total recovery after a treatment with the aminoglycoside gentamicin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:671–676.
33. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*. 1977;41:19–26.
34. Bouillanne O, Morineau G, Dupont C, et al. Geriatric Nutritional Risk Index: a new index for evaluating at-risk elderly medical patients. *Am J Clin Nutr*. 2005;82:777–783.
35. Nivet Antoine V, Golmard JL, Coussieu C, Piette F, Cynober L, Bouillanne O. Leptin is better than any other biological parameter for monitoring the efficacy of renutrition in hospitalized malnourished elderly patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;75:315–320.
36. Newman AB, Yanez D, Harris T, Duxbury A, Enright PL, Fried LP; Cardiovascular Study Research Group. Weight change in old age and its association with mortality. *J Am Geriatr Soc*. 2001;49:1309–1318.
37. Walrand S, Chambon-Savanovitch C, Felgines C, et al. Aging: a barrier to renutrition? Nutritional and immunologic evidence in rats. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:816–824.
38. Suvorava T, Lauer N, Kumpf S, Jacob R, Meyer W, Kojda G. Endogenous vascular hydrogen peroxide regulates arteriolar tension in vivo. *Circulation*. 2005;112:2487–2495.
39. Suvorava T, Kojda G. Reactive oxygen species as cardiovascular mediators: lessons from endothelial-specific protein overexpression mouse models. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787:802–810.
40. Bouillanne O, Golmard JL, Coussieu C, et al. Leptin a new biological marker for evaluating malnutrition in elderly patients. *Eur J Clin Nutr*. 2007;61:647–654.
41. Di Francesco V, Fantin F, Omizzolo F, et al. The anorexia of aging. *Dig Dis*. 2007;25:129–137.
42. Atherton HJ, Gulston MK, Bailey NJ, et al. Metabolomics of the interaction between PPAR-alpha and age in the PPAR-alpha-null mouse. *Mol Syst Biol*. 2009;5:259.
43. Braidy N, Guillemin GJ, Mansour H, Chan-Ling T, Poljak A, Grant R. Age related changes in NAD⁺ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *PLoS One*. 2011;6:e19194.
44. Massudi H, Grant R, Braidy N, Guest J, Farnsworth B, Guillemin GJ. Age-associated changes in oxidative stress and NAD⁺ metabolism in human tissue. *PLoS One*. 2012;7:e42357.
45. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes*. 2003;52:1–8.
46. Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Roy-Tirelli A, Thorens B. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282:E834–E842.
47. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006;444:337–342.
48. Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, et al. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes*. 2003;52:2882–2887.
49. Steinberg HO, Paradisi G, Hook G, Crowder K, Cronin J, Baron AD. Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production. *Diabetes*. 2000;49:1231–1238.
50. de Silva HV, Más-Oliva J, Taylor JM, Mahley RW. Identification of apolipoprotein B-100 low density lipoproteins, apolipoprotein B-48 remnants, and apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in the mouse. *J Lipid Res*. 1994;35:1297–1310.
51. LeBoeuf RC, Tsao WW, Klirk E, Childs MT. Cholesterol feeding induces cholesterol-rich VLDL in atherosclerosis-susceptible mice regardless of dietary fat content. *Nutr Res*. 1993;13:549–561.
52. Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, et al. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab*. 2008;8:157–168.
53. Barger JL, Kayo T, Vann JM, et al. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS One*. 2008;3:e2264.
54. Lagouge M, Armann C, Gerhart-Hines Z, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*. 2006;127:1109–1122.
55. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008;22:659–661.
56. Zhou Z, Subramanian P, Sevilims G, et al. Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell Metab*. 2011;13:592–600.
57. Abraham J, Johnson RW. Consuming a diet supplemented with resveratrol reduced infection-related neuroinflammation and deficits in working memory in aged mice. *Rejuvenation Res*. 2009;12:445–453.

Discussion et perspectives

Ce travail a permis de mettre en évidence, et ce pour la première fois *in vivo*, un effet différent du resvératrol en fonction du contexte dans lequel il est utilisé. Dans le modèle de vieillissement physiologique, en l'absence de prise en charge nutritionnelle, le resvératrol présente des effets bénéfiques métaboliques avec en particulier une amélioration de l'insulino-sensibilité. Cette amélioration pourrait être bénéfique sur le plan cardiovasculaire comme tend à le montrer l'étude clinique de Crandall (305). Une approche plus approfondie d'un point de vue vasculaire et l'implication de Txnip, une protéine à l'interface entre le stress oxydant et le métabolisme du glucose sera donc envisagé. Pour expliquer les effets bénéfiques du resvératrol, l'activation de la voie des sirtuines pourrait être une hypothèse à privilégier. Pour explorer cette hypothèse, une collaboration a été entreprise avec l'équipe du Pr Vincent Procaccio (équipe UMR CNRS 6214-INSERM U1083) donnant lieu à un article actuellement en révision dans *Journal of Biological Chemistry* (Cf. Annexe).

Ce travail a permis également de mettre en évidence les effets délétères d'un régime enrichi en protéines et pauvre en glucides chez la souris très âgée. En particulier en aggravant l'insulino-résistance déjà présente chez la souris âgée possiblement par une augmentation des acides gras libres en rendant la souris encore plus susceptible à l'athérosclérose. Les conséquences artérielles sont importantes via l'accroissement du stress oxydant et de l'inflammation avec des altérations fonctionnelles en termes de distensibilité aortique. Les effets de ce régime seront étudiés dans d'autres tranches d'âge afin d'explorer si les effets délétères observés sont propres à ce grand âge ou non. Enfin, le resvératrol amplifie les effets délétères du régime riche en protéines et pauvre en carbohydrates, avec une aggravation de l'insulino-résistance, une altération du profil lipidique et une inflammation systémique. Les conséquences fonctionnelles artérielles sont également importantes avec une diminution de la réactivité vasculaire et de la distensibilité aortique. Ainsi, ces résultats montrent les effets ambivalents du resvératrol dans le grand âge en fonction de la stratégie nutritionnelle adoptée.

ARTICLE 2

Régime enrichi en protéines - pauvre en glucides : les effets délétères métaboliques et cardiovasculaires dépendent de l'âge

Stéphanie Baron*, Tatiana Bédarida*, Emilie Vessières, Françoise Vibert, Audrey Ayer, Marie-Madeleine Strelcyn, Daniel Henrion, Jean-Louis Paul, Florence Noble, Jean-Louis Golmard, Jean-Louis Beaudeux, Charles-Henry Cottart, Valérie Nivet-Antoine

Résumé

Les régimes enrichis en protéines et pauvres en glucides sont de plus en plus répandus et utilisés dans le cadre d'un objectif de contrôle de poids. Pourtant, des conséquences délétères ont déjà été évoquées, en particulier dans le cadre du métabolisme glucidique. Notre premier travail sur les souris très âgées a mis en évidence une insulino-résistance associée à une dysfonction artérielle majorée lors de l'utilisation d'un tel régime. L'objectif de ce travail a été d'explorer si les effets délétères observés sont liés à l'âge. Pour cela, des souris jeunes et des souris adultes sont soumises pendant trois mois à ce régime. Alors que la souris jeune ne présente pas de modifications métaboliques ou cardiovasculaires notables, la souris adulte, quant à elle, montre une intolérance au glucose majeure avec une augmentation de la résistinsémie et une hypertriglycémie. Ces altérations métaboliques sont à l'origine de la dégradation des fonctions artérielles et cardiovasculaires observées chez la souris âgée. Elles semblent être la conséquence d'un stress oxydant et d'une inflammation artériels majeurs. Les artères mésentériques sont très affectées, alors que l'aorte conserve ses fonctions malgré le défaut de biodisponibilité du NO par une synthèse probablement accrue de prostacycline I₂ par la cyclo-oxygénase 2. Ainsi, ce travail met en évidence, et ce pour la première fois, les effets délétères âge-dépendant d'un régime enrichi en protéines et pauvre en glucides, aussi bien au niveau métabolique que cardiovasculaire et souligne la nécessité de maintenir des apports équilibrés, même dans l'optique de contrôle du poids.

Cet article a été soumis dans *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular diseases*.

Manuscript

[Click here to view linked References](#)

High protein - low carbohydrate diet: deleterious metabolic and cardiovascular effects depend on age

S. Baron ^{a,b,1,*}, T. Bedarida ^{a,1}, E. Vessieres ^c, F. Vibert ^a, A. Ayer ^c, M-M. Strelcyn ^a, D. Henrion ^c, J-L. Paul ^{d,e}, F. Noble ^f, J-L. Golmard ^g, J-L. Beaudoux ^{a,h}, C-H. Cottart ^{a,h}, V. Nivet-Antoine ^{a,d}

^a Viva Team – EA 4466, Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^b Department of Physiology, Georges Pompidou European Hospital, APHP, Paris, France

^c CNRS UMR 6214, INSERM U1083, Angers University, France.

^d Department of Biochemistry, Georges Pompidou European Hospital, APHP, Paris, France

^e EA 4529, Faculty of Pharmacy, Paris Sud University, Chatenay-Malabry, France

^f INSERM 705 CNRS UMR8206, Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^g ER4/EA 3974, Modeling in clinical research, Pierre and Marie Curie University, Paris, France

^h Clinical Biochemistry, Necker Hospital, APHP, Paris, France

* Corresponding author: Tel: + 33 1 56 09 28 66; fax: +33 1 56 09 26 75; E-mail adress: stephanie.baron@egp.aphp.fr (S. Baron)

¹ S. Baron and T. Bedarida contributed equally to this work

Manuscript word count: 3192

Abstract word count: 249

Figures: 3

Table: 1

Key words: cardiovascular disease, glucose intolerance, high protein - low carbohydrate diet

Abstract

Background and aims: High protein - low carbohydrate (HP-LC) diets have become widespread. Yet their deleterious consequences, especially on glucose metabolism and arteries, have already been underlined. A previous study has already shown glucose intolerance with major arterial dysfunction in very old mice subjected to an HP-LC diet. The hypothesis of this work was that this diet had an age-dependent deleterious metabolic and cardiovascular outcome.

Methods and results: Young (three months old) and adult (six months old) mice, were subjected for three months to a standard or an HP-LC diet. Glucose and lipid metabolism was studied. The cardiovascular system was explored from the functional stage with Doppler-echography to the molecular stage. Young mice did not exhibit any significant metabolic modification, whereas adult mice presented a marked glucose intolerance associated with an increase in resistin and triglyceride levels. These metabolic disturbances were responsible for arterial damage only in the adult mice, with decreased aortic distensibility and left ventricle dysfunctions. These seem to be the consequence of arterial dysfunctions, with major arterial oxidative stress and inflammation. Mesenteric arteries were the worst affected, whereas aorta function seemed to be maintained with an appreciable role of COX 2 to preserve endothelial function.

Conclusion: This study highlights for the first time the age-dependent deleterious effects of an HP-LC diet on both metabolism, with major glucose intolerance and lipid disorders, and vascular and cardiac functions. This work shows the danger of such a diet in weight control, and underlines the need for balanced nutrient intakes.

Introduction

Change in Western lifestyle, with an increasingly fat-rich diet and decreased physical activity, has led to increased overweight and obesity prevalence. Type 2 diabetes and metabolic syndrome have now become endemic [1], leading to increased cardiovascular morbidity and mortality [2]. This trend does not concern only mature adults, but also teenagers and young adults, in whom the prevalence of diabetes and overweight has been increasing [3]. Certain nutritional strategies have become more and more prevalent, such as high protein - low carbohydrate (HP-LC) diets [4]. However, their deleterious outcome on glucose metabolism and arteries have already been underlined [5, 6]. Our previous study had already shown that such a diet could become deleterious in a mouse model of aging, with major metabolic disturbances and cardiovascular alterations [7]. Our hypothesis here was that metabolic, and more importantly cardiovascular consequences of an HP-LC diet, could depend on age. To explore this hypothesis, mice 3 months old (young) and 6 months old (adult) were subjected to an HP-LC diet for three months. The outcome of the HP-LC diet was evaluated as regards their metabolic and cardiovascular effects from functional stage (by Doppler-echography analysis) to molecular stage of endothelial dysfunction (with *ex vivo* arterial experiments and molecular characterization).

Methods

Animals and diets

C57BL/6J male mice (three and six months old) were obtained from Janvier (Le Genest-St-Isle, France), and treated in compliance with the European Parliament and Council Directive 2010/63/EU. They were housed in a temperature- and humidity-controlled room with a 12 h/12 h light-dark cycle, and had food and water *ad libitum*. After 10 days of adaptation, the mice were randomized according to the two diets for the next 12 weeks: a standard diet M20 (SDS), delivering an 18% protein supply as given to adult mice in the animal care unit, or a high protein - low carbohydrate (HP-LC) diet (Certificate U8954, Safe) delivering a 28% protein supply associated with 72% fat (corn oil and lard) and less than 1% carbohydrate, as energy content. Young mice 3 months old were fed for three months with a standard diet (YS) ($n = 10$), or an HP-LC diet (YD) ($n = 10$). Adult mice 6 months old were fed

for three months with a standard diet (AS) ($n = 20$), or an HP-LC diet (AD) ($n = 20$). Mice were weighed every two weeks throughout the three months of the study. All the animal procedures and protocols used here were approved by the Paris Descartes University ethics committee (Protocol No. CEEA34.SB.008.12).

Glucose tolerance test

At the end of the trial, after a six-hour fasting period (6–12 a.m.), blood samples were taken from tail sections, and glucose levels were measured using a glucometer (One Touch Easy, Life Scan). Glucose tolerance test (GTT) was then assessed by injecting intra-peritoneally 2 mg/g body weight glucose (G30 Aguettant) as previously described [7]. Blood glucose was measured every 30 minutes during the two hours after glucose injection. Blood glucose concentrations were assessed both as individual time points and as an integrated area under the full GTT curve.

Metabolic measurements

Blood samples were clotted for 30 min and centrifuged for 10 min at 2000g. Serum triglycerides, cholesterol and HDL-cholesterol were measured with DxC800[®], Beckman[®]. HDL fractions were measured with a Lipoprint[®] HDL kit (Eurobio[®]). A liquid-phase multiplexed technique (Luminex Bioplex[®], Biorad[®]) was used to determine systemic insulin and resistin levels (Mouse Serum Adipokine-2-plex kit). The insulin resistance index HOMA-IR was calculated.

Locomotor activity

Twelve weeks after the beginning of the trial, for 30 minutes, locomotor activity was evaluated in an actimeter (Immetronic, Pessac, France) composed of eight cages (34 × 21 × 19 cm) under low illumination (<5 lux) as described previously [8]. Measurements were started 5 min after introducing the animals into the actimeter, and horizontal and vertical activities were automatically recorded for 25 min.

Doppler echography

Doppler echography was carried out on anesthetized mice (isofluran inhalation, induced at 3.5% then maintained with 1.5%) with an ultrasound biomicroscope (Vevo 770® Visual Sonic®). Aortic diameters were measured continuously to calculate intima-media thickness in diastole: (adventitia-adventitia distance – internal diameter)/2. Aortic distensibility was calculated as [(systole diameter – diastole diameter)/diastole diameter]. Heart dimensions were measured in systole and diastole to calculate several parameters: left ventricular posterior wall thickening, shortening fraction, ejection fraction and cardiac flow. Heart rate was obtained with an electrocardiogram.

Blood pressure measurements

Mice were anesthetized (isofluran inhalation, induced at 5%, and then maintained with 2%). Arterial blood pressures were measured with a catheter in the carotid artery. Systolic, diastolic and mean blood pressures were recorded with AcqKnowledgeR software.

Arterial reactivity experiments

Aorta and mesenteric artery vasoreactivity experiments were carried out as previously described [9]. Briefly, 2 mm-long segments of thoracic aorta and second-order mesenteric artery were dissected out and mounted on a wire myograph. Two wires were inserted into the lumen of the arteries, and fixed to a force transducer and a micrometer, respectively. The arterial segments were bathed in a 5 mL organ bath containing a physiological salt solution maintained at a pH of 7.4, a pO₂ of 160 mmHg and a pCO₂ of 37 mmHg. Optimal wall tension was then applied, and artery viability was tested using a potassium-rich solution (80 mmol/L). After washout, a cumulative concentration-response curve for the endothelium-dependent vasorelaxing agent acetylcholine (10⁻⁹ to 10⁻⁵ mol/L) was plotted before and after pretreatment with the combination of the superoxide dismutase analog 1-oxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine (tempol, 10⁻⁵ mol/L, 20 min) plus catalase (80 U/mL, 20 min), the combination of the tetrahydrobiopterin (BH₄, 'NO synthase cofactor) plus L-arginin ('NO donor) or the selective COX 2 inhibitor CAY 10404 (10⁻⁵ mol/L, Cayman).

Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis

Frozen segments of aorta and mesenteric arteries were crushed with an Ultra-Turrax J25 mill (Fisher-Bioblock) for 1 min in Trizol (Invitrogen). RNA was extracted as previously described [7]. An aliquot of 1 µg of total RNA was treated with DNase I (Invitrogen) and converted into complementary DNA (cDNA) using Superscript II reverse transcriptase, oligo (dT)₁₂₋₁₈ primers, and RNaseOUT recombinant ribonuclease inhibitor (Invitrogen). cDNA products were subjected to real-time polymerase chain reaction (ABI 7900HT Fast Real-Time PCR). Quantitect SYBR Green PCR and Quantitect primer assay kits (Qiagen) were used to quantify IL1, TNF α , COX 2, p47-phox (NADPH oxidase sub-unit), NOS III, and TRX 1 gene expressions. All the reactions were carried out in triplicate in a final volume of 20 µL, following the manufacturer's instructions. Ribosomal Protein L4 was used as a housekeeping gene after a validation step to verify equal loading of RNA and cDNA for the reverse transcription and PCR reactions. Data were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen).

IL1, NADPH oxidase and Trx1 aorta and mesenteric artery labeling

Segments of aorta and mesenteric arteries were embedded in Tissue Tek OCT Compound, frozen at -40 °C and stored at -80 °C. Sections 20 µm thick were incubated with a primary antibody raised against IL1 (rabbit polyclonal Abcam), p47-phox (NADPH oxidase subunit) (rabbit polyclonal Santa Cruz), or Trx1 (mouse monoclonal Abcam). Labeling was visualized with Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG (Invitrogen). The endothelium was labeled with rat monoclonal anti-CD31 antibody (BD Pharmingen), and visualized with Alexa Fluor 555 goat anti-rat IgG. Nuclei were counterstained with To-Pro3 (Invitrogen). Negative controls (primary antibodies substituted by non-immune IgG isotype) did not yield any detectable labeling. Images were recorded on a Leica TCS SP2 confocal microscope. Each endothelial protein expression was quantified using NIH ImageJ software. Three sections of each aorta were recorded, and four independent sectors of each section were analyzed. Protein staining intensities were measured within the endothelium and divided by surface area to give fluorescence density values (in fluorescence intensity units/µm²).

Statistical analyses

Mann-Whitney tests were used to compare YD with YS mice, and AD with AS mice respectively (GraphPad Prism®). Results were expressed as means $\pm$ SEM; statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

Longitudinal study

For overall survival, young mice fed standard diet (YS) and HP-LC diet (YD), and adult mice fed standard diet (AS) exhibited 100% survival at day 84, while adult mice fed HP-LC diet (AD) exhibited 84.6% survival. The two deaths occurred at around three weeks after the HP-LC diet introduction. YS and YD mice exhibited a similar pattern with 17.7% and 16.3% weight increase respectively (Figure 1A). In adult mice, AD mice exhibited a significant weight decrease at day 14 compared with their initial weight (-4.0% , $p < 10^{-4}$), while AS mice exhibited weight increase ($+2.7\%$, $p < 0.05$). At day 84, weight increase was similar in AS and AD mice (respectively $+10.9\%$ and $+8.7\%$).

Glucose regulation

No significant difference was observed between the responses of YS and YD mice to the glucose tolerance test (GTT) (Figure 1B). In adult mice, compared with the AS group, AD mice exhibited increased glycemia at each time, leading to a greater area under the curve ($+57\%$) during the GTT. To explore the difference between AS and AD mice, glucose regulation parameters were analyzed. Compared with AS mice, the AD group showed no modification in fasting glycemia (10.1 ± 0.4 vs. 10.6 ± 0.4 mmol/L), insulin level (261.2 ± 33.8 vs. 249.1 ± 33.6 ng/mL), or HOMA-IR (3.12 ± 0.35 vs. 3.10 ± 0.43), but exhibited a 47% increased resistin level (889.2 ± 66.7 vs. 1307.0 ± 89.0 ng/mL; $p < 0.01$).

Lipid profile

Compared with the YS group, YD mice did not exhibit any modification in triglyceride serum level, but had increased HDL-cholesterol and total cholesterol levels (+75% and +61% respectively) with no modification in non-HDL cholesterol level (Figure 1C & D). Compared with AS mice, the AD group exhibited increased triglyceride, total cholesterol, HDL cholesterol and non-HDL cholesterol levels (respectively +48%, +50%, +26% and +74%). For the HDL subfraction, only the large HDL cholesterol part increased (+7.8 points, $p < 0.05$), while the non-large HDL part decreased (-8.4 points, $p < 0.05$).

Doppler echography

Compared with the YS group, YD did not exhibit any modification in cardiac parameters or in vascular parameters (Table 1). Compared with AS mice, AD mice exhibited decreased ejection fraction and shortening fraction by 3.2 and 2.6 points respectively, with no modification in posterior wall thickening. AD mice also exhibited decreased aortic distensibility (-32%), with a trend toward increase intima-media thickness compared with AS mice.

Blood pressure measurements

AD mice exhibited similar blood pressure values to AS mice: systolic (89.6 ± 0.8 vs. 86.9 ± 1.7 mm Hg), diastolic (72.8 ± 1.8 vs. 72.3 ± 2.1 mm Hg), and mean (83.2 ± 1.2 vs. 80.4 ± 1.8 mm Hg).

Locomotor activity

During the 25 minutes of the test, both horizontal and vertical activities were decreased in AD mice compared with the AS group, with respectively 205.6 ± 24.5 vs. 285.5 ± 21.6 for locomotion ($p < 0.01$) and 76.1 ± 14.2 vs. 109.4 ± 13.7 for rearing ($p < 0.05$).

Arterial molecular exploration

Arterial reactivity experiments

Compared with the AS group, AD mice exhibited decreased acetylcholine-induced relaxation in mesenteric resistance arteries, while no modification was observed in the aorta (conduction artery) (Figure 2A). After incubation with catalase and tempol, acetylcholine-mediated relaxation was improved in AD mice, suggesting that oxidative stress reduced relaxation (Figure 2B). In addition, incubation of aortas with BH₄ and L-arginin deteriorated relaxation in AD mice (Figure 2C). Also, incubation of the arteries with the COX 2 inhibitor CAY 10404 improved relaxation (Figure 2D).

Aorta molecular phenotype

Compared with the AS group, AD mice exhibited an increased inflammation gene expression for IL1, TNF α (12.8-fold, $p < 0.001$) and COX 2 (2.8-fold, $p < 0.05$) (Figure 3A). For oxidative stress mediators, no modification was observed for p47-phox, TRX1 or NOS III gene expression (Figure 3B & C).

For endothelial protein expression in aorta, compared with AS mice, the AD group exhibited increased IL1 and p47-phox subunit expression by 102% and 30% respectively, while Trx1 protein expression decreased by 20%.

Mesenteric artery molecular phenotype

For mesenteric artery molecular phenotype, inflammation gene expression (IL1, TNF α) was not changed in AD mice compared with the AS group, while COX 2 gene expression decreased 2.6-fold ($p < 0.05$) (Figure 3A). AD mice exhibited increased p47-phox gene expression with no change in NOS III gene expression compared with AS mice (Figure 3B). TRX1 expression was decreased (Figure 3C).

For endothelial protein expression in mesenteric arteries, compared with AS mice, AD mice exhibited increased IL1 and p47-phox subunit by 55% and 118% respectively; Trx1 endothelial protein decreased by 53% (Figure 3).

Discussion

The high protein - low carbohydrate (HP-LC) diet is in common use [10, 11]. However, such a diet may become deleterious, depending on the context in which it is used, as underlined by our previous study on very old mice [7]. To explore the age-related effects of a chronic HP-LC diet, its metabolic and cardiovascular consequences were studied in young and adult mice.

In young mice, no change in glucose tolerance or in triglyceride level induced by HP-LC was observed. An increased cholesterol level was reported, but this dyslipidemia seemed to have no deleterious outcome in terms of cardiovascular aging as shown by vascular and cardiac Doppler-echography results. These results are in line with those of a previous study showing that dyslipidemia had no effect on the endothelial function in 3-month-old mice [12]. The pathways involved in the dilation of mouse arteries evolved during maturation and aging, demonstrating that the endothelial biology is dynamic with time and most likely results from time-dependent injuries and repairs [13].

High protein - low carbohydrate diet induced insulin resistance in adult mice

The HP-LC diet introduction was responsible for an early weight loss during the first two weeks, probably explaining why such diets are used to control body weight [14]. However, after three months, this diet did not induce weight loss. Caloric intakes were not statistically different in HP-LC and standard fed mice (data not shown). Energy intake should be more important than carbohydrate intake in inducing weight loss [15], and food efficiency seems better with HP-LC diet than with any other type of diet such as standard diet or high fat - high protein diet, as underlined in the work of Morens [16]. After three months of HP-LC diet, glucose homeostasis was explored with a glucose tolerance test that exhibited a glucose intolerance state in adult mice. The glucose regulation alteration observed in adult mice was confirmed by the increased resistin level, even though insulin level and HOMA-IR were unchanged. These data are in line with the findings of Morens [16]. This increased resistin level is closely correlated to insulin resistance [17], and could be responsible for a decrease in AMPK activity, as suggested by numerous studies [18, 19]. Also, decreased AMPK activity associated with the low carbohydrate supply offset by an increase in fat supply, may lead to an increase in free fatty acid levels, and contribute to insulin resistance [6]. The combination of glucose intolerance and

hypertriglyceridemia might be the outcome of an increase in free fatty acid level [20, 21]. The lack of carbohydrate intake could also lead to a decrease in glycogen storage, and thus to a decrease in locomotor activity [22, 23]. Regarding cholesterol profile, HP-LC fed mice exhibited increased cholesterol levels compared with the control group. With regard to cholesterol fraction distribution, we observed a shift from non-large to large HDL fractions. This increase in low density lipoprotein fractions could be responsible for an increased lipoprotein lipase activity, leading to an increase in fatty acid production, as already underlined [5]. In addition, large HDL fractions are enriched with apolipoprotein E, and bind to LDL receptors with high affinity; large HDL fractions may increase atheromatous risk under this type of diet, as already suggested [24]. Furthermore, HDL cholesterol: total cholesterol ratio was reduced, which may be predictive of increased susceptibility to atherogenesis [25].

High protein - low carbohydrate diet disrupts cardiovascular functions in adult mice

Many studies report a lack of adverse effects of HP-LC diet on cardiovascular risk factors [11, 26], but a few have already pointed to deleterious outcome [6]. . Such a diet used for a long period induced cardiac function deterioration. The same diet used for three months in older mice (25 months old) led to an even more serious cardiac phenotype, with decreases in fraction shortening and ejection fraction associated with a lower posterior wall thickening compared with matched aged mice fed a standard diet (data not shown). These cardiac impairments could be the consequences of arterial damage induced by the HP-LC diet, with a decreased aortic distensibility and a strong trend toward increased intima-media thickness. Blood pressure was unchanged in AD mice. Medial calcification (atomic absorption spectrometry), and collagen content (Sirius red staining) were not modified, and hence cannot be responsible for these changes (data not shown). Endothelial dysfunction may be implicated in arterial damage. Local arterial inflammation could be responsible for this endothelial dysfunction. In adult mice fed an HP-LC diet, inflammation was evidenced by the marked induction of pro-inflammatory cytokines in arteries. Also, the increased oxidative stress could be involved in the endothelial dysfunction, and arise from the decrease in Trx1 expression or/and of the increase in NADPH oxidase expression, as previously suggested [27]. Vascular reactivity was assessed both in the aorta and in mesenteric resistance arteries of adult mice. In contrast to mesenteric arteries,

acetylcholine-mediated dilation was not affected by HP-LC in the aorta of AD mice. Mesenteric artery acetylcholine-induced relaxation was reduced. Oxidative stress was involved in the vascular dysfunction, as catalase and tempol improved acetylcholine-mediated relaxation. The combination of tempol, a SOD mimetic, and catalase reduces ROS concentration, and hence oxidative stress [28]. This higher ROS level might lead to NOS III uncoupling, as suggested by the effect of BH₄-L-arginin, which deteriorated acetylcholine-mediated relaxation in AD mice. This result is in line with those of a previous study showing that *N*-acetyl cysteine improved acetylcholine-induced relaxation in arteries from 12-month-old dyslipidemic mice [29]. Finally, COX 2 inhibition with CAY 10404 pre-incubation in AD mice aorta highlighted the major role played by COX 2 in dilation preservation in line with the study of Gendron et al. on renal arteries [12]. The same observation was made on our very old mice (data not shown). The increased gene expression of COX 2 also supported this hypothesis, and could lead to an increase production of prostacycline PGI₂, a potent vasodilator, that has already been implicated in endothelial-dependent dilation when the NO pathway was deficient [30].

Conclusion

To our knowledge, this study highlights for the first time the age-dependent effects of a high protein - low carbohydrate diet on both glucose and lipid homeostasis, and phenotypic vascular and cardiac outcome.

Disclosure

The authors declare that they have nothing to disclose.

Acknowledgments

We thank Chantal Martin and all the technicians at the animal facility (IMTCE - Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University) for animal care, the Cellular and Molecular Imaging Platform of the IFR 71- IMTCE Institute, Small Animal Imagery Platform (PIPA, Cochin Institute), Dr Philippe Bonnin

and Prof Alain Jardel for their valuable advice. We thank ATT for language editing. This work was supported by funds from the French Ministry of Research and Technology under a 4-year contract (EA 4466, 2010-2013).

References

- [1] Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001;414:782-7.
- [2] Bodegard J, Sundstrom J, Svennblad B, Ostgren CJ, Nilsson PM, Johansson G. Changes in body mass index following newly diagnosed type 2 diabetes and risk of cardiovascular mortality: A cohort study of 8486 primary-care patients. *Diabetes & metabolism*. 2013.
- [3] Park MH, Sovio U, Viner RM, Hardy RJ, Kinra S. Overweight in childhood, adolescence and adulthood and cardiovascular risk in later life: pooled analysis of three british birth cohorts. *PLoS One*. 2013;8:e70684.
- [4] Clifton P. High protein diets and weight control. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009;19:379-82.
- [5] Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Roy-Tirelli A, Thorens B. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282:E834-42.
- [6] Foo SY, Heller ER, Wykrzykowska J, Sullivan CJ, Manning-Tobin JJ, Moore KJ, et al. Vascular effects of a low-carbohydrate high-protein diet. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:15418-23.
- [7] Baron S, Bedarida T, Cottart CH, Vibert F, Vessieres E, Ayer A, et al. Dual Effects of Resveratrol on Arterial Damage Induced By Insulin Resistance in Aged Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013.
- [8] Le Marec T, Marie-Claire C, Noble F, Marie N. Chronic and intermittent morphine treatment differently regulates opioid and dopamine systems: a role in locomotor sensitization. *Psychopharmacology*. 2011;216:297-303.
- [9] Loufrani L, Dubroca C, You D, Li Z, Levy B, Paulin D, et al. Absence of dystrophin in mice reduces NO-dependent vascular function and vascular density: total recovery after a treatment with the aminoglycoside gentamicin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:671-6.
- [10] Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shahar DR, Witkow S, Greenberg I, et al. Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *The New England journal of medicine*. 2008;359:229-41.
- [11] Foster GD, Wyatt HR, Hill JO, McGuckin BG, Brill C, Mohammed BS, et al. A randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity. *The New England journal of medicine*. 2003;348:2082-90.
- [12] Gendron ME, Thorin-Trescases N, Villeneuve L, Thorin E. Aging associated with mild dyslipidemia reveals that COX-2 preserves dilation despite endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H451-8.
- [13] Gendron ME, Thorin E. A change in the redox environment and thromboxane A2 production precede endothelial dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H2508-15.
- [14] Wycherley TP, Buckley JD, Noakes M, Clifton PM, Brinkworth GD. Comparison of the effects of weight loss from a high-protein versus standard-protein energy-restricted diet on strength and aerobic capacity in overweight and obese men. *European journal of nutrition*. 2013;52:317-25.
- [15] Williams EA, Perkins SN, Smith NC, Hursting SD, Lane MA. Carbohydrate versus energy restriction: effects on weight loss, body composition and metabolism. *Annals of nutrition & metabolism*. 2007;51:232-43.
- [16] Morens C, Sirot V, Scheurink AJ, van Dijk G. Low-carbohydrate diets affect energy balance and fuel homeostasis differentially in lean and obese rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2006;291:R1622-9.
- [17] Luo Z, Zhang Y, Li F, He J, Ding H, Yan L, et al. Resistin induces insulin resistance by both AMPK-dependent and AMPK-independent mechanisms in HepG2 cells. *Endocrine*. 2009;36:60-9.
- [18] Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, et al. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science*. 2004;303:1195-8.
- [19] Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, et al. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest*. 2004;114:232-9.
- [20] Steinberg HO, Paradisi G, Hook G, Crowder K, Cronin J, Baron AD. Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production. *Diabetes*. 2000;49:1231-8.
- [21] Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, et al. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes*. 2003;52:2882-7.

- [22] Caton SJ, Bielohuby M, Bai Y, Spangler LJ, Burget L, Pfluger P, et al. Low-carbohydrate high-fat diets in combination with daily exercise in rats: effects on body weight regulation, body composition and exercise capacity. *Physiology & behavior*. 2012;106:185-92.
- [23] Phinney SD. Ketogenic diets and physical performance. *Nutrition & metabolism*. 2004;1:2.
- [24] de Silva HV, Mas-Oliva J, Taylor JM, Mahley RW. Identification of apolipoprotein B-100 low density lipoproteins, apolipoprotein B-48 remnants, and apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in the mouse. *J Lipid Res*. 1994;35:1297-310.
- [25] LeBoeuf RC, Tsao WW, Klirk E, Childs MT. Cholesterol feeding induces cholesterol-rich VLDL in atherosclerosis-susceptible mice regardless of dietary fat content. *Nutrition research*. 1993;13:549-61.
- [26] Brehm BJ, Seeley RJ, Daniels SR, D'Alessio DA. A randomized trial comparing a very low carbohydrate diet and a calorie-restricted low fat diet on body weight and cardiovascular risk factors in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:1617-23.
- [27] Katakam PV, Tulbert CD, Snipes JA, Erdos B, Miller AW, Busija DW. Impaired insulin-induced vasodilation in small coronary arteries of Zucker obese rats is mediated by reactive oxygen species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H854-60.
- [28] Bouvet C, Belin de Chantemele E, Guihot AL, Vessieres E, Bocquet A, Dumont O, et al. Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction. *Hypertension*. 2007;50:248-54.
- [29] Krummen S, Drouin A, Gendron ME, Falck JR, Thorin E. ROS-sensitive cytochrome P450 activity maintains endothelial dilatation in ageing but is transitory in dyslipidaemic mice. *Br J Pharmacol*. 2006;147:897-904.
- [30] Henrion D, Dechaux E, Dowell FJ, MacIour J, Samuel JL, Levy BI, et al. Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclo-oxygenase-2. *Br J Pharmacol*. 1997;121:83-90.

Figure 1 Metabolism profile in young and adult mice fed standard diet or high protein - low carbohydrate diet. A) Glucose tolerance test: area under curve, B) triglyceride serum level (mmol/L); C) cholesterol serum level and distribution (mmol/L); D) HDL cholesterol sub-fraction distribution (%). YD and AD (young and adult mice fed high protein - low carbohydrate diet) are compared respectively with YS and AS group (young and adult mice fed standard diet). $n = 10-15$ per group. Data are mean $\pm$ SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 10^{-4}$.

Figure 2 Concentration response curves for acetylcholine in aortic and mesenteric resistance artery segments isolated from adult mice fed standard or high protein - low carbohydrate diet. Concentration response curves for acetylcholine in AS (adult mice fed standard diet) and AD (adult mice fed high protein - low carbohydrate diet) mice (A). Experiments were repeated after incubation of the arterial segments with catalase-tempol in AD mice (B); with BH4-L. arginine (C) and with COX 2 inhibitor (CAY 10404) (D). $n = 4-8$ per group. Data are mean $\pm$ SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Figure 3 Gene and endothelial protein expression of IL1 (A), NADPH oxidase (B) and Trx1 (C) in aorta and mesenteric arteries of adult mice fed standard or high protein - low carbohydrate diet. AD (adult mice fed high protein - low carbohydrate diet) are compared with AS group (adult mice fed standard diet). $n = 4-8$ per group. Data are mean $\pm$ SEM: fold induced for gene expression and fluorescence intensity, arbitrary units for endothelial protein expression; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 10^{-4}$.

Table 1

Table 1 Cardiovascular Doppler-echography results in young and adult mice fed standard or high-protein - low carbohydrate diet

	<i>YS</i>	<i>YD</i>	<i>AS</i>	<i>AD</i>
Cardiac Doppler echography				
Heart rate (b/min)	494.0 ± 19.0	493.4 ± 16.5	461.1 ± 8.5	441.6 ± 9.8
Cardiac output (mL/min)	18.5 ± 1.6	20.0 ± 1.5	17.8 ± 0.5	17.5 ± 0.6
Posterior wall thickening (%)	22.8 ± 3.2	17.2 ± 2.4	35.57 ± 1.83	35.70 ± 3.71
Ejection fraction (%)	46.7 ± 2.7	49.12 ± 1.6	53.43 ± 1.23	50.19 ± 1.28 *
Shortening fraction (%)	23.27 ± 1.6	24.70 ± 1.0	27.66 ± 0.7	25.39 ± 0.8 *
Aorta Doppler				
Intima-media thickness (µm)	110.5 ± 7.7	110.0 ± 13.5	85.8 ± 10.2	101.7 ± 9.8
Distensibility (%)	9.0 ± 1.3	5.9 ± 1.1	9.8 ± 0.9	6.7 ± 0.9 *

n = 10–20 per group. YD and AD (young and adult fed high protein-low carbohydrate diet) mice were compared respectively with YS and AS groups (young and adult mice fed standard diet); **p* < 0.05.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

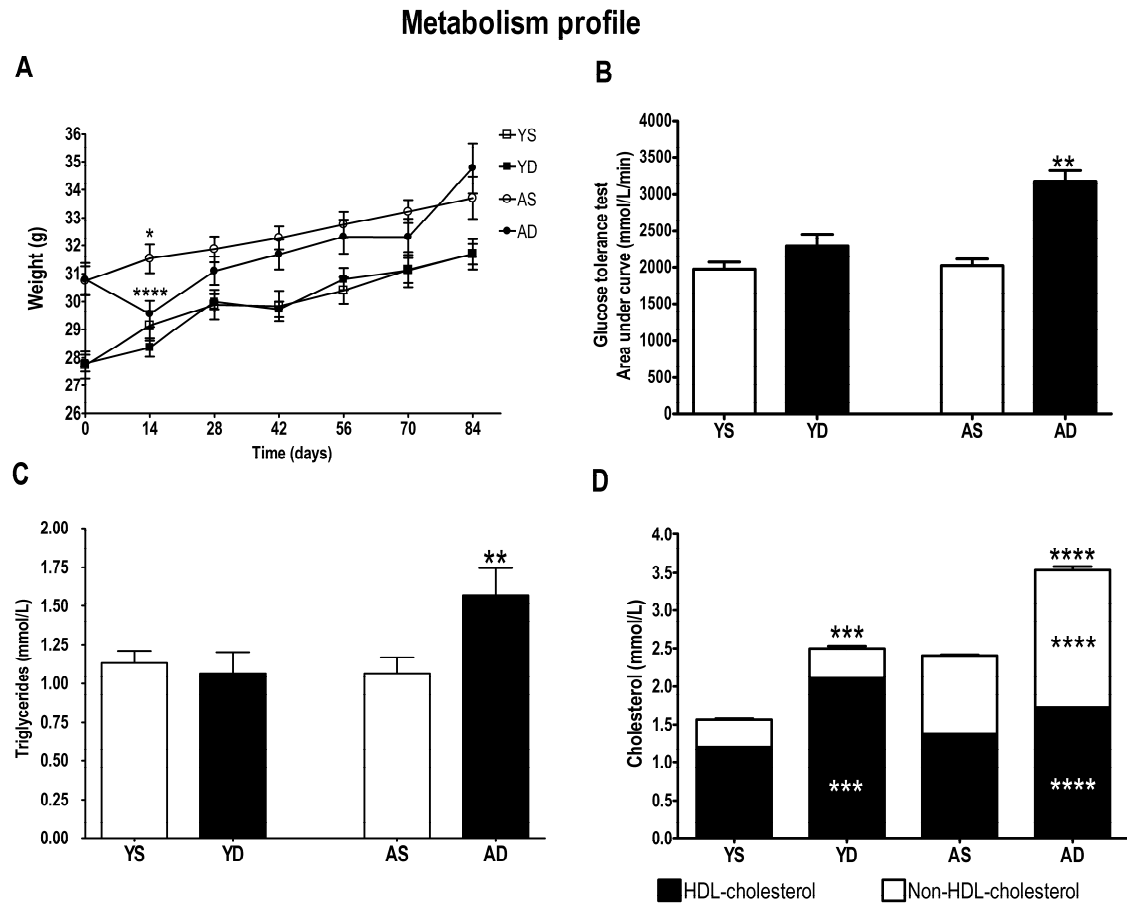


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

Arterial reactivity

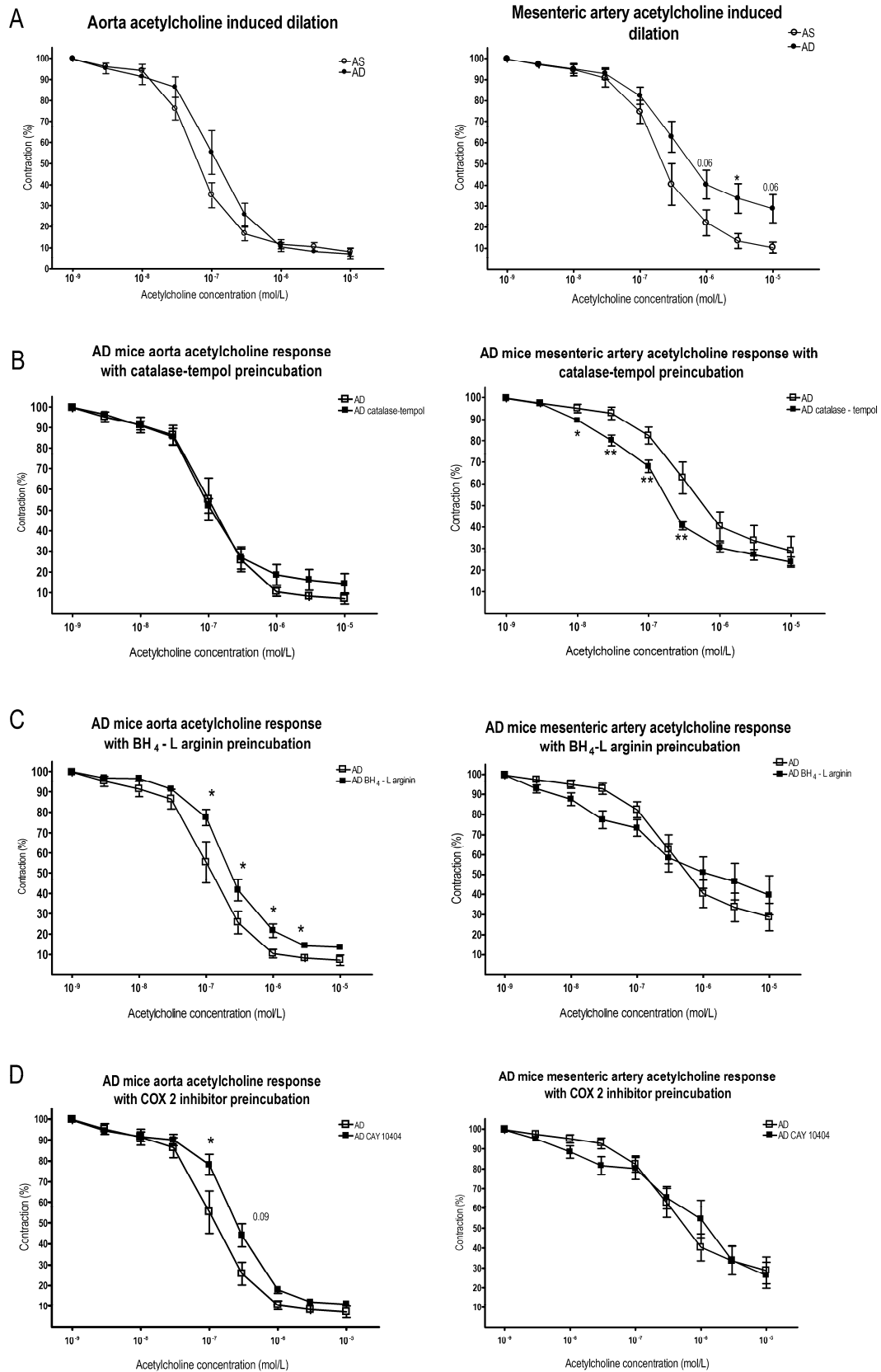
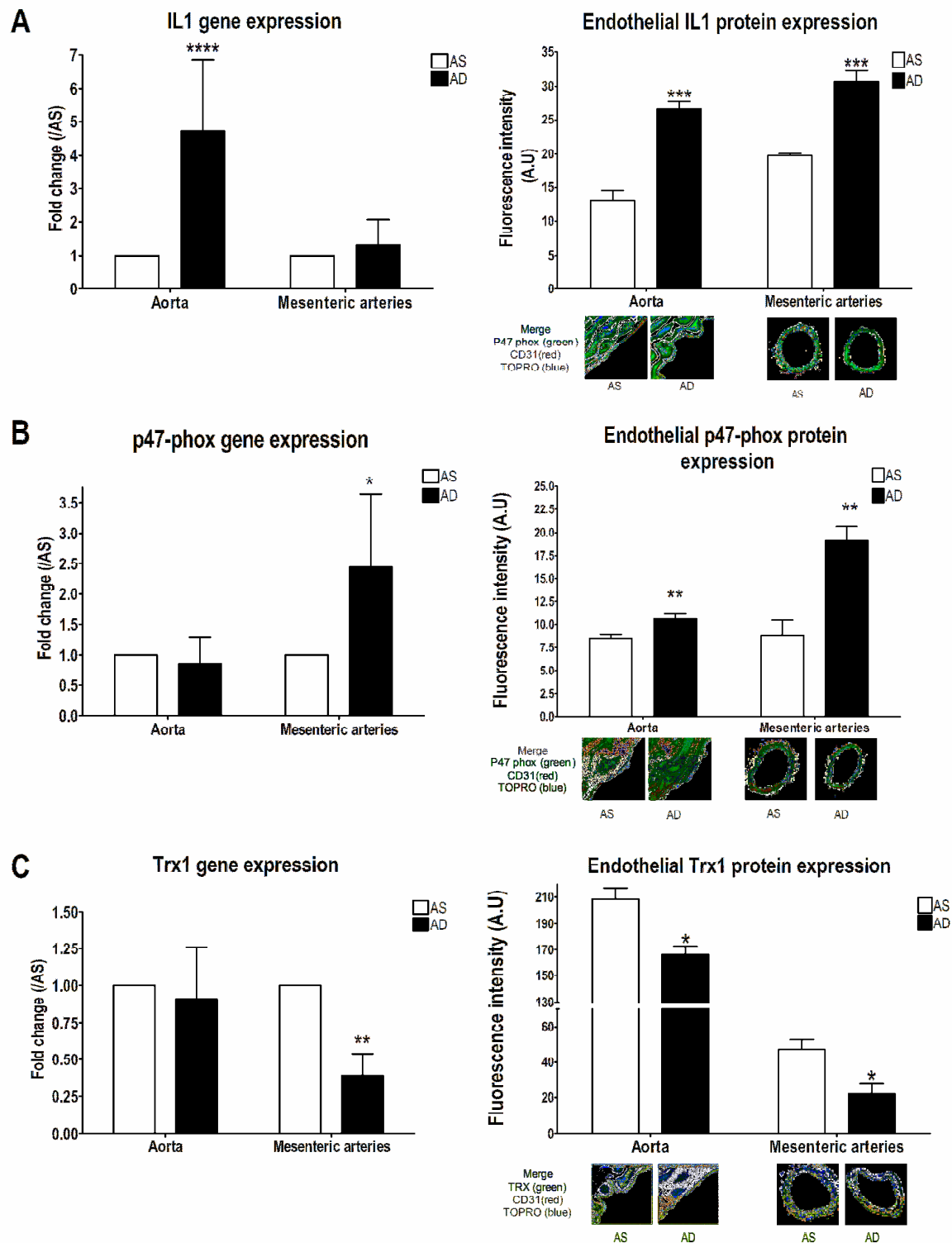


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

Aorta and mesenteric artery expression



Discussion et perspectives

Ce travail a permis de mettre en évidence qu'un régime enrichi en protéines et pauvre en glucides a des effets différents en fonction de l'âge. Si en période de croissance, aucun effet n'est visible tant sur le plan métabolique que cardiovasculaire, chez la souris adulte, en revanche, il est à l'origine d'une détérioration de l'homéostasie glucidique avec une intolérance au glucose nette et une altération du profil lipidique. Les conséquences fonctionnelles sont sévères aussi bien au niveau vasculaire avec une dégradation des fonctions artérielles caractérisée par une dysfonction endothéliale massive et une diminution de distensibilité aortique. L'exploration *ex vivo* des artères met en évidence des défauts de contractilité et de dilatation majeurs, surtout dans les artères de résistance, liés à un stress oxydant majoré par l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par la NADPH oxydase et la diminution de leur dégradation par le système thioredoxine. Sur le plan cardiaque en découle une diminution des capacités fonctionnelles en termes de fraction d'éjection. En conclusion, ce régime enrichi en protéines et pauvre en glucides semble néfaste aussi bien chez la souris adulte que chez la souris âgée et doit donc être proscrit dans le cadre de tentatives de régulation du poids. Ce travail témoigne de la nécessité d'un apport qualitatif équilibré entre les différents nutriments, glucides, lipides et protéines.

ARTICLE 3

Le resvératrol améliore le vieillissement artériel : Implication potentielle de la Thioredoxin interacting Protein (TXNIP)**Résumé**

Le vieillissement de la population est à l'origine d'une augmentation de la prévalence de l'intolérance au glucose et des pathologies cardiovasculaires. Le stress oxydant jouerait un rôle important dans ces processus. Le resvératrol, anti-oxydant polyphénolique a déjà montré des effets prometteurs dans le cadre de l'intolérance au glucose et de la dysfonction endothéliale chez le sujet âgé. La protéine TXNIP, thioredoxin interacting protein, est une α -arrestine impliquée dans l'équilibre redox et a été proposée comme un lien potentiel entre l'homéostasie glucidique et la balance redox. Dans ce travail, nous avons étudié les effets d'un traitement chronique par le resvératrol sur le phénotype artériel de la souris très âgée par une approche moléculaire et fonctionnelle. Nous avons également exploré l'implication de TXNIP dans ce processus. Nous avons mis en évidence sur un modèle murin de souris très âgées qu'un traitement de trois mois par le resvératrol diminuait le stress oxydant et le remodelage de la matrice, avec une amélioration du phénotype artériel par une diminution de l'épaisseur intima-média et par une augmentation de la distensibilité aortique. De plus, ces résultats mettent en évidence, et ce pour la première fois, une augmentation d'expression de la protéine TXNIP avec le vieillissement artériel et sa diminution induite par le resvératrol.

**Resveratrol Improves Arterial Aging:
The Potential Implication of Thioredoxin-interacting Protein (TXNIP)**

Tatiana Bedarida¹, Stéphanie Baron^{1,2}, Françoise Vibert¹, Audrey Ayer³, Daniel Henrion³, Elisabeth Thioulouse⁴, Carmen Marchiol⁵, Jean-Louis Beaudeux^{1,6}, Charles-Henry Cottart^{1,6}, Valerie Nivet-Antoine^{1,7}

¹ VIVA Team – EA 4466, Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

² Department of Physiology, Georges Pompidou European Hospital, APHP, Paris, France

³ CNRS UMR 6214, INSERM U1083, Angers University, Angers, France

⁴ Biochemistry Laboratory, Trousseau Hospital, APHP, Paris

⁵ PIPA, Cochin Institut – U1016, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁶ Clinical Biochemistry, Necker Hospital, APHP, Paris, France

⁷ Department of Biochemistry, Georges Pompidou European Hospital, APHP, Paris, France

Corresponding author: Tatiana Bedarida, PhD student, Viva Team – EA 4466, Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

Tel: + 33 1 53 73 97 95; fax: +33 1 53 73 97 99; e-mail: tatiana.bedarida@parisdescartes.fr

Abstract**Background and purpose:**

Aging leads to a high prevalence of glucose intolerance and cardiovascular diseases, with a potent role of oxidative stress. Resveratrol, a plant-derived polyphenol with antioxidant properties, has shown promising effects on glucose tolerance with a trend toward improved endothelial function in elderly patients. Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) is an α -arrestin, involved in intracellular redox regulation and recently proposed as a potential link connecting glucose metabolism to oxidative stress. Therefore, we sought to investigate the resveratrol-induced improvement of arterial aging phenotype in very old mice and to study the potential implication of TXNIP in arterial aging.

Experimental approach:

Using an *in vivo* model of very old mice, with or without a 3-month resveratrol treatment, we investigated the effects of resveratrol on age-related impairments from a cardiovascular Doppler analysis, to a molecular level, with the study of inflammation and oxidative stress factors.

Key results:

We recorded several effects of resveratrol, with (i) a decrease oxidative stress imbalance (ii) a reduced matricial remodeling and (iii) a forestalling of arterial aging phenotype in terms of intima-media thickness and arterial distensibility. Moreover, these results suggest for the first time that TXNIP emerging protein is increased in the arterial aging and reduced by the resveratrol treatment.

Conclusions and implications:

The current study demonstrated that resveratrol led to the restoration of several aging-impaired processes in very old mice with a potential implication of TXNIP.

Keywords: Resveratrol; Arterial aging; Oxidative stress; Thioredoxin-interacting protein; Glucose intolerance

Introduction

Aging is associated with a wide range of physiological deterioration, such as glucose homeostasis deregulation and appearance of arterial dysfunction. In many countries, the proportion of older people is increasing, especially the age group ≥ 80 years with polypathologies. However, there is a lack of data in very old human or animal population, due to the difficulty of this kind of studies. To date, impaired glucose tolerance (IGT) is a characteristic defect of very old people, without therapeutic approach, affecting about 34% of the age group ≥ 60 years (Cowie *et al.*, 2006). IGT constitutes a major risk factor for cardiovascular diseases, which remain the main cause of death with an age-induced prevalence. The mechanisms by which aging increases risk of cardiovascular diseases remain incompletely understood, but the development of vascular endothelial dysfunction is believed to be a major contributor (Lakatta *et al.*, 2003; Seals *et al.*, 2011). Several studies suggest the important role of oxidative stress in the occurrence of impaired glucose tolerance and arterial aging (Hebert-Schuster *et al.*, 2011; Nivet-Antoine *et al.*, 2013).

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a plant-derived polyphenolic compound that has pleiotropic effects, but is mainly known for its antioxidant and anti-inflammatory properties (Hassan-Khabbar *et al.*, 2008; Hassan-Khabbar *et al.*, 2010; Cottart *et al.*, 2013). A recent human pilot study claims that resveratrol lowers the post-meal glucose peak in elderly patients with IGT and shows clinically relevant effects on glucose metabolism as well as a trend to improve endothelial function (Crandall *et al.*, 2012). Authors proposed resveratrol as a new therapeutic strategy. However, the aortic molecular modifications, which led to endothelial dysfunction or the consequences in terms of functional aortic events, such as matricial remodeling or aortic distensibility remain unclear.

A previous study performed in our laboratory demonstrated a beneficial effect of resveratrol on Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) expression in an oxidative stress context (Nivet-Antoine *et al.*, 2010). TXNIP was initially identified as an endogenous inhibitor of thioredoxin (TRX), known as one of the major thiolreductase systems, protecting cells by scavenging reactive oxygen species (ROS) (Junn *et al.*, 2000). TXNIP is also an α -arrestin and a physiological regulator of glucose metabolism (Parikh *et al.*, 2007). Given that TXNIP deletion preserves insulin sensitivity and that TXNIP may depress thioredoxin activities in cells (Wang *et al.*, 2002; Chutkow *et al.*, 2010), a current hypothesis has

emerged where by TXNIP could be a crucial link connecting glucose metabolism to oxidative stress (Schulze *et al.*, 2004). In addition, TXNIP seems to be involved in the aging process, in the light of an inverse correlation between TXNIP expression and longevity (de Candia *et al.*, 2008; Mousa *et al.*, 2009). However, to our knowledge, a potential link between TXNIP and the anti-age resveratrol effects has never been considered. As we have previously shown a beneficial effect of resveratrol on glucose metabolism in very old mice, we hypothesised that resveratrol could improve arterial aging with a possible role of TXNIP.

The aim of this study was to investigate the effects of resveratrol on arterial age-related impairments in a very old population of mice. We demonstrated that resveratrol mediates anti-oxidative and remodeling responses, thereby providing significant protection against arterial aging with a possible role of TXNIP.

For Peer Review

Methods

Experimental animals

C57BL/6J male mice (6 months old and 22 months old) were obtained from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). They were treated as prescribed in European Parliament and Council Directive 2010/63/EU. They were housed in a temperature- and humidity-controlled room with a 12 h/12 h light/dark cycle and free access to water and food. After 10 days of adaptation, they were randomized into three groups according to age and resveratrol treatment for the 12 weeks: a control group Control (9-month-old mice fed with a standard diet, $n = 20$), a control resveratrol group CR (9-month-old mice with a standard diet plus resveratrol added to the food, $n = 20$), an old group O (25-month-old mice with a standard diet, $n = 20$) and an old resveratrol group OR (25-month-old mice with the standard diet plus resveratrol added to the food, $n = 20$). This protocol was approved by the local ethics committee (Registration numbers: P2.VNA.060.08 and CEEA34.SB.008.12).

Doppler ultrasound imaging

Doppler ultrasound imaging was carried out on anesthetized mice (isoflurane inhalation, induced at 3.5%, then maintained with 1.5%) with an Ultrasound Biomicroscope (Vevo 770, Visual Sonics), using the RMV-704 and RMV-707B probes (central frequency 40 and 30 MHz, respectively). Internal and external diameters of aortas were measured during systole and diastole. Thicknesses were assessed during diastole and calculated: $\text{thickness} = (\text{adventitia-adventitia distance} - \text{internal diameter})/2$. Distensibilities were calculated: $\text{distensibility} = (\text{systole diameter} - \text{diastole diameter})/\text{diastole diameter}$. Heart dimensions were measured in both systole (s) and diastole (d): left ventricular posterior wall thickness (LVPW), left ventricular internal diameter (LVID) and inter-ventricular septum thickness (IVS). Heart rates were obtained with an electrocardiogram.

Several parameters were calculated:

Left ventricular posterior wall thickening PWTh = $(\text{LVPW.s} - \text{LVPW.d}) / \text{LVPW.d}$.

Left ventricular telesystolic and telediastolic volume (Dodge method): $\text{LV Vol} = ((7.0 / (2.4 + \text{LVID})) \times \text{LVID})^3$

Ejection fraction: $\text{EF} = (\text{LV Vol.d} - \text{LV Vol.s}) / \text{LV Vol.d}$.

Cardiac flow: $CF = HR \times (LV\ Vol.d - LV\ Vol.s)$

Left ventricular mass: $LV\ mass = 0.8 \times 1,053 \times ((LVID.d + LVPW.d + IVS.d)^3 - LVID.d^3)$

Blood pressure measurements

Mice were anesthetized (isofluran inhalation, induced at 5%, and then maintained with 2%). Arterial blood pressures were measured with a catheter in the carotid artery. Systolic, diastolic and mean blood pressures were recorded with AcqKnowledge® software.

Systemic parameters

The vena cava was sectioned from anesthetized mice (5% isofluran inhalation). Blood samples were collected and stored to carry out serum parameter measurements: calcium and phosphates (Architect Ci8200®, Abbott®) as recommended in suppliers' instructions.

Aorta calcium content

As described (Henrion *et al.*, 1991), frozen segments of aortas were weighed and dried. Dry tissue samples were dissolved in nitric acid (14 N) for 3 days, then centrifuged 10 min at 2000g. Calcium was measured by atomic absorption spectrometry with the use of an air/acetylene flame at the calcium resonance wavelength of 422.7 nm (Perkin Elmer Analyst 100 Atomic Absorption Spectrometer with a multi-element hollow cathode lamp). Results were expressed in mmol of calcium/g dry tissue.

Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis

Frozen segments of aortas were crushed with an Ultra-Turrax J25 instrument (Fisher-Bioblock®) for 40 s in Trizol (Invitrogen®). RNA was extracted by Chomczynski's method (Chomczynski *et al.*, 1987). One microgram of total aortic RNA was treated with DNase I (Invitrogen®) and converted into complementary DNA (cDNA) using Superscript II reverse transcriptase, oligo (dT)₁₂₋₁₈ primers, and RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen®). cDNA products were subjected to real-time polymerase chain reaction (qPCR) using an ABI 7900HT Fast Real-Time PCR®. Quantitect SYBR Green PCR® kits and Quantitect primer assay (Qiagen®) were used to quantify matrix

metalloproteinase 2 and 9 (MMP2 and MMP9), tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP1), osteocalcin (OC), bone morphogenetic protein 2 (BMP2), matrix gla protein (MGP), osteoprotegerin (OPG), receptor activator of the NF κ B (RANK), interleukin 1 β (IL1 β), tumor necrosis factor α (TNF α), NO synthase III (NOS III), P47 phox (NADPH oxidase subunit), thioredoxin 1 (TRX1), and thioredoxin interacting protein (TXNIP) gene expressions. All the reactions were carried out in triplicate in a final volume of 20 μ L according to the manufacturer's instructions. Ribosomal Protein L4 (RPL4) was used as the housekeeping gene after a validation step to verify equal loading of RNA and cDNA in the reverse transcription (RT) and PCR reactions. Data were analyzed with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method as described by Livak and Schmittgen (Livak *et al.*, 2001).

Aorta histology and immunocytochemistry labeling

Serial sections of 5 μ m were cut along the paraffined aorta. Sections were stained with Sirius red for the visualization of collagen.

In parallel, segments of aorta were embedded in Tissue Tek OCT Compound®, frozen at -40°C and stored at -80°C . After fixing (paraformaldehyde 4%) and blocking, 20 μ m thick sections were incubated with a primary antibody raised against TNF α (rabbit polyclonal anti-TNF α , Abcam®) (1/100), P47 phox (NADPH oxidase subunit) (rabbit polyclonal anti P47 phox, Santa Cruz®) (1/200) or TXNIP (mouse monoclonal anti-TXNIP, MBL®) (1/200). Labeling was revealed with Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen®) or Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (1/200). Nuclei were counterstained with To-Pro3® (Invitrogen®) (1/500). Negative controls (primary antibodies substituted by non-immune IgG isotype) did not yield any detectable labeling. Images were recorded on a Leica TCS SP2 confocal microscope. Three sections of each aorta were recorded, and four independent sectors of each section were analyzed. Protein expressions (TNF α , P47 phox and TXNIP) were quantified using NIH ImageJ® software. Protein staining intensities were measured for each labeling, in whole aorta and for TXNIP, in nuclei to yield fluorescence density values (in arbitrary units/ μm^2).

Statistical analysis

One-way ANOVA and Dunn' multiple comparisons tests were used (GraphPad Prism®). Results were expressed as mean $\pm$ SEM; statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

For Peer Review

Results

Age-related and resveratrol-induced effects on cardiovascular Doppler measurements

With vascular Doppler, compared with the control group, old mice exhibited an increased aortic thickness (+32.7%, $p < 0.05$), with a decreased aortic distensibility (−39.2%, $p < 0.01$) (Fig 1A and 1B). Having established the age-related deleterious effects in the aortic phenotype, we next investigated the impact on cardiac function and blood pressure. For cardiac function and blood pressure assessments, old mice compared with the control group did not show any modifications in ejection fraction, posterior wall thickening or pressures (Table 1).

The control mice treated by resveratrol showed no significant differences to the control group in terms of cardiovascular doppler measurements. By contrast, our results showed that a 12-week resveratrol treatment on old mice improved aortic distensibility (+33.7%, $p < 0.05$) and tended to decrease aortic thickness (−14.3%). Further, the examination of old resveratrol mice data compared with the matched untreated group did not reveal any modification regarding cardiac function and blood pressures (Table 1).

Age-related and resveratrol-induced effects on aortic remodeling and calcification

To clarify whether aortic calcification or aortic remodeling explained the above aortic phenotypical modifications, we measured phosphatemia, calcemia (Fig. 2A), aortic calcium content (Fig. 2B), gene expression of matricial and calcification mediators (Table 2), and collagen content (Fig. 2C).

Old mice showed increased aortic calcium content (+41.8%, $p < 0.05$) (Fig. 2B), with no significant modification of calcemia and phosphatemia systemic level compared with the control group (Fig. 2A). In parallel, for calcification potent mediators, compared with the control group, no modification was observed in old mice in osteocalcin (OC), bone morphogenic protein (BMP2), matrix Gla protein (MGP), osteoprotegerin (OPG) or receptor activator of the NFκB (RANK) gene expressions (Table 2). However, old mice showed a 2.38- and 2.68-fold increase respectively in matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and tissue inhibitor of metalloproteinases1 (TIMP1) gene expression compared with the

control group ($p < 0.05$), with no change in matrix metalloproteinase 9 (MMP9). Moreover, old mice exhibited an increase in collagen contents (+10.4%, $p < 0.05$) (Fig. 2C).

Resveratrol treatment had no effect on the control group. Systemic parameters, aortic calcium content (Fig. 2) or calcification potent mediators (Table 2) in old mice were also unchanged after resveratrol treatment. Even so, old resveratrol mice presented a decreased MMP2 gene expression (2.59-fold, $p < 0.05$), with no change in MMP9 or TIMP1 gene expression (Table 2). Also, close examination of collagen contents in old mice showed a decrease of 19.3% after resveratrol treatment ($p < 0.01$) compared with the matched untreated group (Fig 2C).

Age-related and resveratrol-induced effects on aortic inflammation

As proinflammatory stimuli are known to lead to arterial aging, we next focused on a potential effect on aortic inflammation (Fig. 3A).

Old mice exhibited increased IL1 β and TNF α gene expression in aorta (respectively 2.9- and 3.8-fold, $p < 0.05$), while TNF α protein expression rose 1.7-fold ($p < 0.05$).

However, resveratrol mice did not exhibit any modification in IL1 β or TNF α expression compared with the matched untreated group.

Age-related and resveratrol-induced effects on aortic oxidative stress

Because it is well-known that aging increases oxidative stress²⁵, and resveratrol has antioxidant effects (Hassan-Khabbar *et al.*, 2008; Hassan-Khabbar *et al.*, 2010), we further investigated whether the age-related phenotypical aortic improvement induced by resveratrol resulted from a regulation of the oxidative stress (Fig. 3B).

No significant modification of NOS III and P47 phox (NADPH oxidase subunit) gene expression was observed in old mice compared with the control group. Focusing on P47 phox protein expression, results showed an increase of this protein with aging (+1.3-fold, $p < 0.05$).

The control mice treated by resveratrol showed no significant differences to the control group in terms of oxidative stress measurements.

In contrast to NOS III, P47 phox gene expression was strongly reduced (3.5-fold, $p < 0.01$) in old resveratrol mice after resveratrol treatment compared with the matched untreated group. To confirm this result, aortic protein quantification was performed. As shown in Figure 3B, P47 phox protein expression decreased 1.4-fold ($p < 0.05$) after resveratrol treatment.

Age-related and resveratrol-induced effects on aortic TRX1/TXNIP expression

Given that age and resveratrol affected the oxidative stress regulation we hypothesized that the couple TRX/TXNIP could be involved (Fig. 4).

As shown in Fig 4A, in contrast to TRX1, TXNIP gene expression increased 2.6-fold ($p < 0.05$) in old mice, compared with the control group. Old mice exhibited a 1.63-fold increase ($p < 0.01$) of total TXNIP protein expression. A recent study showed that TXNIP was maintained in the nucleus in response to inflammatory or oxidative stress stimuli (Spindel *et al.*, 2012b). In our results, an increase in nuclear TXNIP expression (+2.49-fold, $p < 0.05$) was observed in old mice aorta.

Resveratrol treatment had no effect on the control group, concerning TRX and TXNIP regulation. However, our results demonstrated that resveratrol treatment induced a 4.6-fold decrease in TXNIP gene expression in old mice ($p < 0.01$), without effect on TRX1 gene expression. Resveratrol treatment significantly reduced the nuclear TXNIP aortic contents (−1.54-fold, $p < 0.05$) in contrast to the total TXNIP protein expression compared with old mice. .

Discussion

In our previous study, data showed that very old mice presented an insulin resistance improved by the resveratrol, with a decrease of insulin level and HOMA-IR (Baron *et al.*, 2013). Further, very old mice presented an impaired glucose tolerance, reduced after a three months resveratrol treatment by speeding up glucose clearance after a glucose bolus (data not shown). These data support a recent pilot study in humans where resveratrol improved meal tolerance in older adults with impaired glucose tolerance (IGT) (Crandall *et al.*, 2012). Further, impaired glucose tolerance increased risk for developing cardiovascular disease (Ford *et al.*, 2010). In this paper, we analyzed the effects of resveratrol on cardiovascular system from phenotypical to molecular events in very old mice.

Focusing on age-related aorta phenotype, the association between arterial remodeling, increased intima-media thickness and decreased distensibility revealed aorta aging. Three months of resveratrol supplementation prevented this arterial aging achievement, without any effect on heart functions. Several hypotheses might explain these resveratrol-induced improvements on age-related aorta damages.

First, blood pressure might be the target of resveratrol as reported by Rivera, while our results showed that resveratrol didn't lead to modulate blood pressure in very old mice (Rivera *et al.*, 2009). Further, aorta remodeling and calcification have been studied, because it is well known that arterial aging is associated with medial calcifications (Shao *et al.*, 2006; Joly *et al.*, 2009). On the one hand, our data confirmed that our very old mice presented this age-related aortic calcification and remodeling. On the other hand, in agreement with a reduction in MMP2 gene expression and phenotypical fibrosis, resveratrol treatment seemed to have an impact on the aortic remodeling, regardless of any effect on calcification.

Oxidative stress is known as the first step in endothelial dysfunction in arterial aging, and could induce inflammation, matricial remodeling, leading to an increase in intima-media thickness and a decrease in aortic distensibility (Zureik *et al.*, 2000; Meaume *et al.*, 2001). Pro-inflammatory cytokine and pro-oxidative genes and proteins have been studied in the aorta; an increase in TNF α , IL1 β and NADPH oxidase, expressions in very old aortas revealed an enhanced oxidative stress and inflammatory state. Resveratrol, with its antioxidant and anti-inflammatory properties, has been reported to ameliorate the

arterial age-related oxidative and pro-inflammatory secretory phenotype (Hassan-Khabbar *et al.*, 2008; Csiszar *et al.*, 2009; Hassan-Khabbar *et al.*, 2010; Ungvari *et al.*, 2010). However, no protective effect from resveratrol treatment is observed on pro-inflammatory cytokines, suggesting that resveratrol is unable to improve these arterial aging phenotypes via the inflammation regulation in our elderly mice. By contrast, NADPH oxidase gene and protein expressions induced by aging are prevented by resveratrol treatment. In parallel, we observed that resveratrol reduced TXNIP gene expression, supporting previous data with a TXNIP down-regulation induced by resveratrol in a model of acute oxidative stress (Nivet-Antoine *et al.*, 2010). Conversely, because of TXNIP involvement in NADPH oxidase induction and ROS production, a TXNIP deficiency could protect mesangial cells from ROS increase and collagen accumulation (Shah *et al.*, 2013). Indeed, the decrease in aortic TXNIP expression induced by resveratrol in our study might be responsive to the NADPH oxidase down-regulation. In accordance with Shah, we observed a decreased collagen accumulation associated with the reduced TXNIP gene and NADPH oxidase expression, suggesting that resveratrol treatment could prevent NADPH oxidase expression and collagen accumulation via TXNIP in aorta. However, this decrease in TXNIP gene expression after resveratrol treatment is not associated with a reduced protein content in the aorta. This discrepancy might be explained by a lower proteosomal degradation induced by a decrease in Itch binding (Zhang *et al.*, 2010). This reduced degradation could be the consequence of an enhanced binding of TXNIP to TRX due to diminution of the oxidative stress. This diminished oxidative stress would lead to a decrease in nuclear TXNIP localization (Spindel *et al.*, 2012b), induced by resveratrol. TXNIP is required to drive the cytosolic TRX1 to the plasmic membrane to finally be translocated to the plasmic membrane and regulate VEGFR2 signaling, resulting in a higher cellular survival (Spindel *et al.*, 2012a). This effect of TXNIP on TRX shuttle associated with the diminished oxidative stress induced by TXNIP might lead to an improvement of matricial remodeling, leading to a marked reduction in intima media thickness, and an increase in aortic distensibility, independent of blood pressure variation (Rivera *et al.*, 2009).

Our observations reveal effects of resveratrol, with the decrease of oxidative stress imbalance, which forestalls the arterial aging phenotype, with a potent implication of TXNIP. These results suggest for the first time that TXNIP emerging protein might play a key role in arterial damages on very old mice

through a dual implication in oxidative stress and metabolic regulation. Resveratrol may possess clinically relevant effects. However, resveratrol achievements need to be explored further in a large-scale clinical trial, to evaluate its therapeutic anti-aging effects.

For Peer Review

Statement of conflicts of interest

This work was supported by funds from the French Ministry of Research and Technology under a 4-year contract (EA 4466). There are no financial or contractual agreements that might cause conflicts of interest or be perceived as causing conflicts of interest. There is no existing financial arrangement between any of the authors and a company whose product takes a prominent place in the submitted manuscript.

For Peer Review

References

- Baron S, Bedarida T, Cottart CH, Vibert F, Vessieres E, Ayer A, *et al.* (2013). Dual Effects of Resveratrol on Arterial Damage Induced By Insulin Resistance in Aged Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**(1): 156-159.
- Chutkow WA, Birkenfeld AL, Brown JD, Lee HY, Frederick DW, Yoshioka J, *et al.* (2010). Deletion of the alpha-arrestin protein Txnip in mice promotes adiposity and adipogenesis while preserving insulin sensitivity. *Diabetes* **59**(6): 1424-1434.
- Cottart CH, Nivet-Antoine V, Beaudeau JL (2013). Review of recent data on the metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans. *Mol Nutr Food Res*.
- Cowie CC, Rust KF, Byrd-Holt DD, Eberhardt MS, Flegal KM, Engelgau MM, *et al.* (2006). Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in adults in the U.S. population: National Health And Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Diabetes Care* **29**(6): 1263-1268.
- Crandall JP, Oram V, Trandafirescu G, Reid M, Kishore P, Hawkins M, *et al.* (2012). Pilot study of resveratrol in older adults with impaired glucose tolerance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **67**(12): 1307-1312.
- Csiszar A, Labinskyy N, Jimenez R, Pinto JT, Ballabh P, Losonczy G, *et al.* (2009). Anti-oxidative and anti-inflammatory vasoprotective effects of caloric restriction in aging: role of circulating factors and SIRT1. *Mech Ageing Dev* **130**(8): 518-527.
- de Candia P, Blehman R, Chabot AE, Oshlack A, Gilad Y (2008). A combination of genomic approaches reveals the role of FOXO1a in regulating an oxidative stress response pathway. *PLoS One* **3**(2): e1670.
- Ford ES, Zhao G, Li C (2010). Pre-diabetes and the risk for cardiovascular disease: a systematic review of the evidence. *J Am Coll Cardiol* **55**(13): 1310-1317.

Hassan-Khabbar S, Cottart CH, Wendum D, Vibert F, Clot JP, Savouret JF, *et al.* (2008). Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia-reperfusion: a possible strategy in liver surgery. *Liver Transpl* **14**(4): 451-459.

Hassan-Khabbar S, Vamy M, Cottart CH, Wendum D, Vibert F, Savouret JF, *et al.* (2010). Protective effect of post-ischemic treatment with trans-resveratrol on cytokine production and neutrophil recruitment by rat liver. *Biochimie* **92**(4): 405-410.

Hebert-Schuster M, Cottart CH, Laguillier-Morizot C, Raynaud-Simon A, Golmard JL, Cynober L, *et al.* (2011). Catalase rs769214 SNP in elderly malnutrition and during renutrition: is glucagon to blame? *Free Radic Biol Med* **51**(8): 1583-1588.

Henrion D, Chillon JM, Capdeville-Atkinson C, Vinceneux-Feugier M, Atkinson J (1991). 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**(4): 966-972.

Joly L, Djabbalah W, Koehl G, Mandry D, Dolivet G, Marie PY, *et al.* (2009). Aortic inflammation, as assessed by hybrid FDG-PET/CT imaging, is associated with enhanced aortic stiffness in addition to concurrent calcification. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **36**(6): 979-985.

Junn E, Han SH, Im JY, Yang Y, Cho EW, Um HD, *et al.* (2000). Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *J Immunol* **164**(12): 6287-6295.

Lakatta EG, Levy D (2003). Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation* **107**(1): 139-146.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4): 402-408.

- Meaume S, Benetos A, Henry OF, Rudnichi A, Safar ME (2001). Aortic pulse wave velocity predicts cardiovascular mortality in subjects >70 years of age. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(12): 2046-2050.
- Mousa SA, Gallati C, Simone T, Dier E, Yalcin M, Dyskin E, *et al.* (2009). Dual targeting of the antagonistic pathways mediated by Sirt1 and TXNIP as a putative approach to enhance the efficacy of anti-aging interventions. *Aging (Albany NY)* **1**(4): 412-424.
- Nivet-Antoine V, Cottart CH, Lemarechal H, Vamy M, Margail I, Beaudoux JJ, *et al.* (2010). trans-Resveratrol downregulates Txn1p overexpression occurring during liver ischemia-reperfusion. *Biochimie* **92**(12): 1766-1771.
- Nivet-Antoine V, Labat C, El Shamieh S, Dulcire X, Cottart CH, Beaudoux JL, *et al.* (2013). Relationship between catalase haplotype and arterial aging. *Atherosclerosis* **227**(1): 100-105.
- Parikh H, Carlsson E, Chutkan WA, Johansson LE, Storgaard H, Poulsen P, *et al.* (2007). TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans. *PLoS Med* **4**(5): e158.
- Rivera L, Moron R, Zarzuelo A, Galisteo M (2009). Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol* **77**(6): 1053-1063.
- Schulze PC, Yoshioka J, Takahashi T, He Z, King GL, Lee RT (2004). Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein. *J Biol Chem* **279**(29): 30369-30374.
- Seals DR, Jablonski KL, Donato AJ (2011). Aging and vascular endothelial function in humans. *Clin Sci (Lond)* **120**(9): 357-375.
- Shah A, Xia L, Goldberg H, Lee KW, Quaggin SE, Fantus IG (2013). Thioredoxin-interacting protein mediates high glucose-induced reactive oxygen species generation by mitochondria and the NADPH oxidase, Nox4, in mesangial cells. *J Biol Chem* **288**(10): 6835-6848.

Shao JS, Cai J, Towler DA (2006). Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(7): 1423-1430.

Spindel ON, World C, Berk BC (2012a). Thioredoxin interacting protein: redox dependent and independent regulatory mechanisms. *Antioxid Redox Signal* **16**(6): 587-596.

Spindel ON, Yan C, Berk BC (2012b). Thioredoxin-interacting protein mediates nuclear-to-plasma membrane communication: role in vascular endothelial growth factor 2 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**(5): 1264-1270.

Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A (2010). Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **65**(10): 1028-1041.

Wang Y, De Keulenaer GW, Lee RT (2002). Vitamin D(3)-up-regulated protein-1 is a stress-responsive gene that regulates cardiomyocyte viability through interaction with thioredoxin. *J Biol Chem* **277**(29): 26496-26500.

Zhang P, Wang C, Gao K, Wang D, Mao J, An J, *et al.* (2010). The ubiquitin ligase itch regulates apoptosis by targeting thioredoxin-interacting protein for ubiquitin-dependent degradation. *J Biol Chem* **285**(12): 8869-8879.

Zureik M, Ducimetiere P, Touboul PJ, Courbon D, Bonithon-Kopp C, Berr C, *et al.* (2000). Common carotid intima-media thickness predicts occurrence of carotid atherosclerotic plaques: longitudinal results from the Aging Vascular Study (EVA) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(6): 1622-1629.

FIGURE 1. Effects of resveratrol on age-related aortic phenotype. Aortic thickness (A) and distensibility (B) data were obtained by echocardiographic measurements from 9-month-old mice with (CR) or without (Control) and 25-month-old mice with (OR) or without (O) resveratrol treatment. Values are expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 20$). ** $p < 0.01$ O vs. Control; # $p < 0.05$ OR vs. O.

FIGURE 2. Effects of resveratrol on age-related aortic remodeling and calcification. Serum parameter measurements (A) were made: phosphatemia and calcemia levels, with $n = 8$ per group. Data for vessel calcification (B) were obtained by atomic absorption spectrometry ($n = 9-12$). Collagen contents (C) were assessed by histological staining with Sirius red ($n = 5-7$). Values were obtained for each experiment from 9-month-old mice with (CR) or without (Control) and 25-month-old mice with (OR) or without (O) resveratrol treatment, and are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ O vs. Control; ### $p < 0.01$ OR vs. O.

FIGURE 3. Effects of resveratrol on aortic inflammation (A) and oxidative stress (B)

(A) Aortic IL1 β and TNF α gene expression represented as fold change compared with the Control group; followed by quantifications of TNF α protein expression in aorta ($\times 40$), expressed as fluorescence density.

(B) Aortic NOS III and P47 phox gene expression represented as fold change compared with the Control group, followed by quantifications of P47 phox protein expression in aorta ($\times 40$), expressed as fluorescence density

$n = 10$ mice for RT-qPCR and $n = 6-8$ mice for immunohistochemistry measurement in each group.

Values are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ O vs. Control; # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$ OR vs. O.

FIGURE 4. Effects of resveratrol on aortic TRX1/TXNIP. (A) Aortic TRX 1, TXNIP gene expression represented as fold change compared with the Control group, followed by quantifications of total and nuclear TXNIP protein content in aorta ($\times 40$), expressed as fluorescence density (B). Mean $\pm$

SEM. $n = 10$ mice for RT-qPCR and $n = 6-8$ mice for immunohistochemistry measurement in each group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ O vs. Control; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ vs. O.

For Peer Review

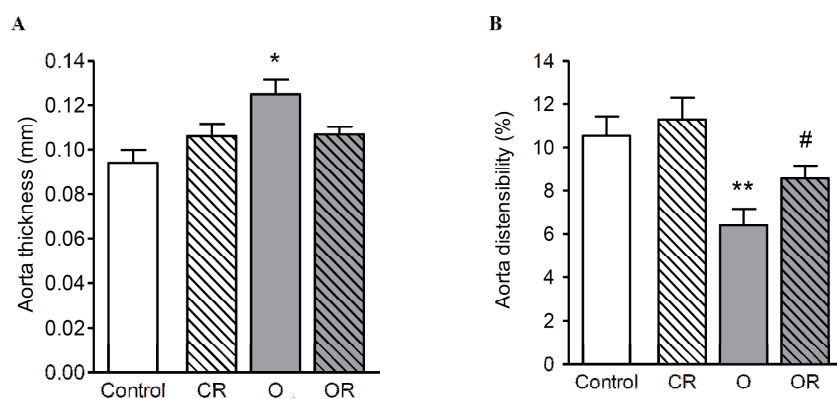
TABLE 1. Effects of resveratrol on cardiac and blood pressure parameters. Values represent mean $\pm$ SEM $n = 16$ – 24 mice for echocardiography and $n = 12$ mice for blood pressure measurement in each group.

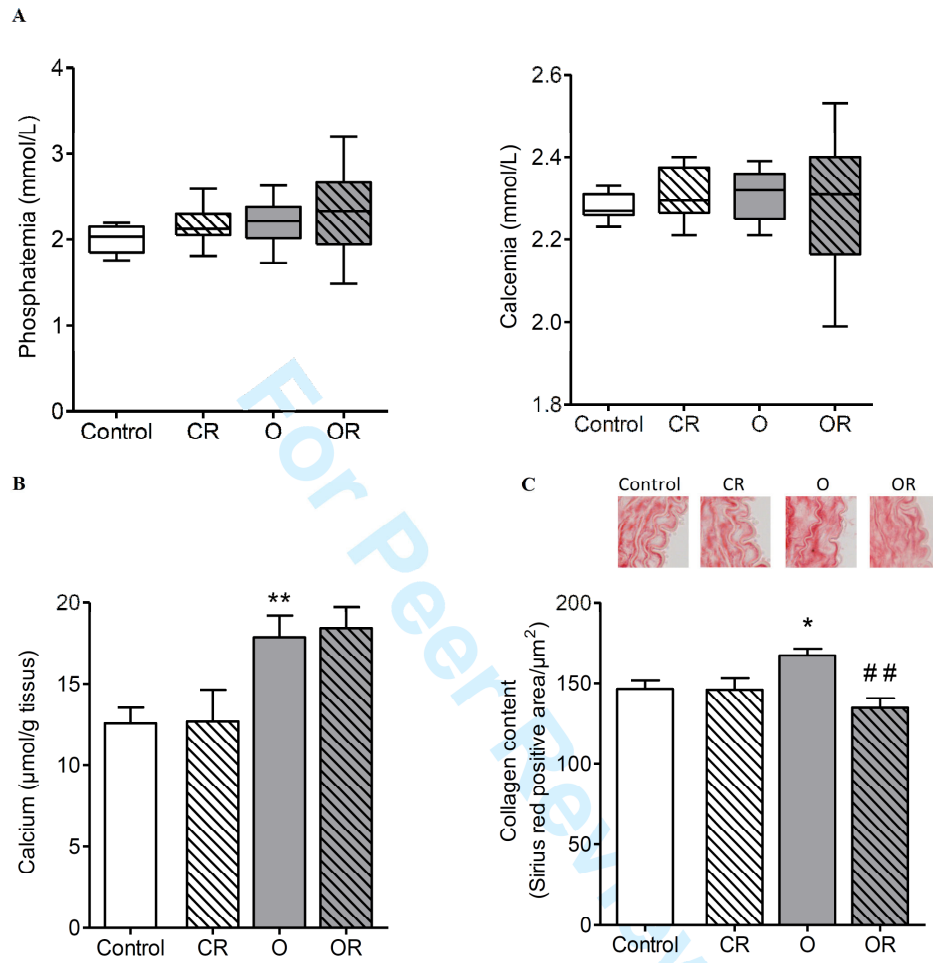
	Control	CR	O	OR
Heart rate (beat/ min)	478 $\pm$ 8	471 $\pm$ 9	490 $\pm$ 10	472 $\pm$ 10
Cardiac flow (mL/min)	18.7 $\pm$ 0.6	17.9 $\pm$ 0.3	18.4 $\pm$ 0.3	17.5 $\pm$ 0.5
Left ventricular mass (mg)	98.0 $\pm$ 3.0	103.3 $\pm$ 2.9	105.0 $\pm$ 1.9	105.6 $\pm$ 4.3
Posterior wall thickening (%)	41.7 $\pm$ 3.5	34.7 $\pm$ 1.8	35.3 $\pm$ 3.0	25.4 $\pm$ 2.0
Ejection fraction (%)	55.5 $\pm$ 1.5	50.7 $\pm$ 1.8	57.6 $\pm$ 1.6	53.0 $\pm$ 1.4
Systolic blood pressure (mm Hg)	86.9 $\pm$ 1.7	87.5 $\pm$ 1.0	84.0 $\pm$ 4.2	85.9 $\pm$ 6.4
Diastolic blood pressure (mm Hg)	72.3 $\pm$ 2.1	75.4 $\pm$ 1.9	62.7 $\pm$ 6.8	50.5 $\pm$ 11.7
Mean blood pressure (mm Hg)	80.4 $\pm$ 1.8	80.9 $\pm$ 1.8	78.6 $\pm$ 5.1	72.5 $\pm$ 6.5

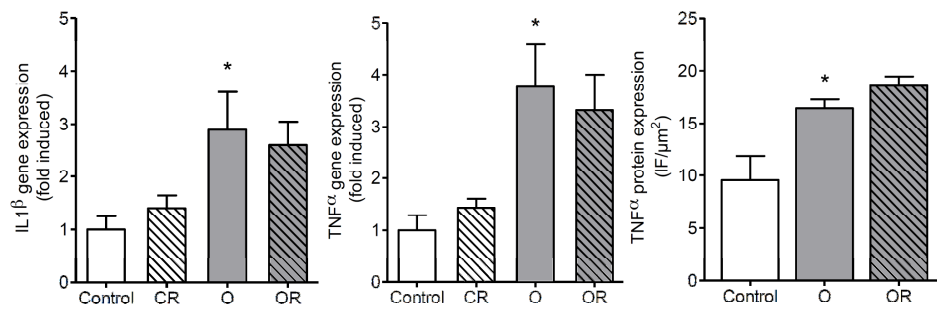
TABLE 2. Quantification of gene expression levels in aorta by real-time PCR. Expression levels were normalized to RPL4 transcript levels and expressed as the mean fold change $\pm$ SEM relative to control expression levels, with $n = 10$ per group.

	Gene	CR	O	OR
Matricial remodeling mediators	MMP2	1.36 $\pm$ 0.40	* 2.38 $\pm$ 0.47	# 0.92 $\pm$ 0.21
	MMP9	0.74 $\pm$ 0.11	1.95 $\pm$ 0.59	1.14 $\pm$ 0.04
	TIMP	1.65 $\pm$ 0.44	* 2.65 $\pm$ 0.69	1.80 $\pm$ 0.57
Calcification mediators	OC	0.63 $\pm$ 0.12	0.67 $\pm$ 0.10	0.61 $\pm$ 0.08
	BMP2	0.61 $\pm$ 0.18	0.72 $\pm$ 0.30	0.73 $\pm$ 0.22
	MGP	1.06 $\pm$ 0.17	1.01 $\pm$ 0.21	0.93 $\pm$ 0.42
	OPG	1.68 $\pm$ 0.38	1.58 $\pm$ 0.20	0.77 $\pm$ 0.22
	RANK	1.63 $\pm$ 0.26	1.59 $\pm$ 0.15	0.79 $\pm$ 0.19

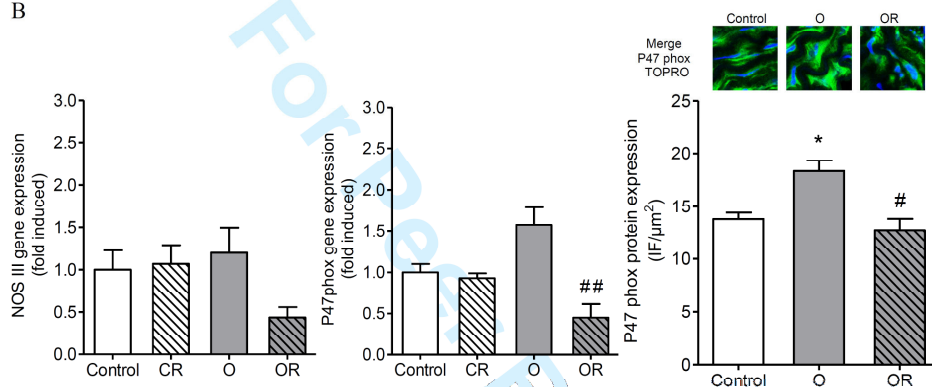
* $p < 0.05$ vs. Control; ## $p < 0.01$ OR vs. O

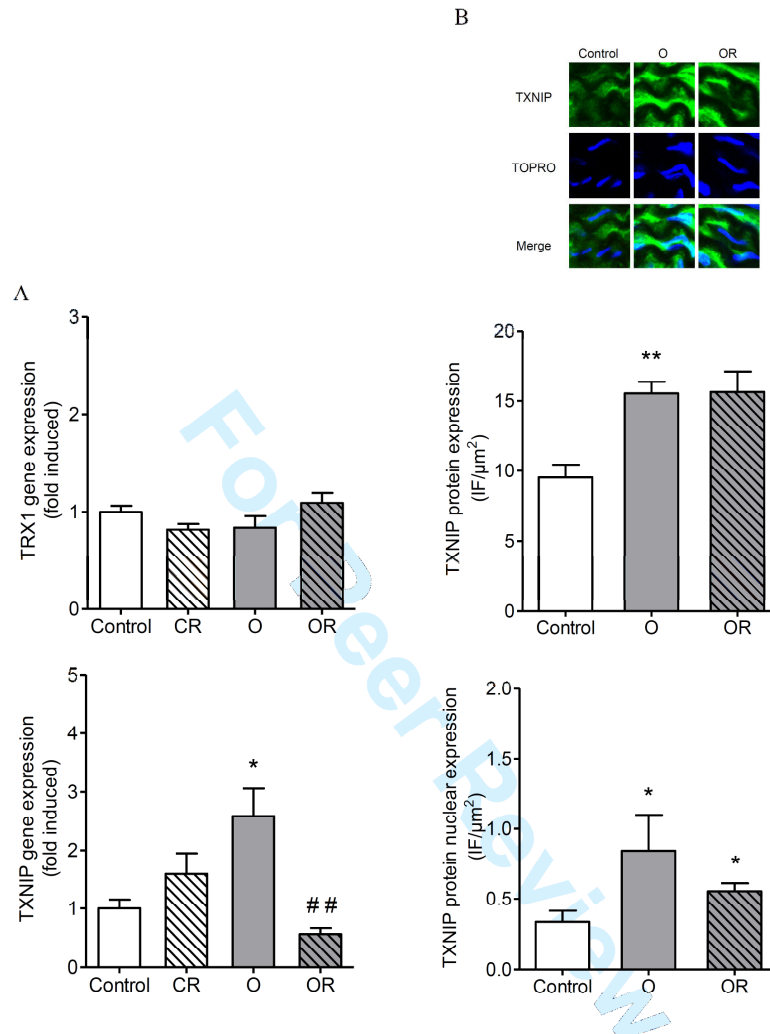






B





Discussion et perspectives

Ce travail a montré que les trois mois de traitement par le resvératrol permettent d'améliorer le phénotype vasculaire lié à l'âge en restaurant en partie la distensibilité artérielle et ce en diminuant le remodelage matriciel. Ces améliorations semblent impliquées le stress oxydant avec la diminution de la NADPH oxydase et la modification d'expression de la protéine TXNIP. Jusqu'ici peu d'études ont mis en évidence le rôle de TXNIP dans la survenue des atteintes cardiovasculaires liées au vieillissement. Les modifications d'expression observées dans ce travail avec le vieillissement et dans le cadre du traitement par le resvératrol en font une cible de choix dans l'explication de la physiopathologie de ces atteintes. Ce travail préliminaire nécessite cependant des études plus poussées. Ainsi, le développement de modèles murins, inactivés pour TXNIP, semble être une étape indispensable. L'élevage de souris TXNIP^{-/-} endothélium spécifique a donc été entrepris depuis plusieurs mois. Le vieillissement de ces animaux sera exploré comme décrit précédemment afin d'évaluer le rôle de TXNIP dans le vieillissement « physiologique » ainsi que dans le cadre d'un vieillissement métabolique avec trois mois de régime enrichi en protéines et pauvre en glucides. Dans un second temps, les effets du resvératrol seront analysés après un traitement de trois mois. Ces modèles feront l'objet d'une caractérisation métabolique, avec une exploration à jeun et dynamique de l'homéostasie glucidique et du profil lipidique. Les conséquences artérielles, aussi bien fonctionnelles que moléculaires seront également évaluées.

CONCLUSION GENERALE

Les progrès scientifiques et médicaux de ces dernières décennies ont permis d'améliorer la prise en charge du sujet âgé, conduisant à une augmentation de l'espérance de vie. Les modifications démographiques qui en découlent sont responsables d'une augmentation de la prévalence des pathologies cardiovasculaires pour lesquelles l'âge constitue le principal facteur de risque. Les comorbidités associées, en particulier métaboliques, tiennent une place importante dans la survenue de ces pathologies cardiovasculaires. Parmi celles-ci, la dénutrition, l'obésité, le diabète et l'hyperlipidémie sont prépondérants. La maîtrise de ces facteurs de risque métaboliques constitue ainsi une première étape dans la prévention des atteintes cardiovasculaires, et plus particulièrement chez les sujets très âgés dont le nombre augmente considérablement du fait du vieillissement de la population. L'étude de cette population spécifique est particulièrement importante, peu de données étant actuellement disponibles pour cette catégorie d'âge. Ce manque d'informations est lié en partie à la difficulté à obtenir un consentement éclairé mais aussi à évaluer le rôle des nombreuses comorbidités associées (336). L'approche nutritionnelle constitue une des options possibles pour la prise en charge du sujet très âgé car la dénutrition énergétique-protéique touche 4% des sujets âgés en ville et 30 à 50% des individus institutionnalisés (126). Cette forte prévalence est due à la combinaison des pathologies déjà préexistantes avec les effets propres au vieillissement lui-même (337). L'évaluation des conséquences métaboliques et fonctionnelles des régimes alimentaires utilisés semble indispensable. D'autre part, l'utilisation de molécules, telles que les polyphénols, connus pour leurs effets bénéfiques aussi bien métaboliques que cardiovasculaires, est également un moyen déjà répandu de prévenir la survenue des pathologies cardiovasculaires. Le resvératrol, en tête de file, fait déjà l'objet de plusieurs études cliniques. Cependant, l'utilisation de cette molécule n'a pas encore été évaluée dans tous les contextes où son utilisation pourrait être proposée, en particulier dans le cadre du vieillissement, et surtout chez des sujets très âgés.

L'objectif de ce travail a donc été dans un premier temps d'évaluer chez des souris très âgées, les effets sur le fonctionnement cardiovasculaire et ses facteurs de risque d'un traitement chronique par le resvératrol auquel s'ajoutait ou non un régime visant à assurer les apports nutritionnels protéiques recommandés pour la renutrition du sujet âgé. Pour cela, différents modèles murins ont été développés. Un premier modèle explorant le vieillissement physiologique a été développé avec des souris âgées de 25 mois, ce qui correspond à un âge d'environ 80 ans chez l'Homme. Ces souris nourries avec un régime standard identique durant toute leur existence vont nous permettre d'évaluer les conséquences physiologiques du vieillissement en s'affranchissant de l'impact des variations de l'alimentation et de ses

conséquences métaboliques. Un second modèle murin avec une prise en charge nutritionnelle par un régime riche en protéines a été mis en place (126). Enfin, ces modèles murins de vieillissement ont reçu pour une partie d'entre eux un traitement chronique de 3 mois (ce qui correspond à une période de 10 ans chez l'Homme) par trans-resvératrol *per os* à hauteur de 40 mg/kg/jour dans leur alimentation afin d'évaluer les conséquences aussi bien métaboliques que cardio-vasculaires de cette supplémentation dans les différents contextes de vieillissement.

Ce travail met tout d'abord en évidence les effets néfastes d'un régime enrichi en protéines et pauvre en glucides chez les souris très âgées et nous a conduits dans un second temps à nous intéresser aux effets de ce régime à différents âges afin de savoir si ces effets étaient spécifiques de la souris très âgée. Pour cela, ces effets ont été évalués dans deux autres tranches d'âge : chez des souris jeunes âgées de 3 mois en début de protocole (ce qui correspondrait chez l'Homme à la période entre l'enfance et l'âge adulte) et chez des souris de 6 mois en début d'étude (ce qui correspondrait chez l'Homme à une étude menée entre 20 et 30 ans, soit chez l'adulte jeune). Alors qu'aucun effet délétère franc n'est observé chez la souris jeune, les premiers signes métaboliques et cardiaques apparaissent à l'âge adulte et s'aggravent chez la souris très âgée, et ce avec la même durée d'exposition. Une amplification de l'altération de l'homéostasie du glucose, avec en particulier une intolérance majeure lors d'une charge en glucose (hyperglycémie majeure et non restauration de la glycémie initiale à 2 heures) est observée en association avec une détérioration du bilan lipidique (hypertriglycémie, hypercholestérolémie prédominante à non-HDL cholestérol) conduisant à un risque athérogène augmenté. Ces dysrégulations métaboliques ont pour conséquence une majoration de la dégradation des fonctions artérielles (stress oxydant et inflammation prononcés, conduisant à une nette diminution de distensibilité aortique) et cardiaques (détérioration de la fonction ventriculaire gauche). Cette atteinte cardiovasculaire peut être responsable de la mortalité accrue observée chez les souris très âgées soumise à ce régime. Ces résultats, bien qu'obtenus avec des modèles murins, soulignent le fait qu'une supplémentation protéique peut générer des désordres métaboliques et cardiovasculaires.

Le régime utilisé dans ce travail présente une composition bien spécifique. En effet, l'apport en protéines est nettement majoré par rapport à celui d'un régime classique ; celles-ci constituent 28% de l'apport énergétique au lieu des 15% couramment observés. L'apport en lipides est également important puisqu'ils constituent 72% de l'apport énergétique. De ce fait, l'apport en carbohydrate est très faible. Les effets observés avec ce régime ne sont donc probablement pas uniquement liés à l'augmentation de l'apport protéique mais également à

l'importance de l'apport en lipides et au peu de glucides apportés par le régime. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer chez nos souris très âgées dénutries les effets d'une renutrition par un régime toujours riche en protéines, mais avec un apport en glucides normal et plus faible en lipides. La prise en charge nutritionnelle du sujet âgé dénutri semble donc requérir une stratégie plus globale visant à adapter et équilibrer l'ensemble des apports énergéto-protéiques. Ainsi, des études cliniques plus poussées devraient être entreprises dans ce sens.

Concernant les effets du resvératrol, un traitement de 3 mois à hauteur d'environ 40 mg/kg/jour *per os* a été donné chez la souris très âgée concomitamment au régime enrichi en protéines et pauvre en glucides. La dose de resvératrol dans ce travail correspond à celle initialement utilisée dans l'étude princeps de Baur avec des doses de 0,04% incorporées dans l'alimentation (283). Bien que pouvant sembler particulièrement élevées, des doses de cet ordre sont pourtant déjà utilisées dans des études cliniques en cours (étude pilote du resvératrol chez les sujets âgés intolérants au glucose avec 3 g de resvératrol journalier (référence NCT01375959) ou l'étude du resvératrol chez les patients atteints de syndrome métabolique avec 2g par jour (référéncée NCT01714102)) et en particulier celle de Crandall, qui montre une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez le sujet âgé avec 2g de resvératrol par jour (305). Chez nos souris âgées en renutrition, le traitement par le resvératrol est associé à une majoration de l'inflammation systémique et du stress oxydant vasculaire conduisant à une altération des fonctions artérielles avec en particulier une diminution de la distensibilité aortique. Ces altérations semblent être la conséquence d'un shift métabolique avec un profil lipidique en faveur de l'athérogenèse. Concernant l'homéostasie glucidique, dans ce cadre le resvératrol n'a aucun effet tant sur la tolérance au glucose, l'HOMA-IR ou la résistinsémie.

Contrairement à ce qui est observé chez la souris très âgée sous régime enrichi en protéines et pauvre en glucides, en l'absence de prise en charge nutritionnelle particulière, le resvératrol permet d'améliorer l'intolérance au glucose et de diminuer la résistinsémie dans le modèle de vieillissement physiologique. D'un point de vue fonctionnel, le resvératrol est bénéfique sur les fonctions artérielles en améliorant la distensibilité aortique et ce probablement via une diminution du stress oxydant permettant de limiter la fibrose de la média. Les mécanismes impliqués dans ces effets restent cependant encore mal connus. Dans un troisième temps, nous avons identifié un potentiel médiateur impliqué aussi bien dans les mécanismes de vieillissement que dans les effets du resvératrol, la protéine TXNIP, qui constitue une cible de choix à l'interface de la régulation de l'homéostasie du glucose et du maintien de la balance du stress oxydant. En effet, le traitement par le resvératrol est à l'origine d'une modification

de l'expression vasculaire de la protéine TXNIP qui semble être en lien avec l'amélioration du phénotype artériel. Ainsi, indépendamment de modifications de pression artérielle, on observe une diminution du remodelage matriciel conduisant à une amélioration de la distensibilité et une diminution de l'épaisseur intima-média. Afin d'explorer plus à même cette hypothèse, des modèles de souris transgéniques, inactivés spécifiquement au niveau de l'endothélium pour cette protéine sont actuellement en cours d'élevage. Ces modèles permettront d'évaluer l'implication de cette protéine dans le vieillissement métabolique et cardiovasculaire et permettront de confirmer ou non sa possible participation dans les effets protecteurs observés avec le resvératrol.

Plusieurs pistes permettant d'expliquer les effets bénéfiques du resvératrol dans ces modèles de vieillissement sont aujourd'hui en cours d'exploration.

Collaboration avec l'équipe UMR CNRS 6214-INSERM U1083 (Pr V. Proccacio)

Une première approche dans l'exploration mécanistique des effets du resvératrol a été réalisée. En effet, aussi bien dans le foie de nos modèles murins de souris très âgées qu'*in vitro* sur culture d'hépatome HepG2, le resvératrol semble entraîner une augmentation de l'activité du complexe I mitochondrial, qui serait à l'origine d'une augmentation de l'oxydation du NADH et ainsi de l'activation des sirtuines. Cette collaboration a donné lieu à une publication dans *Journal of Biological Chemistry* (en annexe). Par ailleurs, cette exploration mécanistique est également menée dans le cerveau.

Collaboration avec l'unité CNRS EAC 4413 (Dr N. Janel)

Une autre approche mécanistique a été entreprise. En effet, le resvératrol via l'activation des sirtuines pourrait être impliqué dans la survie cellulaire en lien avec les protéines de la famille DYRK (Dual specificity Tyrosine phosphorylation-Regulated Kinases) et DYRK1A en particulier (338). Ces protéines sont des kinases qui semblent jouer un rôle clé dans la régulation de la différenciation, la prolifération et la survie cellulaires en phosphorylant des facteurs de transcription comme NFAT, FOXO ou STAT3 (339). DYRK1A a récemment été impliqué dans la survie cellulaire via la phosphorylation et l'activation de SIRT1, une des cibles du resvératrol (338). L'objectif de ce travail sera donc de caractériser l'expression de DYRK1A dans les différents tissus de ces modèles et d'étudier l'effet du resvératrol sur cette expression.

Collaboration avec l'unité INSERM UMR-S 747 (Pr X. Coumoul)

Le resvératrol est également connu pour être un antagoniste privilégié du récepteur aux arylhydrocarbones (AHR) (340, 341). De rares travaux ont évoqué le rôle de cette voie de signalisation dans ses effets cardiovasculaires (340, 342). Or, l'activation d'AHR

interviendrait dans l'athérogenèse (343) ou l'hypertrophie cardiaque (344). De plus, quelques études ont déjà évoqué le lien entre AHR et l'homéostasie glucidique (345, 346) ou le métabolisme lipidique (347, 348), deux facteurs de risque cardiovasculaire majeurs. L'implication de ce récepteur pourrait ainsi être évoquée dans les mécanismes de vieillissement. L'exploration du phénotype de vieillissement de souris inactivée pour le récepteur AHR permettrait ainsi d'évaluer son rôle dans ce processus. Par la suite, il serait intéressant de traiter par le resvératrol ces souris pendant la même période que les souris non inactivées afin d'évaluer le rôle d'AHR dans les actions du resvératrol dans le cadre du vieillissement cardio-vasculaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dorner B, Friedrich EK, Posthauer ME. Position of the American Dietetic Association: individualized nutrition approaches for older adults in health care communities. *Journal of the American Dietetic Association*. 2010 Oct;110(10):1549-53.
2. Ferrucci L, Giallauria F, Guralnik JM. Epidemiology of aging. *Radiologic clinics of North America*. 2008 Jul;46(4):643-52, v.
3. (IRDES) Idredeédls. Enquête permanente sur la prescription médicale depuis 1991. 2011.
4. Weismann A. *Essays upon heredity*. Oxford, Clarendon Press. 1891.
5. Curtis H, Crowley C. Chromosome aberrations in liver cells in relation to the somatic mutation theory of aging. *Radiation research*. 1963 Jun;19:337-44.
6. Dempsey JL, Pfeiffer M, Morley AA. Effect of dietary restriction on in vivo somatic mutation in mice. *Mutation research*. 1993 Apr;291(2):141-5.
7. Martin GM, Ogburn CE, Colgin LM, Gown AM, Edland SD, Monnat RJ, Jr. Somatic mutations are frequent and increase with age in human kidney epithelial cells. *Human molecular genetics*. 1996 Feb;5(2):215-21.
8. Vijg J. Somatic mutations and aging: a re-evaluation. *Mutation research*. 2000 Jan 17;447(1):117-35.
9. Bohr VA, Anson RM. DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging. *Mutation research*. 1995 Oct;338(1-6):25-34.
10. Walter CA, Grabowski DT, Street KA, Conrad CC, Richardson A. Analysis and modulation of DNA repair in aging. *Mech Ageing Dev*. 1997 Dec;98(3):203-22.
11. Burkle A, Grube K, Kupper JH. Poly(ADP-ribosyl)ation: its role in inducible DNA amplification, and its correlation with the longevity of mammalian species. *Experimental and clinical immunogenetics*. 1992;9(4):230-40.
12. Grube K, Burkle A. Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Dec 15;89(24):11759-63.
13. Rodriguez-Brenes IA, Peskin CS. Quantitative theory of telomere length regulation and cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 23;107(12):5387-92.
14. Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep;86(18):7049-53.
15. Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of theoretical biology*. 1973 Sep 14;41(1):181-90.
16. Hayflick L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental cell research*. 1965 Mar;37:614-36.
17. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*. 1956 Jul;11(3):298-300.
18. Juni RP, Duckers HJ, Vanhoutte PM, Virmani R, Moens AL. Oxidative stress and pathological changes after coronary artery interventions. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Apr 9;61(14):1471-81.
19. Wenzel P, Schuhmacher S, Kienhofer J, Muller J, Hortmann M, Oelze M, et al. Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2008 Nov 1;80(2):280-9.
20. Didion SP, Kinzenbaw DA, Schrader LI, Faraci FM. Heterozygous CuZn superoxide dismutase deficiency produces a vascular phenotype with aging. *Hypertension*. 2006 Dec;48(6):1072-9.

21. Yang H, Roberts LJ, Shi MJ, Zhou LC, Ballard BR, Richardson A, et al. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ Res*. 2004 Nov 26;95(11):1075-81.
22. Jiang F, Roberts SJ, Datla, Sr., Dusting GJ. NO modulates NADPH oxidase function via heme oxygenase-1 in human endothelial cells. *Hypertension*. 2006 Nov;48(5):950-7.
23. Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2010 May;459(6):923-39.
24. Cho CG, Kim HJ, Chung SW, Jung KJ, Shim KH, Yu BP, et al. Modulation of glutathione and thioredoxin systems by calorie restriction during the aging process. *Exp Gerontol*. 2003 May;38(5):539-48.
25. Kim JW, No JK, Ikeno Y, Yu BP, Choi JS, Yokozawa T, et al. Age-related changes in redox status of rat serum. *Archives of gerontology and geriatrics*. 2002 Feb;34(1):9-17.
26. Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev*. 2004 Oct-Nov;125(10-11):811-26.
27. Blumberg JB. Free radical theory of aging. *The Science of Geriatrics NY*. 2000.
28. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006 Feb;7(2):85-96.
29. White MF. Insulin signaling in health and disease. *Science*. 2003 Dec 5;302(5651):1710-1.
30. Kahn CR. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*. 1994 Aug;43(8):1066-84.
31. Huang C, Thirone AC, Huang X, Klip A. Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in I6 myotubes. *J Biol Chem*. 2005 May 13;280(19):19426-35.
32. Capeau J. [Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]. *Medecine sciences : M/S*. 2003 Aug-Sep;19(8-9):834-9.
33. Le Roith D, Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes care*. 2001 Mar;24(3):588-97.
34. Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem*. 2003 Jan 31;278(5):2896-902.
35. Rui L, Aguirre V, Kim JK, Shulman GI, Lee A, Corbould A, et al. Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J Clin Invest*. 2001 Jan;107(2):181-9.
36. Kido Y, Nakae J, Accili D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Mar;86(3):972-9.
37. Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Wareham N, Yudkin JS, et al. Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes & metabolism*. 2002 Nov;28(5):364-76.
38. Ricci P, Blotières P-O, Weill A, Simon D, Tuppin P, Ricordeau P, et al. Diabète traité : quelles évolutions entre 2000 et 2009 ? *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*. 2010;42-43.
39. Muoio DM, Newgard CB. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008 Mar;9(3):193-205.
40. Houmard JA. Intramuscular lipid oxidation and obesity. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2008 Apr;294(4):R1111-6.
41. Spence JW. Some observations on sugar tolerance with special reference to variations found at different ages. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 1920-1921;14:314-26.

42. Larsson H, Ahren B. Islet dysfunction in insulin resistance involves impaired insulin secretion and increased glucagon secretion in postmenopausal women with impaired glucose tolerance. *Diabetes care*. 2000 May;23(5):650-7.
43. Rowe JW, Minaker KL, Pallotta JA, Flier JS. Characterization of the insulin resistance of aging. *J Clin Invest*. 1983 Jun;71(6):1581-7.
44. Reaven GM. Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiological reviews*. 1995 Jul;75(3):473-86.
45. Johnson AB, Argyraki M, Thow JC, Cooper BG, Fulcher G, Taylor R. Effect of increased free fatty acid supply on glucose metabolism and skeletal muscle glycogen synthase activity in normal man. *Clin Sci (Lond)*. 1992 Feb;82(2):219-26.
46. Krssak M, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, et al. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia*. 1999 Jan;42(1):113-6.
47. Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, Pagliato E, Battezzati A, Arcelloni C, et al. Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes*. 1999 Aug;48(8):1600-6.
48. Szczepaniak LS, Babcock EE, Schick F, Dobbins RL, Garg A, Burns DK, et al. Measurement of intracellular triglyceride stores by H spectroscopy: validation in vivo. *The American journal of physiology*. 1999 May;276(5 Pt 1):E977-89.
49. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*. 1999 Jan;103(2):253-9.
50. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem*. 2002 Dec 27;277(52):50230-6.
51. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes*. 2002 Jul;51(7):2005-11.
52. Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, et al. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7522-7.
53. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes*. 1999 Jun;48(6):1270-4.
54. Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest*. 1994 Jun;93(6):2438-46.
55. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*. 1996 Jun 15;97(12):2859-65.
56. Petersen KF, Oral EA, Dufour S, Befroy D, Ariyan C, Yu C, et al. Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Invest*. 2002 May;109(10):1345-50.
57. Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, et al. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jul;87(7):3023-8.
58. Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes*. 1991 Nov;40(11):1397-403.

59. Dunning BE, Foley JE, Ahren B. Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon-like peptide-1. *Diabetologia*. 2005 Sep;48(9):1700-13.
60. Ahren B. Beta- and alpha-cell dysfunction in subjects developing impaired glucose tolerance: outcome of a 12-year prospective study in postmenopausal Caucasian women. *Diabetes*. 2009 Mar;58(3):726-31.
61. Muller WA, Faloon GR, Aguilar-Parada E, Unger RH. Abnormal alpha-cell function in diabetes. Response to carbohydrate and protein ingestion. *The New England journal of medicine*. 1970 Jul 16;283(3):109-15.
62. Ahren B, Larsson H. Impaired glucose tolerance (IGT) is associated with reduced insulin-induced suppression of glucagon concentrations. *Diabetologia*. 2001 Nov;44(11):1998-2003.
63. Shah P, Vella A, Basu A, Basu R, Schwenk WF, Rizza RA. Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Nov;85(11):4053-9.
64. Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, Nadal A. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *The Journal of endocrinology*. 2008 Oct;199(1):5-19.
65. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1998 Jul;15(7):539-53.
66. Bogdanski P, Suliburska J, Szulinska M, Stepień M, Pupek-Musialik D, Jablecka A. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutr Res*. 2012 Jun;32(6):421-7.
67. Chen N, Bezzina R, Hinch E, Lewandowski PA, Cameron-Smith D, Mathai ML, et al. Green tea, black tea, and epigallocatechin modify body composition, improve glucose tolerance, and differentially alter metabolic gene expression in rats fed a high-fat diet. *Nutr Res*. 2009 Nov;29(11):784-93.
68. Sackmann-Sala L, Berryman DE, Lubbers ER, Vesel CB, Troike KM, List EO, et al. Decreased insulin sensitivity and increased oxidative damage in wasting adipose tissue depots of wild-type mice. *Age (Dordr)*. 2012 Oct;34(5):1225-37.
69. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 2006 Apr 13;440(7086):944-8.
70. Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo MA, Festuccia WT, Lambertucci RH, et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis*. 2012 Feb 23;11.
71. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(3):463-6.
72. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*. 1997 Nov;46(11):1733-42.
73. Noda M, Yamashita S, Takahashi N, Eto K, Shen LM, Izumi K, et al. Switch to anaerobic glucose metabolism with NADH accumulation in the beta-cell model of mitochondrial diabetes. Characteristics of betaHC9 cells deficient in mitochondrial DNA transcription. *J Biol Chem*. 2002 Nov 1;277(44):41817-26.
74. Maechler P, Jornot L, Wollheim CB. Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*. 1999 Sep 24;274(39):27905-13.

75. Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Nakamaru K, Hirashima Y, et al. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jan 3;300(1):216-22.
76. Kaneto H, Xu G, Fujii N, Kim S, Bonner-Weir S, Weir GC. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *J Biol Chem*. 2002 Aug 16;277(33):30010-8.
77. Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N. Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes*. 1999 Apr;48(4):738-44.
78. Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*. 2005 Mar 11;120(5):649-61.
79. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002 Nov 21;420(6913):333-6.
80. Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuoka TA, Matsuhisa M, et al. Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nature medicine*. 2004 Oct;10(10):1128-32.
81. Rogers R, Davis R, Denham DA. A new technique for the study of changes in lymphatics caused by filarial worms. *Journal of helminthology*. 1975 Mar;49(1):31-2.
82. Rudich A, Tirosh A, Potashnik R, Hemi R, Kanety H, Bashan N. Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*. 1998 Oct;47(10):1562-9.
83. Bravard A, Bonnard C, Durand A, Chauvin MA, Favier R, Vidal H, et al. Inhibition of xanthine oxidase reduces hyperglycemia-induced oxidative stress and improves mitochondrial alterations in skeletal muscle of diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011 Mar;300(3):E581-91.
84. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004 Dec;114(12):1752-61.
85. Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, Hirota K, Masutani H, Nakamura H, et al. Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21645-50.
86. Patwari P, Higgins LJ, Chutkow WA, Yoshioka J, Lee RT. The interaction of thioredoxin with Txnip. Evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange. *J Biol Chem*. 2006 Aug 4;281(31):21884-91.
87. Minn AH, Hafele C, Shalev A. Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces beta-cell apoptosis. *Endocrinology*. 2005 May;146(5):2397-405.
88. Cha-Molstad H, Saxena G, Chen J, Shalev A. Glucose-stimulated expression of Txnip is mediated by carbohydrate response element-binding protein, p300, and histone H4 acetylation in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*. 2009 Jun 19;284(25):16898-905.
89. Schulze PC, Yoshioka J, Takahashi T, He Z, King GL, Lee RT. Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein. *J Biol Chem*. 2004 Jul 16;279(29):30369-74.
90. Yu Y, Xing K, Badamas R, Kuszynski CA, Wu H, Lou MF. Overexpression of thioredoxin-binding protein 2 increases oxidation sensitivity and apoptosis in human lens epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2013 Apr;57:92-104.

91. Minn AH, Pise-Masison CA, Radonovich M, Brady JN, Wang P, Kendzierski C, et al. Gene expression profiling in INS-1 cells overexpressing thioredoxin-interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Oct 28;336(3):770-8.
92. Chen J, Couto FM, Minn AH, Shalev A. Exenatide inhibits beta-cell apoptosis by decreasing thioredoxin-interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Aug 4;346(3):1067-74.
93. Chen J, Saxena G, Mungrue IN, Lusis AJ, Shalev A. Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and beta-cell apoptosis. *Diabetes*. 2008 Apr;57(4):938-44.
94. Parikh H, Carlsson E, Chutkow WA, Johansson LE, Storgaard H, Poulsen P, et al. TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans. *PLoS medicine*. 2007 May;4(5):e158.
95. Wu N, Zheng B, Shaywitz A, Dagon Y, Tower C, Bellinger G, et al. AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Molecular cell*. 2013 Mar 28;49(6):1167-75.
96. Chutkow WA, Birkenfeld AL, Brown JD, Lee HY, Frederick DW, Yoshioka J, et al. Deletion of the alpha-arrestin protein Txnip in mice promotes adiposity and adipogenesis while preserving insulin sensitivity. *Diabetes*. 2010 Jun;59(6):1424-34.
97. Patwari P, Chutkow WA, Cummings K, Verstraeten VL, Lammerding J, Schreiter ER, et al. Thioredoxin-independent regulation of metabolism by the alpha-arrestin proteins. *J Biol Chem*. 2009 Sep 11;284(37):24996-5003.
98. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature medicine*. 2002 Nov;8(11):1288-95.
99. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nature medicine*. 2001 Aug;7(8):947-53.
100. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2004 Apr 14;291(14):1730-7.
101. Schraw T, Wang ZV, Halberg N, Hawkins M, Scherer PE. Plasma adiponectin complexes have distinct biochemical characteristics. *Endocrinology*. 2008 May;149(5):2270-82.
102. Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, et al. Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes care*. 2006 Jun;29(6):1357-62.
103. Zhu N, Pankow JS, Ballantyne CM, Couper D, Hoogeveen RC, Pereira M, et al. High-molecular-weight adiponectin and the risk of type 2 diabetes in the ARIC study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Nov;95(11):5097-104.
104. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994 Dec 1;372(6505):425-32.
105. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England journal of medicine*. 1996 Feb 1;334(5):292-5.
106. Bouillanne O, Golmard JL, Coussieu C, Noel M, Durand D, Piette F, et al. Leptin a new biological marker for evaluating malnutrition in elderly patients. *European journal of clinical nutrition*. 2007 May;61(5):647-54.

107. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature medicine*. 1995 Dec;1(12):1311-4.
108. Mark AL, Correia ML, Rahmouni K, Haynes WG. Selective leptin resistance: a new concept in leptin physiology with cardiovascular implications. *Journal of hypertension*. 2002 Jul;20(7):1245-50.
109. Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG, Jr., Schwartz MW. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature*. 2001 Oct 25;413(6858):794-5.
110. Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Jr., Stoffel M, Friedman JM. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nature genetics*. 1996 Sep;14(1):95-7.
111. Buettner C, Pocai A, Muse ED, Etgen AM, Myers MG, Jr., Rossetti L. Critical role of STAT3 in leptin's metabolic actions. *Cell Metab*. 2006 Jul;4(1):49-60.
112. Buettner C, Muse ED, Cheng A, Chen L, Scherer T, Pocai A, et al. Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nature medicine*. 2008 Jun;14(6):667-75.
113. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998 Oct 22;395(6704):763-70.
114. Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM, et al. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *The New England journal of medicine*. 2007 Jan 18;356(3):237-47.
115. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997 Jun 26;387(6636):903-8.
116. Konner AC, Bruning JC. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab*. 2012 Aug 8;16(2):144-52.
117. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001 Jan 18;409(6818):307-12.
118. Lazar MA. Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2007 Oct;39(10):710-6.
119. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, et al. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes*. 2001 Oct;50(10):2199-202.
120. Lu SC, Shieh WY, Chen CY, Hsu SC, Chen HL. Lipopolysaccharide increases resistin gene expression in vivo and in vitro. *FEBS letters*. 2002 Oct 23;530(1-3):158-62.
121. Lee SE, Kim HS. Human resistin in cardiovascular disease. *Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi*. 2012;48(1):27-35.
122. Calabro P, Samudio I, Willerson JT, Yeh ET. Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation*. 2004 Nov 23;110(21):3335-40.
123. Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation*. 2005 Feb 22;111(7):932-9.
124. Dey DK, Rothenberg E, Sundh V, Bosaeus I, Steen B. Body mass index, weight change and mortality in the elderly. A 15 y longitudinal population study of 70 y olds. *European journal of clinical nutrition*. 2001 Jun;55(6):482-92.
125. Wurtman JJ, Lieberman H, Tsay R, Nader T, Chew B. Calorie and nutrient intakes of elderly and young subjects measured under identical conditions. *Journal of gerontology*. 1988 Nov;43(6):B174-80.

126. H A, S, (Haute Autorité de Santé). Clinical practice guidelines. Nutritional support strategy for protein-energy malnutrition in the elderly. Saint-Denis, France: HAS, 2007.
127. Covinsky KE, Martin GE, Beyth RJ, Justice AC, Sehgal AR, Landefeld CS. The relationship between clinical assessments of nutritional status and adverse outcomes in older hospitalized medical patients. *Journal of the American Geriatrics Society*. 1999 May;47(5):532-8.
128. Hays NP, Roberts SB. The anorexia of aging in humans. *Physiology & behavior*. 2006 Jun 30;88(3):257-66.
129. Morley JE, Silver AJ. Anorexia in the elderly. *Neurobiology of aging*. 1988 Jan-Feb;9(1):9-16.
130. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, et al. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*. 2002 Aug 8;418(6898):650-4.
131. Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR. Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*. 1985 Nov;89(5):1070-7.
132. Shi YC, Hammerle CM, Lee IC, Turner N, Nguyen AD, Riepler SJ, et al. Adult-onset PYY overexpression in mice reduces food intake and increases lipogenic capacity. *Neuropeptides*. 2012 Aug;46(4):173-82.
133. Zhang L, Nguyen AD, Lee IC, Yulyaningsih E, Riepler SJ, Stehrer B, et al. NPY modulates PYY function in the regulation of energy balance and glucose homeostasis. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2012 Aug;14(8):727-36.
134. Sam AH, Gunner DJ, King A, Persaud SJ, Brooks L, Hostomska K, et al. Selective ablation of peptide YY cells in adult mice reveals their role in beta cell survival. *Gastroenterology*. 2012 Aug;143(2):459-68.
135. Evans WJ. Exercise, nutrition, and aging. *Clinics in geriatric medicine*. 1995 Nov;11(4):725-34.
136. Yeh SS, Schuster MW. Geriatric cachexia: the role of cytokines. *The American journal of clinical nutrition*. 1999 Aug;70(2):183-97.
137. Ahmed T, Haboubi N. Assessment and management of nutrition in older people and its importance to health. *Clinical interventions in aging*. 2010;5:207-16.
138. Rockwood K, Fox RA, Stolee P, Robertson D, Beattie BL. Frailty in elderly people: an evolving concept. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 1994 Feb 15;150(4):489-95.
139. Heuberger RA. The frailty syndrome: a comprehensive review. *Journal of nutrition in gerontology and geriatrics*. 2011;30(4):315-68.
140. Rockwood K, Stadnyk K, MacKnight C, McDowell I, Hebert R, Hogan DB. A brief clinical instrument to classify frailty in elderly people. *Lancet*. 1999 Jan 16;353(9148):205-6.
141. Kromhout D. Epidemiology of cardiovascular diseases in Europe. *Public health nutrition*. 2001 Apr;4(2B):441-57.
142. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997 May 3;349(9061):1269-76.
143. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997 May 24;349(9064):1498-504.
144. Herman AG, Moncada S. Therapeutic potential of nitric oxide donors in the prevention and treatment of atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2005 Oct;26(19):1945-55.
145. Zeng G, Quon MJ. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1996 Aug 15;98(4):894-8.

146. Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res.* 2007 Jul 15;75(2):247-60.
147. Browatzki M, Schmidt J, Kubler W, Kranzhofer R. Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic research in cardiology.* 2000 Apr;95(2):98-105.
148. Hofman FM, Chen P, Jeyaseelan R, Incardona F, Fisher M, Zidovetzki R. Endothelin-1 induces production of the neutrophil chemotactic factor interleukin-8 by human brain-derived endothelial cells. *Blood.* 1998 Nov 1;92(9):3064-72.
149. Ruetten H, Thiernemann C. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society.* 1997 Dec;48(4):675-88.
150. Romero M, Jimenez R, Sanchez M, Lopez-Sepulveda R, Zarzuelo A, Tamargo J, et al. Vascular superoxide production by endothelin-1 requires Src non-receptor protein tyrosine kinase and MAPK activation. *Atherosclerosis.* 2010 Sep;212(1):78-85.
151. Lipskaia L, Lompre AM. Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization.* 2004 Feb;96(1):55-68.
152. Berra-Romani R, Mazzocco-Spezia A, Pulina MV, Golovina VA. Ca²⁺ handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture. *American journal of physiology Cell physiology.* 2008 Sep;295(3):C779-90.
153. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation.* 2007;15(3):100-8.
154. Bachschmid MM, Schildknecht S, Matsui R, Zee R, Haeussler D, Cohen RA, et al. Vascular aging: chronic oxidative stress and impairment of redox signaling-consequences for vascular homeostasis and disease. *Annals of medicine.* 2013 Feb;45(1):17-36.
155. Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 1993 Oct;7(13):1208-18.
156. Spina M, Garbisa S, Hinnie J, Hunter JC, Serafini-Fracassini A. Age-related changes in composition and mechanical properties of the tunica media of the upper thoracic human aorta. *Arteriosclerosis.* 1983 Jan-Feb;3(1):64-76.
157. Barac A, Campia U, Panza JA. Methods for evaluating endothelial function in humans. *Hypertension.* 2007 Apr;49(4):748-60.
158. Ungvari Z, Sonntag WE, Csiszar A. Mitochondria and aging in the vascular system. *J Mol Med (Berl).* 2010 Oct;88(10):1021-7.
159. Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A. Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2010 Oct;65(10):1028-41.
160. Silva BR, Pernomian L, Bendhack LM. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. *Frontiers in physiology.* 2012;3:441.
161. Soccio M, Toniato E, Evangelista V, Carluccio M, De Caterina R. Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants. *European journal of clinical investigation.* 2005 May;35(5):305-14.
162. Csiszar A, Labinsky N, Orosz Z, Xiangmin Z, Buffenstein R, Ungvari Z. Vascular aging in the longest-living rodent, the naked mole rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Aug;293(2):H919-27.
163. Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest.* 2002 Mar;109(6):817-26.

164. Chandra S, Romero MJ, Shatanawi A, Alkilany AM, Caldwell RB, Caldwell RW. Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *Br J Pharmacol*. 2012 Jan;165(2):506-19.
165. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Fukuda Y, Matsuura H, Oshima T, et al. Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals. *American journal of hypertension*. 2002 Apr;15(4 Pt 1):326-32.
166. Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, et al. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest*. 1997 Jan 1;99(1):41-6.
167. Heitzer T, Krohn K, Albers S, Meinertz T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2000 Nov;43(11):1435-8.
168. Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, Labinskyy N, Xiangmin Z, Olson S, et al. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 May;292(5):H2417-24.
169. Sydow K, Munzel T. ADMA and oxidative stress. *Atherosclerosis Supplements*. 2003 Dec;4(4):41-51.
170. Crabtree MJ, Smith CL, Lam G, Goligorsky MS, Gross SS. Ratio of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin to 7,8-dihydrobiopterin in endothelial cells determines glucose-elicited changes in NO vs. superoxide production by eNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Apr;294(4):H1530-40.
171. Dohi Y, Luscher TF. Aging differentially affects direct and indirect actions of endothelin-1 in perfused mesenteric arteries of the rat. *Br J Pharmacol*. 1990 Aug;100(4):889-93.
172. Dohi Y, Luscher TF. Endothelin in hypertensive resistance arteries. Intraluminal and extraluminal dysfunction. *Hypertension*. 1991 Oct;18(4):543-9.
173. Kung CF, Luscher TF. Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension*. 1995 Feb;25(2):194-200.
174. Su W, Dai DZ, Liu HR, Na T, Dai Y. Upregulated endothelin system in diabetic vascular dysfunction and early retinopathy is reversed by CPU0213 and total triterpene acids from *Fructus Corni*. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2007 Dec;34(12):1228-33.
175. Romero M, Jimenez R, Sanchez M, Lopez-Sepulveda R, Zarzuelo MJ, O'Valle F, et al. Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis*. 2009 Jan;202(1):58-67.
176. Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011 Jan;25(1):16-28.
177. Goodwin AT, Amrani M, Marchbank AJ, Gray CC, Jayakumar J, Yacoub MH. Coronary vasoconstriction to endothelin-1 increases with age before and after ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res*. 1999 Mar;41(3):554-62.
178. Goettsch W, Lattmann T, Amann K, Szibor M, Morawietz H, Munter K, et al. Increased expression of endothelin-1 and inducible nitric oxide synthase isoform II in aging arteries in vivo: implications for atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan 26;280(3):908-13.
179. Zeng Q, Zhou Q, Yao F, O'Rourke ST, Sun C. Endothelin-1 regulates cardiac L-type calcium channels via NAD(P)H oxidase-derived superoxide. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Sep;326(3):732-8.

180. Bohm F, Pernow J. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2007 Oct 1;76(1):8-18.
181. Muris DM, Houben AJ, Schram MT, Stehouwer CD. Microvascular dysfunction is associated with a higher incidence of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Dec;32(12):3082-94.
182. Vincent MA, Clerk LH, Lindner JR, Klibanov AL, Clark MG, Rattigan S, et al. Microvascular recruitment is an early insulin effect that regulates skeletal muscle glucose uptake in vivo. *Diabetes*. 2004 Jun;53(6):1418-23.
183. Baron AD, Laakso M, Brechtel G, Edelman SV. Mechanism of insulin resistance in insulin-dependent diabetes mellitus: a major role for reduced skeletal muscle blood flow. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991 Sep;73(3):637-43.
184. Natali A, Taddei S, Quinones Galvan A, Camastra S, Baldi S, Frascerra S, et al. Insulin sensitivity, vascular reactivity, and clamp-induced vasodilatation in essential hypertension. *Circulation*. 1997 Aug 5;96(3):849-55.
185. Jiang ZY, Zhou QL, Chatterjee A, Feener EP, Myers MG, Jr., White MF, et al. Endothelin-1 modulates insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase pathway in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*. 1999 May;48(5):1120-30.
186. Strawbridge AB, Elmendorf JS. Endothelin-1 impairs glucose transporter trafficking via a membrane-based mechanism. *Journal of cellular biochemistry*. 2006 Mar 1;97(4):849-56.
187. Wilkes JJ, Hevener A, Olefsky J. Chronic endothelin-1 treatment leads to insulin resistance in vivo. *Diabetes*. 2003 Aug;52(8):1904-9.
188. Muniyappa R, Sowers JR. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2013 Jan 10.
189. Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2004 Feb;42(2):121-31.
190. OMS. Prévention des maladies cardiovasculaires : Guide de poche pour l'évaluation et la prise en charge du risque cardiovasculaire. 2007.
191. Fleming I, Michaelis UR, Bredenkotter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, et al. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res*. 2001 Jan 19;88(1):44-51.
192. Itoh S, Umemoto S, Hiromoto M, Toma Y, Tomochika Y, Aoyagi S, et al. Importance of NAD(P)H oxidase-mediated oxidative stress and contractile type smooth muscle myosin heavy chain SM2 at the early stage of atherosclerosis. *Circulation*. 2002 May 14;105(19):2288-95.
193. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000 Mar 17;86(5):494-501.
194. Wang JC, Bennett M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ Res*. 2012 Jul 6;111(2):245-59.
195. Strydom HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 Sep;15(9):1512-31.
196. Lakatta EG. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation*. 2003 Jan 28;107(3):490-7.

197. Virmani R, Avolio AP, Mergner WJ, Robinowitz M, Herderick EE, Cornhill JF, et al. Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis. Comparison between occidental and Chinese communities. *The American journal of pathology*. 1991 Nov;139(5):1119-29.
198. Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, van der Vliet A, Maeda H. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J Biol Chem*. 2001 Aug 3;276(31):29596-602.
199. Hornebeck W, Derouette JC, Roland J, Chatelet F, Bouissou H, Robert L. [Correlation between age, arteriosclerosis and elastinolytic activity of human aorta wall]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences Serie D: Sciences naturelles*. 1976 Jun 14;282(22):2003-6.
200. Cohen JR, Sarfati I, Danna D, Wise L. Smooth muscle cell elastase, atherosclerosis, and abdominal aortic aneurysms. *Annals of surgery*. 1992 Sep;216(3):327-30; discussion 30-2.
201. Ooyama T, Fukuda K, Oda H, Nakamura H, Hikita Y. Substratum-bound elastin peptide inhibits aortic smooth muscle cell migration in vitro. *Arteriosclerosis*. 1987 Nov-Dec;7(6):593-8.
202. Mochizuki S, Brassart B, Hinek A. Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2002 Nov 22;277(47):44854-63.
203. Tajima S, Wachi H, Uemura Y, Okamoto K. Modulation by elastin peptide VGVAPG of cell proliferation and elastin expression in human skin fibroblasts. *Archives of dermatological research*. 1997 Jul;289(8):489-92.
204. Yu SY, Blumenthal HT. The calcification of elastic fibers. I. Biochemical studies. *Journal of gerontology*. 1963 Apr;18:119-26.
205. Kieffer P, Robert A, Capdeville-Atkinson C, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene I. Age-related arterial calcification in rats. *Life sciences*. 2000 May 5;66(24):2371-81.
206. Keeley FW, Partridge SM. Amino acid composition and calcification of human aortic elastin. *Atherosclerosis*. 1974 Mar-Apr;19(2):287-96.
207. Simionescu A, Philips K, Vyavahare N. Elastin-derived peptides and TGF-beta1 induce osteogenic responses in smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Aug 26;334(2):524-32.
208. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem*. 2008 May 30;283(22):15319-27.
209. Lee JS, Basalyga DM, Simionescu A, Isenburg JC, Simionescu DT, Vyavahare NR. Elastin calcification in the rat subdermal model is accompanied by up-regulation of degradative and osteogenic cellular responses. *The American journal of pathology*. 2006 Feb;168(2):490-8.
210. Qin X, Corriere MA, Matrisian LM, Guzman RJ. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Jul;26(7):1510-6.
211. Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H. Beta-glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 Nov;15(11):2003-9.
212. Magne D, Bluteau G, Fauchoux C, Palmer G, Vignes-Colombeix C, Pilet P, et al. Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *J Bone Miner Res*. 2003 Aug;18(8):1430-42.

213. Rattazzi M, Bennett BJ, Bea F, Kirk EA, Ricks JL, Speer M, et al. Calcification of advanced atherosclerotic lesions in the innominate arteries of ApoE-deficient mice: potential role of chondrocyte-like cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jul;25(7):1420-5.
214. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res.* 2001 Dec 7;89(12):1147-54.
215. Lau WL, Festing MH, Giachelli CM. Phosphate and vascular calcification: Emerging role of the sodium-dependent phosphate co-transporter PiT-1. *Thrombosis and haemostasis.* 2010 Sep;104(3):464-70.
216. Csiszar A, Ahmad M, Smith KE, Labinskyy N, Gao Q, Kaley G, et al. Bone morphogenetic protein-2 induces proinflammatory endothelial phenotype. *The American journal of pathology.* 2006 Feb;168(2):629-38.
217. Proudfoot D, Shanahan CM. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein. *Nephrology (Carlton).* 2006 Oct;11(5):455-61.
218. Bostrom K, Tsao D, Shen S, Wang Y, Demer LL. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *J Biol Chem.* 2001 Apr 27;276(17):14044-52.
219. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature.* 1997 Mar 6;386(6620):78-81.
220. Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994 Jun;93(6):2393-402.
221. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998 May 1;12(9):1260-8.
222. Atkinson J. Age-related medial elastocalcinosis in arteries: mechanisms, animal models, and physiological consequences. *J Appl Physiol.* 2008 Nov;105(5):1643-51.
223. Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol.* 1993 Oct;22(4 Suppl A):6A-13A.
224. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, et al. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation.* 2009 Jan 27;119(3):480-6.
225. Man JP, Jugdutt BI. Systolic heart failure in the elderly: optimizing medical management. *Heart failure reviews.* 2012 Sep;17(4-5):563-71.
226. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation.* 2005 Sep 20;112(12):e154-235.
227. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, et al. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation.* 2009 Apr 14;119(14):e391-479.

228. Jugdutt BI. Aging and heart failure: changing demographics and implications for therapy in the elderly. *Heart failure reviews*. 2010 Sep;15(5):401-5.
229. Bourantas CV, Loh HP, Sherwi N, Tweddel AC, de Silva R, Lukaschuk EI, et al. Atherosclerotic disease of the abdominal aorta and its branches: prognostic implications in patients with heart failure. *Heart failure reviews*. 2012 Mar;17(2):229-39.
230. Hundley WG, Kitzman DW, Morgan TM, Hamilton CA, Darty SN, Stewart KP, et al. Cardiac cycle-dependent changes in aortic area and distensibility are reduced in older patients with isolated diastolic heart failure and correlate with exercise intolerance. *J Am Coll Cardiol*. 2001 Sep;38(3):796-802.
231. Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1996 May 22-29;275(20):1557-62.
232. Sawabe M. Vascular aging: from molecular mechanism to clinical significance. *Geriatrics & gerontology international*. 2010 Jul;10 Suppl 1:S213-20.
233. Fleg JL, Strait J. Age-associated changes in cardiovascular structure and function: a fertile milieu for future disease. *Heart failure reviews*. 2012 Sep;17(4-5):545-54.
234. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *The European respiratory journal*. 2009 Oct;34(4):888-94.
235. Burgess ML, McCrea JC, Hedrick HL. Age-associated changes in cardiac matrix and integrins. *Mech Ageing Dev*. 2001 Oct;122(15):1739-56.
236. Jugdutt BI. Heart failure in the elderly: advances and challenges. Expert review of cardiovascular therapy. 2010 May;8(5):695-715.
237. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992 Jun 20;339(8808):1523-6.
238. Siemman E, Creasy L. Concentration of phytoalexin resveratrol in wine. *Am J Eno Vitic*. 1992;43:49-52.
239. Basly JP, Marre-Fournier F, Le Bail JC, Habrioux G, Chulia AJ. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life sciences*. 2000 Jan 21;66(9):769-77.
240. Cai L, Koziel JA, Dharmadhikari M, Hans van Leeuwen J. Rapid determination of trans-resveratrol in red wine by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2009 Jan 9;1216(2):281-7.
241. Vinas P, Campillo N, Martinez-Castillo N, Hernandez-Cordoba M. Solid-phase microextraction on-fiber derivatization for the analysis of some polyphenols in wine and grapes using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2009 Feb 27;1216(9):1279-84.
242. Cottart CH, Nivet-Antoine V, Laguillier-Morizot C, Beaudeux JL. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Molecular nutrition & food research*. 2010 Jan;54(1):7-16.
243. Burkon A, Somoza V. Quantification of free and protein-bound trans-resveratrol metabolites and identification of trans-resveratrol-C/O-conjugated diglucuronides - two novel resveratrol metabolites in human plasma. *Molecular nutrition & food research*. 2008 May;52(5):549-57.
244. Marier JF, Vachon P, Gritsas A, Zhang J, Moreau JP, Ducharme MP. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Jul;302(1):369-73.

245. Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, Booth TD, Levine BS. Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci.* 2004 Dec;82(2):614-9.
246. Juan ME, Vinardell MP, Planas JM. The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *J Nutr.* 2002 Feb;132(2):257-60.
247. Williams LD, Burdock GA, Edwards JA, Beck M, Bausch J. Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association.* 2009 Sep;47(9):2170-82.
248. Vaz-da-Silva M, Loureiro AI, Falcao A, Nunes T, Rocha JF, Fernandes-Lopes C, et al. Effect of food on the pharmacokinetic profile of trans-resveratrol. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics.* 2008 Nov;46(11):564-70.
249. Boocock DJ, Faust GE, Patel KR, Schinas AM, Brown VA, Ducharme MP, et al. Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2007 Jun;16(6):1246-52.
250. Almeida L, Vaz-da-Silva M, Falcao A, Soares E, Costa R, Loureiro AI, et al. Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Molecular nutrition & food research.* 2009 May;53 Suppl 1:S7-15.
251. Stojanovic S, Sprinz H, Brede O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of biochemistry and biophysics.* 2001 Jul 1;391(1):79-89.
252. Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, et al. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 3;309(4):1017-26.
253. Holvoet P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiol.* 2004 Oct;59(5):479-84.
254. Zini R, Morin C, Bertelli A, Bertelli AA, Tillement JP. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs under experimental and clinical research.* 1999;25(2-3):87-97.
255. Cao Z, Li Y. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. *European journal of pharmacology.* 2004 Apr 5;489(1-2):39-48.
256. Floreani M, Napoli E, Quintieri L, Palatini P. Oral administration of trans-resveratrol to guinea pigs increases cardiac DT-diaphorase and catalase activities, and protects isolated atria from menadione toxicity. *Life sciences.* 2003 May 2;72(24):2741-50.
257. Li Y, Cao Z, Zhu H. Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society.* 2006 Jan;53(1):6-15.
258. Hassan-Khabbar S, Cottart CH, Wendum D, Vibert F, Clot JP, Savouret JF, et al. Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia-reperfusion: a possible strategy in liver surgery. *Liver Transpl.* 2008 Apr;14(4):451-9.
259. Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology.* 2002 Aug 1;177(1):91-104.
260. Pietraforte D, Turco L, Azzini E, Minetti M. On-line EPR study of free radicals induced by peroxidase/H(2)O(2) in human low-density lipoprotein. *Biochimica et biophysica acta.* 2002 Jul 11;1583(2):176-84.

261. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, et al. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002 Sep 24;106(13):1652-8.
262. Das S, Alagappan VK, Bagchi D, Sharma HS, Maulik N, Das DK. Coordinated induction of iNOS-VEGF-KDR-eNOS after resveratrol consumption: a potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart. *Vascul Pharmacol*. 2005 Apr-May;42(5-6):281-9.
263. Spanier G, Xu H, Xia N, Tobias S, Deng S, Wojnowski L, et al. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2009 Oct;60 Suppl 4:111-6.
264. Frombaum M, Therond P, Djelidi R, Beaudeux JL, Bonnefont-Rousselot D, Borderie D. Piceatannol is more effective than resveratrol in restoring endothelial cell dimethylarginine dimethylaminohydrolase expression and activity after high-glucose oxidative stress. *Free Radic Res*. 2011 Mar;45(3):293-302.
265. Wu KK. Platelet activation mechanisms and markers in arterial thrombosis. *Journal of internal medicine*. 1996 Jan;239(1):17-34.
266. Zbikowska HM, Olas B, Wachowicz B, Krajewski T. Response of blood platelets to resveratrol. *Platelets*. 1999 Jul;10(4):247-52.
267. Zbikowska HM, Olas B. Antioxidants with carcinostatic activity (resveratrol, vitamin E and selenium) in modulation of blood platelet adhesion. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2000 Sep;51(3):513-20.
268. Olas B, Wachowicz B, Stochmal A, Oleszek W. Anti-platelet effects of different phenolic compounds from *Yucca schidigera* Roezl. bark. *Platelets*. 2002 May;13(3):167-73.
269. Olas B, Wachowicz B, Holmsen H, Fukami MH. Resveratrol inhibits polyphosphoinositide metabolism in activated platelets. *Biochimica et biophysica acta*. 2005 Aug 15;1714(2):125-33.
270. Iuliano L, Colavita AR, Leo R, Pratico D, Violi F. Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(6):999-1006.
271. Wachowicz B, Olas B, Zbikowska HM, Buczynski A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets*. 2002 May;13(3):175-82.
272. Malinowska J, Olas B. Response of blood platelets to resveratrol during a model of hyperhomocysteinemia. *Platelets*. 2011;22(4):277-83.
273. Olas B, Kedzierska M, Wachowicz B. Comparative studies on homocysteine and its metabolite-homocysteine thiolactone action in blood platelets in vitro. *Platelets*. 2008 Nov;19(7):520-7.
274. Hamberg M, Svensson J, Wakabayashi T, Samuelsson B. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974 Feb;71(2):345-9.
275. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Aug;72(8):2994-8.
276. Elmali N, Baysal O, Harma A, Esenkaya I, Mizrak B. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. *Inflammation*. 2007 Apr;30(1-2):1-6.
277. Birrell MA, McCluskie K, Wong S, Donnelly LE, Barnes PJ, Belvisi MG. Resveratrol, an extract of red wine, inhibits lipopolysaccharide induced airway neutrophilia and inflammatory mediators through an NF-kappaB-independent mechanism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005 May;19(7):840-1.

278. Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Apr 1;23(4):622-9.
279. Zhang J, Chen J, Yang J, Xu CW, Pu P, Ding JW, et al. Resveratrol Attenuates Oxidative Stress Induced by Balloon Injury in the Rat Carotid Artery Through Actions on the ERK1/2 and NF-Kappa B Pathway. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology.* 2013 Feb 14;31(2-3):230-41.
280. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol.* 2000 Jun 15;164(12):6509-19.
281. Khanduja KL, Bhardwaj A, Kaushik G. Resveratrol inhibits N-nitrosodiethylamine-induced ornithine decarboxylase and cyclooxygenase in mice. *Journal of nutritional science and vitaminology.* 2004 Feb;50(1):61-5.
282. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell.* 2006 Dec 15;127(6):1109-22.
283. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 2006 Nov 16;444(7117):337-42.
284. Aubin MC, Lajoie C, Clement R, Gosselin H, Calderone A, Perrault LP. Female rats fed a high-fat diet were associated with vascular dysfunction and cardiac fibrosis in the absence of overt obesity and hyperlipidemia: therapeutic potential of resveratrol. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Jun;325(3):961-8.
285. Kim S, Jin Y, Choi Y, Park T. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochem Pharmacol.* 2011 Jun 1;81(11):1343-51.
286. Rocha KK, Souza GA, Ebaid GX, Seiva FR, Cataneo AC, Novelli EL. Resveratrol toxicity: effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association.* 2009 Jun;47(6):1362-7.
287. Rivera L, Moron R, Zarzuelo A, Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol.* 2009 Mar 15;77(6):1053-63.
288. Shang J, Chen LL, Xiao FX. [Resveratrol improves high-fat induced nonalcoholic fatty liver in rats]. *Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese journal of hepatology.* 2008 Aug;16(8):616-9.
289. Turrens JF, Lariccia J, Nair MG. Resveratrol has no effect on lipoprotein profile and does not prevent peroxidation of serum lipids in normal rats. *Free Radic Res.* 1997 Dec;27(6):557-62.
290. Wilson T, Knight TJ, Beitz DC, Lewis DS, Engen RL. Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life sciences.* 1996;59(1):PL15-21.
291. Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1982 May;30(5):1766-70.
292. Miura D, Miura Y, Yagasaki K. Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats. *Life sciences.* 2003 Aug 1;73(11):1393-400.

293. Do GM, Kwon EY, Kim HJ, Jeon SM, Ha TY, Park T, et al. Long-term effects of resveratrol supplementation on suppression of atherogenic lesion formation and cholesterol synthesis in apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Sep 12;374(1):55-9.
294. Fukao H, Ijiri Y, Miura M, Hashimoto M, Yamashita T, Fukunaga C, et al. Effect of trans-resveratrol on the thrombogenicity and atherogenicity in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2004 Sep;15(6):441-6.
295. Xia N, Daiber A, Habermeier A, Closs EI, Thum T, Spanier G, et al. Resveratrol reverses endothelial nitric-oxide synthase uncoupling in apolipoprotein E knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Oct;335(1):149-54.
296. Belguendouz L, Fremont L, Gozzelino MT. Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. *Biochem Pharmacol*. 1998 Mar 15;55(6):811-6.
297. Fremont L, Belguendouz L, Delpal S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life sciences*. 1999;64(26):2511-21.
298. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*. 2005 Mar 3;434(7029):113-8.
299. Palsamy P, Subramanian S. Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic beta-cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Journal of cellular physiology*. 2010 Aug;224(2):423-32.
300. Um JH, Park SJ, Kang H, Yang S, Foretz M, McBurney MW, et al. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes*. 2010 Mar;59(3):554-63.
301. Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X, et al. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab*. 2007 Oct;6(4):307-19.
302. Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T. Resveratrol and genistein as adenosine triphosphate-depleting agents in fat cells. *Metabolism: clinical and experimental*. 2011 May;60(5):720-9.
303. Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T. Resveratrol, a naturally occurring diphenolic compound, affects lipogenesis, lipolysis and the antilipolytic action of insulin in isolated rat adipocytes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2009 Jan;113(1-2):17-24.
304. Brasnyo P, Molnar GA, Mohas M, Marko L, Laczy B, Cseh J, et al. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *The British journal of nutrition*. 2011 Aug;106(3):383-9.
305. Crandall JP, Oram V, Trandafirescu G, Reid M, Kishore P, Hawkins M, et al. Pilot study of resveratrol in older adults with impaired glucose tolerance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012 Dec;67(12):1307-12.
306. Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab*. 2011 Nov 2;14(5):612-22.
307. Chung JH, Manganiello V, Dyck JR. Resveratrol as a calorie restriction mimetic: therapeutic implications. *Trends in cell biology*. 2012 Oct;22(10):546-54.
308. Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annual review of biochemistry*. 2007;76:481-511.

309. Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*. 2012 Feb 3;148(3):421-33.
310. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012 Apr;13(4):251-62.
311. Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 2000 Sep 22;289(5487):2126-8.
312. Wang Y, Tissenbaum HA. Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO. *Mech Ageing Dev*. 2006 Jan;127(1):48-56.
313. Rogina B, Helfand SL. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 9;101(45):15998-6003.
314. Rebrin I, Forster MJ, Sohal RS. Association between life-span extension by caloric restriction and thiol redox state in two different strains of mice. *Free Radic Biol Med*. 2011 Jul 1;51(1):225-33.
315. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*. 2009 Jul 10;325(5937):201-4.
316. Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Choi JS, Yu BP. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microsc Res Tech*. 2002 Nov 15;59(4):264-72.
317. Kim HJ, Jung KJ, Yu BP, Cho CG, Choi JS, Chung HY. Modulation of redox-sensitive transcription factors by calorie restriction during aging. *Mech Ageing Dev*. 2002 Nov;123(12):1589-95.
318. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003 Sep 11;425(6954):191-6.
319. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*. 2004 Aug 5;430(7000):686-9.
320. Bauer JH, Goupil S, Garber GB, Helfand SL. An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 31;101(35):12980-5.
321. Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol*. 2006 Feb 7;16(3):296-300.
322. Bass TM, Weinkove D, Houthoofd K, Gems D, Partridge L. Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev*. 2007 Oct;128(10):546-52.
323. Kaeberlein M, McDonagh T, Heltweg B, Hixon J, Westman EA, Caldwell SD, et al. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem*. 2005 Apr 29;280(17):17038-45.
324. Fujitaka K, Otani H, Jo F, Jo H, Nomura E, Iwasaki M, et al. Modified resveratrol Longevinex improves endothelial function in adults with metabolic syndrome receiving standard treatment. *Nutr Res*. 2011 Nov;31(11):842-7.
325. Yoshino J, Conte C, Fontana L, Mittendorfer B, Imai S, Schechtman KB, et al. Resveratrol supplementation does not improve metabolic function in nonobese women with normal glucose tolerance. *Cell Metab*. 2012 Nov 7;16(5):658-64.
326. Poulsen MM, Vestergaard PF, Clasen BF, Radko Y, Christensen LP, Stodkilde-Jorgensen H, et al. High-dose resveratrol supplementation in obese men: an investigator-

- initiated, randomized, placebo-controlled clinical trial of substrate metabolism, insulin sensitivity, and body composition. *Diabetes*. 2013 Apr;62(4):1186-95.
327. Wong RH, Howe PR, Buckley JD, Coates AM, Kunz I, Berry NM. Acute resveratrol supplementation improves flow-mediated dilatation in overweight/obese individuals with mildly elevated blood pressure. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011 Nov;21(11):851-6.
328. Magyar K, Halmosi R, Palfi A, Feher G, Czopf L, Fulop A, et al. Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2012;50(3):179-87.
329. Bhatt JK, Thomas S, Nanjan MJ. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Res*. 2012 Jul;32(7):537-41.
330. De Groote D, Van Belleghem K, Deviere J, Van Brussel W, Mukaneza A, Amininejad L. Effect of the intake of resveratrol, resveratrol phosphate, and catechin-rich grape seed extract on markers of oxidative stress and gene expression in adult obese subjects. *Annals of nutrition & metabolism*. 2012;61(1):15-24.
331. Ghanim H, Sia CL, Abuaysheh S, Korzeniewski K, Patnaik P, Marumganti A, et al. An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of *Polygonum cuspidatum* containing resveratrol. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Sep;95(9):E1-8.
332. Tome-Carneiro J, Gonzalez M, Larrosa M, Garcia-Almagro FJ, Aviles-Plaza F, Parra S, et al. Consumption of a grape extract supplement containing resveratrol decreases oxidized LDL and ApoB in patients undergoing primary prevention of cardiovascular disease: a triple-blind, 6-month follow-up, placebo-controlled, randomized trial. *Molecular nutrition & food research*. 2012 May;56(5):810-21.
333. Tome-Carneiro J, Gonzalez M, Larrosa M, Yanez-Gascon MJ, Garcia-Almagro FJ, Ruiz-Ros JA, et al. One-year consumption of a grape nutraceutical containing resveratrol improves the inflammatory and fibrinolytic status of patients in primary prevention of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2012 Aug 1;110(3):356-63.
334. Mills E, Kuhn CM, Feinglos MN, Surwit R. Hypertension in CB57BL/6J mouse model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The American journal of physiology*. 1993 Jan;264(1 Pt 2):R73-8.
335. Stewart-Phillips JL, Lough J. Pathology of atherosclerosis in cholesterol-fed, susceptible mice. *Atherosclerosis*. 1991 Oct;90(2-3):211-8.
336. Hebert-Schuster M, Cottart CH, Laguillier-Morizot C, Raynaud-Simon A, Golmard JL, Cynober L, et al. Catalase rs769214 SNP in elderly malnutrition and during renutrition: is glucagon to blame? *Free Radic Biol Med*. 2011 Oct 15;51(8):1583-8.
337. Fabre EE, Raynaud-Simon A, Golmard JL, Hebert M, Dulcire X, Succari M, et al. Gene polymorphisms of oxidative stress enzymes: prediction of elderly renutrition. *The American journal of clinical nutrition*. 2008 May;87(5):1504-12.
338. Guo X, Williams JG, Schug TT, Li X. DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1. *J Biol Chem*. 2010 Apr 23;285(17):13223-32.
339. Papadopoulos C, Arato K, Lilienthal E, Zerweck J, Schutkowski M, Chatain N, et al. Splice variants of the dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 4 (DYRK4) differ in their subcellular localization and catalytic activity. *J Biol Chem*. 2011 Feb 18;286(7):5494-505.
340. Savouret JF, Berdeaux A, Casper RF. The aryl hydrocarbon receptor and its xenobiotic ligands: a fundamental trigger for cardiovascular diseases. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2003 Apr;13(2):104-13.

341. Revel A, Raanani H, Younglai E, Xu J, Rogers I, Han R, et al. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects lung from DNA damage and apoptosis caused by benzo[a]pyrene. *J Appl Toxicol*. 2003 Jul-Aug;23(4):255-61.
342. Guyot E, Coumoul X, Chasse JF, Khallouki F, Savouret JF, Poirot M, et al. Identification of a new stilbene-derived inducer of paraoxonase 1 and ligand of the Aryl hydrocarbon Receptor. *Biochem Pharmacol*. 2012 Mar 1;83(5):627-32.
343. Wu D, Nishimura N, Kuo V, Fiehn O, Shahbaz S, Van Winkle L, et al. Activation of aryl hydrocarbon receptor induces vascular inflammation and promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Jun;31(6):1260-7.
344. Zordoky BN, El-Kadi AO. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and beta-naphthoflavone induce cellular hypertrophy in H9c2 cells by an aryl hydrocarbon receptor-dependant mechanism. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2010 Apr;24(3):863-71.
345. Wang C, Xu CX, Krager SL, Bottum KM, Liao DF, Tischkau SA. Aryl hydrocarbon receptor deficiency enhances insulin sensitivity and reduces PPAR-alpha pathway activity in mice. *Environmental health perspectives*. 2011 Dec;119(12):1739-44.
346. Dabir P, Marinic TE, Krukovets I, Stenina OI. Aryl hydrocarbon receptor is activated by glucose and regulates the thrombospondin-1 gene promoter in endothelial cells. *Circ Res*. 2008 Jun 20;102(12):1558-65.
347. Tanos R, Patel RD, Murray IA, Smith PB, Patterson AD, Perdew GH. Aryl hydrocarbon receptor regulates the cholesterol biosynthetic pathway in a dioxin response element-independent manner. *Hepatology*. 2012 Jun;55(6):1994-2004.
348. Angrish MM, Dominici CY, Zacharewski TR. TCDD-elicited effects on liver, serum, and adipose lipid composition in C57BL/6 mice. *Toxicol Sci*. 2013 Jan;131(1):108-15.

ANNEXES

1. ANNEXE 1 : MATERIEL ET METHODES

1.1. Suivi longitudinal

Les souris sont suivies pendant une période de douze semaines. Une observation quotidienne de leur comportement et de leur état de santé est mise en place (qualité du poil, présence de zones de dépilation). Elles sont pesées toutes les deux semaines, en début d'après-midi (entre 14 et 16 heures). La quantité de nourriture ingérée par cage est mesurée tous les jours par pesée, en calculant la différence entre la masse donnée la veille et celle restante. Ces pesées permettent d'évaluer l'apport calorique journalier ainsi que la quantité de resvératrol ingéré.

1.2. Test de tolérance au glucose

Au terme des 12 semaines de traitement, la glycémie à jeun (GAJ) est mesurée chez tous les animaux. Pour cela, la nourriture est retirée des cages à 6 heures le matin. La détermination des glycémies capillaires est réalisée à 12 heures, soit après un jeûne de 6 heures. Une goutte de sang est obtenue par section de l'extrémité de la queue au scalpel et la glycémie capillaire est mesurée à l'aide d'un Glucomètre One Touch Easy[®] (LifeScan[®]) avec des bandelettes One Touch Ultra[®]. Une injection intra-péritonéale de glucose (G30 Aguetant[®]) à hauteur de 2 mg/kg est ensuite immédiatement réalisée. Les glycémies capillaires sont alors mesurées toutes les 30 minutes pendant une période de deux heures. La réponse à la charge de glucose est évaluée en analysant chaque point individuellement ainsi qu'en les intégrant dans une aire sous courbe en utilisant la méthode de trapèzes.

1.3. Exploration de l'activité locomotrice

Au terme des 12 semaines de suivi, l'activité locomotrice des animaux est évaluée pendant 30 minutes grâce à un actimètre (Immetronic[®]) composé de huit cages de dimensions 34 × 21 × 19 cm. Une souris est placée dans chaque cage. La lumière est contrôlée avec un éclairage ne dépassant pas 5 lux. La présence de faisceaux lumineux à l'avant, au milieu, à l'arrière ainsi qu'en hauteur permet de compter le nombre de déplacements horizontaux (activité horizontale) ainsi que le nombre de redressements (activité verticale) pour chaque animal. Les cinq premières minutes correspondent à la phase d'exploration. Les 25 minutes suivantes sont utilisées pour quantifier l'activité locomotrice des souris des différents groupes.

1.4. Echographie-doppler cardiovasculaire

L'étude fonctionnelle cardiovasculaire est réalisée en collaboration avec la Plate-forme d'Imagerie du Petit Animal (PIPA), à l'Institut Cochin. Sous anesthésie générale par isoflurane inhalé, les animaux subissent un écho-doppler en mode TM (Time Motion) (Ultrasound Biomicroscope Vevo 770[®] Visual Sonic[®]) afin de poser des mesures vasculaires (sonde 704) et cardiaques (sonde 707B).

1.4.1. Exploration vasculaire

L'analyse vasculaire est réalisée à deux localisations de l'aorte : peu après la valve aortique (aorte thoracique) et au niveau abdominal (aorte abdominale). Elle permet de mesurer :

- la distance adventice-adventice en systole et diastole
- la distance intima-intima en systole et diastole

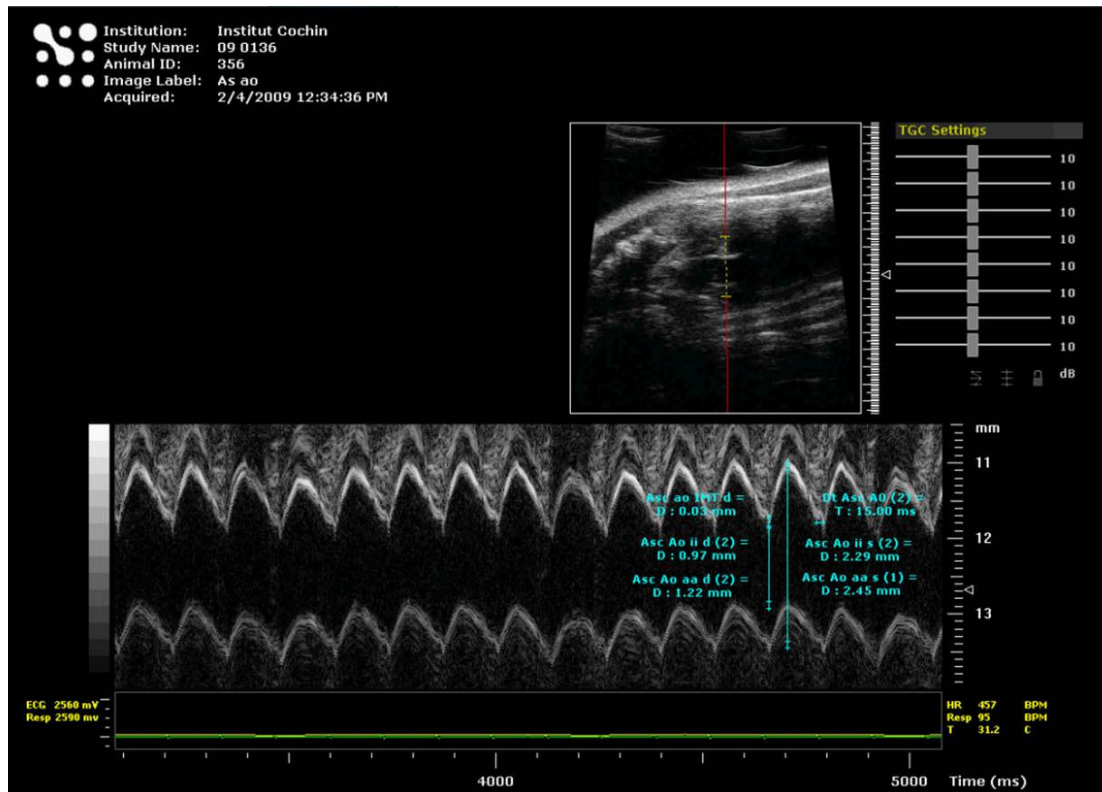


Figure 17 : Echographie-doppler vasculaire (Ultrasound Biomicroscope Vevo 770[®] Visual Sonic[®], sonde 704).

Ces mesures permettent dans un second temps de calculer les distensibilités artérielles de l'aorte au niveau thoracique et abdominal par le rapport de la différence de diamètre interne du vaisseau en systole et en diastole sur le diamètre en diastole ainsi que l'épaisseur intima-média en diastole.

1.4.2. Exploration cardiaque

La fréquence cardiaque est obtenue par le tracé électrocardiographique. Les mesures posées grâce aux images écho-doppler permettent de déterminer :

- l'épaisseur du mur postérieur cardiaque en systole et en diastole (LVPW.s et LVPW.d)
- le diamètre interne du ventricule gauche en systole et en diastole (LVID.s et LVID.d)
- l'épaisseur du septum inter-ventriculaire en systole et en diastole (IVS.s et IVS.d)
- le temps de contraction isovolumique (IVCT)
- le temps de relaxation isovolumique (IVRT)
- les dimensions cardiaques en systole et diastole en grand axe, petit axe en vue oblique droite et petit axe en vue oblique gauche.

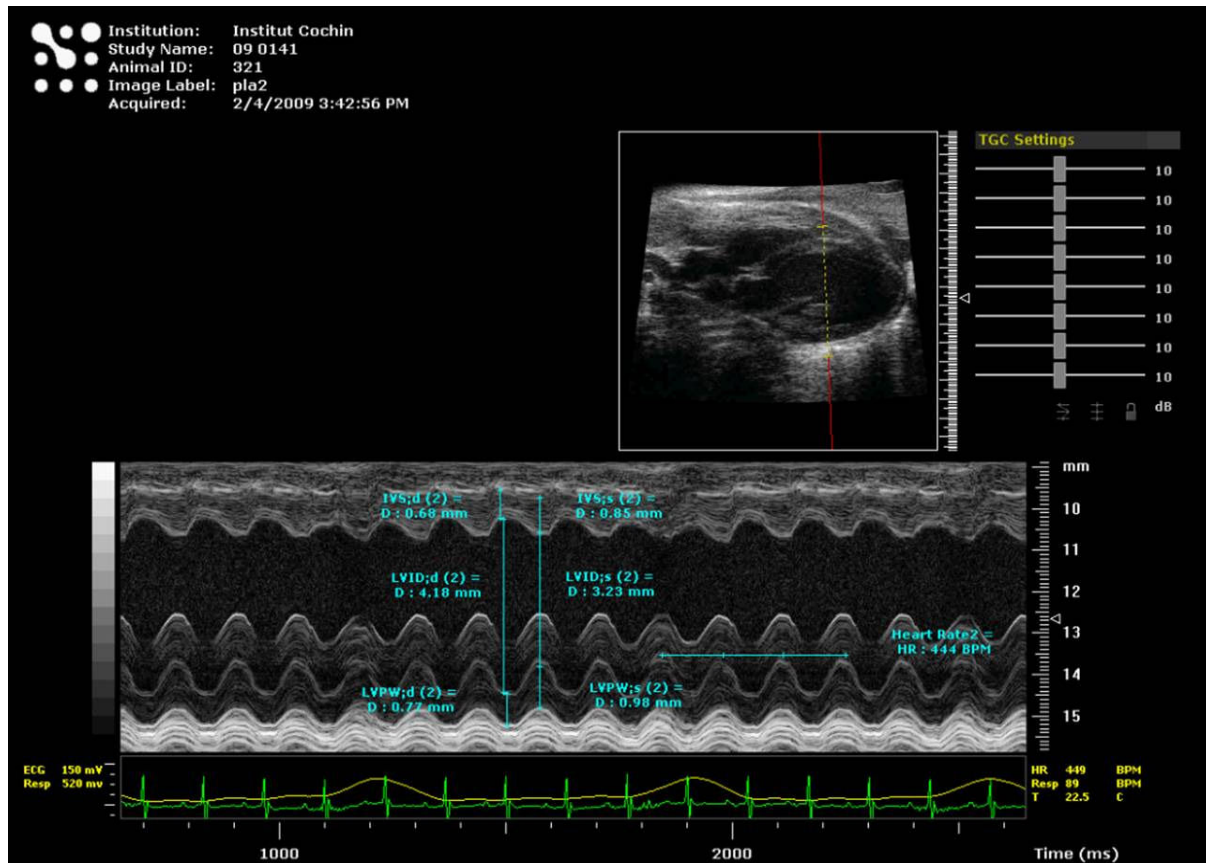


Figure 18 : Echographie-doppler cardiaque (Ultrasound Biomicroscope Vevo 770[®] Visual Sonic[®], sonde 707B).

Ces mesures permettent de calculer de nombreux paramètres :

- l'épaississement du mur postérieur (PWTH) : $PWTH = (LVPW.s - LVPW.d) / LVPW.d$.

- le volume ventriculaire gauche en systole (volume télésystolique : LV Vol.s) et en diastole (volume télédiastolique : LV Vol.d), calculé par la méthode de Dodge qui suppose que la forme du ventricule gauche correspond à un ellipsoïde idéal :

$$LV\ Vol = ((7,0 / (2,4 + LVID)) \times LVID)^3$$
- la fraction de raccourcissement (FS) : $FS = (LV\ Vol.d - LV\ Vol.s) / LVID.d$
- la fraction d'éjection systolique (FES) : $FES = (LV\ Vol.d - LV\ Vol.s) / LV\ Vol.d$
- le débit cardiaque (DC) : $DC = FC \times (LV\ Vol.d - LV\ Vol.s)$
- la masse du ventricule gauche (LV masse) : $LV\ masse = 0,8 \times 1,053 \times ((LVID.d + LVPW.d + IVS.d)^3 - LVID.d^3)$

1.5. Mesure de la pression artérielle

Sous anesthésie (isoflurane inhalé en induction à 5% puis maintenu à 2%), un cathéter est placé dans l'artère carotide afin de mesurer les pressions artérielles systoliques (PAS) et diastoliques (PAD). Le logiciel AcqKnowledgeR est utilisé pour l'enregistrement des mesures. Les pressions moyennes et pressions pulsées sont calculées à partir de ces mesures. La pression moyenne ($PM = (PAS + 2 \times PAD)/3$) et pression pulsée ($PP = PAS - PAD$) sont calculées.

1.6. Exploration de la réactivité artérielle

L'exploration de la réactivité artérielle a été menée sur deux types de vaisseaux, l'aorte (artère élastique) et l'artère mésentérique (artère musculaire). Des segments de 2 mm de long, d'aorte ou d'artère mésentérique, sont disséqués et montés sur un myographe. Deux fils sont insérés dans la lumière des artères et fixés au transducteur et au micromètre. Les artères sont baignées dans une solution saline physiologique à pH 7,4, avec une pression partielle en oxygène à 160 mm de mercure et en dioxyde de carbone à 37 mm de mercure. Une tension optimale est ensuite appliquée. La viabilité de l'artère est testée par une solution riche en potassium (80 mmol/L). Dans un second temps, une courbe-réponse à la phényléphrine est réalisée (0.001–10 μ mol/L). Après une phase de lavage puis une pré-contraction de l'artère avec solution de phényléphrine (3 μ mol/L), une courbe-réponse à l'acétylcholine, puissant agent vasorelaxant, est réalisée (0.001–10 μ mol/L). Pour évaluer les différents processus impliqués dans la réponse à l'acétylcholine, des pré-incubations sont réalisées avec différentes molécules. L'implication du stress oxydant est évaluée par la réponse à l'acétylcholine après une pré-incubation avec une solution de catalase (80 U/mL) et tempol, un analogue de la superoxyde dismutase (10 μ mol/L) ; de même, une pré-incubation a été réalisée avec un mélange de

tétrahydrobiotpérine (co-facteur de la NOS) et d'arginine (substrat donneur de NO de la NOS) afin d'explorer le rôle de la NOS, et enfin une pré-incubation avec CAY 10404 (10^{-5} mol/L), un inhibiteur spécifique de la COX 2, afin d'évaluer son implication dans la vasodilatation artérielle.

1.7. Euthanasie

Les animaux sont sacrifiés conformément aux règles en vigueur dans le cadre de l'expérimentation animale. Brièvement, les animaux, anesthésiés par l'isoflurane inhalé, sont euthanasiés par section de la veine cave. Le sang est immédiatement collecté sur tube sec, conservé 30 minutes pour une coagulation complète avant centrifugation à 2000g pendant 15 minutes. Le sérum est ensuite aliquoté et conservé à -80°C . L'aorte est disséquée, de la crosse aortique à la bifurcation des artères rénales, et les sections conservées dans les conditions adaptées aux différentes analyses prévues.

1.8. Dosages systémiques

Les analyses sériques sont réalisées sur automate Architect Ci8200[®] Abbott[®] au sein du Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Charles Foix, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Ivry sur Seine. Les paramètres systémiques mesurés par cette technique sont les concentrations de triglycérides, cholestérol total, HDL-cholestérol, protides, calcium total, phosphate, glycémie, urée, ALAT. L'albuminémie est mesurée par la méthode au vert de bromocrésol en plaque 96 puits avec une lecture à 570 nm. La mesure de la répartition des sous-fractions du HDL-cholestérol est réalisée avec le kit Lipoprint HDL (Eurobio[®]). Deux fractions de HDL sont ainsi séparées, les fractions larges et les fractions considérées comme non larges (petites et intermédiaires). Les dosages multiplexés en phase liquide permettent la détermination concomitante de plusieurs paramètres sur un volume réduit d'échantillon. Brièvement, le sérum est incubé avec le mélange des différents anticorps de capture, couplés à des billes avec des fluorochromes spécifiques de chaque anticorps, pendant 18 heures à $+4^{\circ}\text{C}$, à l'abri de la lumière. Après trois lavages, les anticorps de révélation, dirigés contre les anticorps primaires et couplés à la biotine, sont incubés 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction est révélée par la streptavidine-phycoérythrine (30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière). La lecture est réalisée sur un luminomètre Bioplex[®], Biorad[®] pourvu de deux lasers, le premier permettant l'identification de l'analyte par le fluorochrome spécifique et le second la quantification de la réaction. Les kits utilisés sont le kit Mouse Serum Adipokine 3-plex Lincoplex[®] (insuline, résistine, leptine), le kit

Cytokine souris Lincoplex[®] (Millipore[®]) (KC, RANTES, IL1 β , IL6, TNF α , MCP-1, MIP1 β) ainsi que le kit Lincoplex[®] (Millipore[®]) (GIP, PYY, PP et glucagon). L'indice d'insulino-résistance HOMA-IR est déterminé par le produit de la glycémie précédemment mesurée (en mmol/L) par l'insulinémie (en mUI/L) divisé par 22,5.

1.9. Analyse histologique des artères

Après dissection, une section d'aorte abdominale est fixée dans du liquide de Bouin pendant 18 heures, rincées, déshydratée et incluses en paraffine. Des sections de 6 μ m sont réalisées au microtome puis fixées sur des lames. Avant les différentes colorations, les coupes sont déparaffinées dans des bains successifs HistoClear[®] (substitut au xylène) puis d'alcool 100, 95 et 70%. Après les colorations décrites ci-après, les coupes sont déshydratées dans des bains croissants d'alcool à 70, 95 et 100% puis dans l'HistoClear[®] et enfin montées au Cytoseal[®] et recouvertes de lamelles pour l'examen microscopique. Les images sont réalisées sur un microscope Leica DM 3000 et un appareil photographique Leica DFC 420C (Leica Microsystem Ltd[®]).

1.9.1. Coloration à l'hémalun-éosine

Les sections d'aorte sur lame sont à l'hémalun-éosine : Hémalun de Mayer RAL 320 553 pendant 8 minutes, rinçage à l'eau clair, puis éosine jaunâtre (Merck CI 45380) à 1% en solution alcoolique pendant 5 minutes. L'analyse morphométrique comprend l'étude de deux paramètres. L'épaisseur intima-média (EIM) est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ[®] : pour chaque section d'aorte, 10 mesures en 10 points différents sont prises, l'EIM est déterminée par la moyenne de ces 10 mesures. La densité cellulaire de la média est déterminée par le rapport du nombre de noyaux par unité de surface de la média (logiciel ImageJ[®]).

1.9.2. Coloration au rouge Sirius

Le rouge Sirius est un colorant des fibres de collagène et de réticuline. Les lames déparaffinées comme précédemment décrit, sont plongées 10 minutes dans une solution filtrée de Rouge Sirius (0,1%) saturée en acide picrique. La coupe est ensuite rincée par un jet d'alcool à 95°, rincée dans deux bains d'alcool absolu puis montée sous lamelle avec du Cytoseal[®]. Les images sont réalisées sur le matériel précédemment décrits. La quantification du collagène est réalisée grâce au logiciel NIH ImageJ[®] en mesurant l'intensité de coloration rouge.

1.10. Analyse de la calcification aortique

Des sections d'aorte congelées ont été déshydratées (3 jours à l'étuve à 37°C). La masse sèche obtenue est pesée. Le tissu sec est ensuite dissout dans de l'acide nitrique 14 N en le laissant au moins 24 heures en contact (50 µL pour une masse de tissu sec de 1 mg, avec un volume minimum de 60 µL nécessaire pour la réalisation du dosage). Après centrifugation 10 min à 2000 g, le surnageant est conservé pour mesure de la concentration de calcium. Le calcium est mesuré par spectrométrie d'absorption atomique avec une flamme air-acétylène à une longueur d'onde de 422,7 nm sur un spectromètre d'absorption atomique Analyst 100 (Perkin Elmer®) et une lampe à cathode creuse multi-éléments. La concentration de calcium est rapportée au volume d'acide nitrique utilisé pour la dissolution de la masse sèche d'aorte. Les résultats sont exprimés en mmol de calcium par gramme de tissu sec.

1.11. Analyse de l'expression des gènes

Des fragments congelés des différents tissus analysés (aorte, artère mésentérique, foie) sont broyés à froid avec un Ultra-Turrax J25 (Fisher-Bioblock) dans du Trizol (Invitrogen®) pendant une minute. Les ARNm sont extraits selon la méthode de Chomczynski. Le chloroforme est ajouté à l'homogénat transféré dans un eppendorff stérile qui est ensuite vigoureusement agité. Après incubation de 15 minutes sur la glace, l'échantillon est centrifugé 20 minutes à +4°C à 12 000g. La phase aqueuse supérieure contenant les ARN est transférée dans un eppendorff stérile auquel est ajouté 20 µg de glycogène afin de faciliter la précipitation et la visualisation du culot d'ARN. L'alcool isopropylique est également ajouté. L'échantillon est ensuite homogénéisé et conservé la nuit à -20°C pour précipitation des ARN. Le lendemain, l'échantillon est centrifugé 20 minutes à 10 000 g à +4°C pour éliminer le surnageant et conservé le culot. Celui-ci est ensuite nettoyé en ajoutant une solution d'éthanol à 75%. Après homogénéisation au vortex, l'échantillon est centrifugé 10 minutes à 7500 g à +4°C. Le surnageant alcoolique est ensuite éliminé, le culot séché sous hotte puis repris avec de l'eau stérile. Enfin, le culot est dissous en plaçant l'échantillon à 55-60 °C pendant une dizaine de minutes.

La quantité d'ARNm est évaluée par la mesure de l'absorbance à 260 nm (absorbance des ARN) et sa qualité par le ratio de l'absorbance à 260 nm sur celle à 280 nm (absorbance des protéines) sur un Nanodrop®. Ce ratio doit être compris entre 1,8 et 2,1. Le profil de migration observée en déposant les ARNm extraits (2 µL d'échantillon avec 10 µL de bleu de charge) sur un gel d'agarose à 1% avec 2,5% de bromure d'éthidium (100V pendant environ 30 minutes). Le profil attendu doit présenter deux bandes à 2 et 5 kDa correspondant aux ARN 18 et 28S respectivement, attestant ainsi de la non-dégradation des ARNm.

Une aliquote de 1 µg d'ARNm est traitée avec la DNase I (Invitrogen®) et converti en cDNA par la transcriptase inverse Superscript II, les amorces oligo (dT)₁₂₋₁₈, et la RNase Out Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen®). Les ADNc obtenus sont soumis à une PCR en temps réelle sur ABI 7900HT Fast Real-Time PCR en utilisant les différentes amorces correspondant aux gènes étudiés (Qiagen®) et le réactif SYBR Green PCR (Qiagen®). Toutes les réactions ont été réalisées en triplicates dans un volume final de 20 µL. La protéine ribosomale L4 est utilisée comme gène de ménage après validation. Les données sont analysées en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ développée par Livak et Schmittgen. Les couples d'amorces suivantes ont été utilisées : RPL-4, p47-phox, NOS II, NOS III, DDAH 2, IL1, IL6, IL 10, TNF α , TRX 1, TRX 2, TXNIP, COX 1, COX 2, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, BMP-2, ostéoprotégérine, RANK, RANK-L, MGP, ostéocalcine (Qiagen®)

1.12. Analyse immunohistochimique des artères

1.12.1. Analyse de l'expression protéique

L'analyse immunohistochimique est réalisée en collaboration avec le SCICM. Une section d'aorte abdominale est prélevée et immédiatement placée dans un milieu de congélation (Tissue Tek OCT Compound®), congelée à -40°C (isopentane avec alcool absolu et carboglace) puis conservée à -80°C. Des coupes de 10 µm sont réalisées au Cryostat DM 1900 (Leica®), montées sur lames Super Frost Plus et fixées dans le paraformaldéhyde à 4% dans un tampon phosphate (PBS Sigma®) pendant 10 minutes. Le blocage est réalisé par un mélange PBS - BSA 1% - Sérum de Chèvre 10% pendant 30 minutes à température ambiante (BSA IgG free Invitrogen®, Normal goat serum Invitrogen®). Les anticorps primaires utilisés sont les suivants :

- p47-phox : anticorps polyclonal de lapin (Santa Cruz®)
- NOS III : anticorps polyclonal de lapin (BD Transduction®)
- NOS II : polyclonal de lapin (BD Transduction®)
- IL1 : anticorps polyclonal de lapin (Abcam®)
- TNF α : anticorps polyclonal de lapin (Abcam®)
- TRX 1 : anticorps monoclonal de souris (Abcam®)
- TXNIP : anticorps monoclonal de souris (MBL®)
- SIRT 1 : anticorps polyclonal de lapin (Millipore Upstate®)
- Nitrotyrosine : anticorps polyclonal de lapin (Millipore Upstate®)

Ils sont dilués (au 1/100^{ème} ou 1/200^{ème} dans du tampon phosphate saline) et incubés une nuit à +4°C en chambre humide.

Les anticorps secondaires sont utilisés dilués au 1/200^{ème} et incubés une heure à température ambiante en chambre humide à l'abri de la lumière. Ils sont choisis en fonction de l'anticorps primaire :

- anticorps de chèvre anti-immunoglobuline G de lapin, couplé à l'Alexa Fluor 555 ou 488 (Invitrogen®).
- anticorps de chèvre anti-immunoglobuline G de souris, couplé à l'Alexa Fluor 555 ou 488 (Invitrogen®).

Les coupes sont ensuite contremarquées afin de délimiter les zones d'intérêt. Le marquage de la média (actine des cellules musculaires lisses marquée par un anticorps anti-phalloïdine, couplé à l'Alexa Fluor 488, Invitrogen®) ou celui de l'endothélium par le marquage anti CD31 (monoclonal de rat Pharmingen®) révèle un anticorps de chèvre anti-immunoglobuline G de rat couplé à l'Alexa Fluor 555 (Invitrogen®). Les noyaux sont marqués par le To-Pro3® qui reconnaît l'ADN double brin marqué par couplé à (Invitrogen®), dilué au 1/500^{ème}. Les contrôles (autofluorescence de la coupe et remplacement des anticorps primaires par des immunoglobulines non immunes des espèces correspondantes) sont réalisés lors de chaque expérience. Les coupes sont observées au microscope confocal Leica DM IRB® et analysées sur le logiciel Leica Confocal Software®. La quantification de l'expression des différentes protéines d'intérêt est réalisée en quatre zone de trois sections différentes de chaque échantillon grâce au logiciel NIH ImageJ®.

1.12.2. Analyse de la production aortique de radicaux superoxydes

La production de radicaux superoxydes est mesurée par la formation de dihydroéthidium. Un segment d'aorte est immédiatement congelé dans le milieu Tissue Teck OCT comme décrit précédemment. Une section non fixée de 10 µm d'épaisseur est incubée pendant une heure à 37°C dans une chambre humide avec une solution de dihydroéthidine à 10 µM dans un tampon phosphate. Les coupes sont contremarqués avec l'Alexa Fluor 488 Phalloïdin (Invitrogen®, dilution 1/100^{ème}) pour délimiter l'artère. Les coupes sont observées avec un microscope confocal Leica TCS SP2 à la longueur d'onde d'excitation de 488 nm et d'émission de 580 et 520 nm respectivement pour la dihydroéthidine et la phalloïdine. La quantification de la production de radicaux superoxydes est réalisée grâce au logiciel NIH

ImageJ[®]. L'intensité de fluorescence de la dihydroéthidine est mesurée à l'intérieur de la média de l'artère uniquement et rapportée à la surface.

1.13. Analyse de l'expression protéique hépatique du TNF α : Western Blot

Des fragments de foie toujours congelés sont réduits en poudre dans l'azote liquide puis 200 mg de poudre sont homogénéisés pendant 30 secondes avec un broyeur Ultra-Turrax J25 (Fisher Bioblock) dans un 1 mL de tampon d'homogénéisation (PBS 10 mM, pH 7,8, contenant EDTA (1 mM), sucrose (109 g/L), Hépès (4,76 g/L), Triton X100 (1/1000 v/v), dithiotreitol (156 mg/L)) avec un cocktail d'anti-protéases (1%, Sigma[®]). La concentration protéique de l'homogénat est mesurée par un dosage par la méthode du Biuret. Les échantillons (ajutés à 40 μ g de protéines pour 20 μ L) sont déposés sur un gel d'acrylamide 4%-15% et soumis à migration dans un tampon de migration TRIS base (3 g/L)-Glycine (14,4 g/L)-sodium dodecylsulfate (1 g/L). Les protéines du gel sont transférées électriquement sur une membrane de nitrocellulose avec un tampon de transfert à pH 8,3 composé de Tris bas (3 g/L) – glycine (14,4 g/L) – méthanol (1/4 v/v). Les membranes sont ensuite lavées (TBS 1X avec 1/1000 v/v Tween 20). Le blocage est réalisé avec une solution de lait écrémé (10 g/ 100 mL). Les membranes sont ensuite incubées avec les anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage : anticorps de lapin anti-TNF α α u 1/200^{ème} (Abcam[®]) et anticorps de poulet anti- β actine au 1/500^{ème} (Abcam[®]) sur la nuit à +4°C. Après les étapes de lavage, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort respectivement dirigés contre les immunoglobulines G de lapin (Sigma[®]) au 1/50000^{ème} et de poulet (Abcam[®]) au 1/4000^{ème}. La détection chimiluminescente est réalisée avec le kit ECL (Amersham[®]) et les films Hyperfilm MP (Amersham[®]). Les immunoblots sont scannés et l'intensité des bandes analysés grâce au logiciel NIH ImageJ[®]. Les résultats sont exprimés en unités relatives de densité rapportées à celles de la β actine.

ANNEXE 2 : Le resvératrol induit une augmentation de l'oxydation du NADH mitochondrial dépendant du complexe 1, responsable de l'activation des sirtuines dans les cellules hépatiques.

Le travail qui suit a été réalisé au sein de l'équipe UMR CNRS 6214-INSERM U1083 (Dr Vincent Proccacio). Cette publication a pour objectif l'exploration du mécanisme conduisant à l'activation des sirtuines au niveau hépatique dans le cadre d'un traitement par le resvératrol. Elle a été acceptée le 31 Octobre 2013 dans *Journal of Biochemical Chemistry*.

JBC Papers in Press. Published on October 31, 2013 as Manuscript M113.466490
The latest version is at <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M113.466490>

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

Resveratrol Induces a Mitochondrial Complex I Dependent Increase in NADH Oxidation Responsible for Sirtuin Activation in Liver Cells

Valérie Desquiere-Dumas^{1,2,3*}, Naïg Gueguen^{1,2,3*}, Géraldine Leman^{1,3}, Stéphanie Baron⁴, Valérie Nivet-Antoine⁴, Stéphanie Chupin^{1,2,3}, Arnaud Chevrollier^{1,2,3}, Emilie Vessièrès^{1,3}, Audrey Ayer^{1,3}, Marc Ferré^{1,2,3}, Dominique Bonneau^{1,2,3}, Daniel Henrion^{1,3}, Pascal Reynier^{1,2,3}, Vincent Procaccio^{1,2,3}

* Authors contributing equally to the work

¹ LUNAM Université, Angers, France

² Département de Biochimie et Génétique, Angers, F-49000, France

³ UMR CNRS 6214-INSERM U1083, Angers, F-49000, France

⁴ EA 4466, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, Paris F-75270, France

*Running title: Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

To whom correspondence should be addressed: Vincent Procaccio M.D., Ph.D. Biochemistry and Genetics Laboratory. National Center for Neurodegenerative and Mitochondrial Diseases, CHU Angers. 4 rue Larrey, 49933 Angers, France. Phone 33 2 41 35 78 54. Fax 33 2 41 35 58 83. Email ViProcaccio@chu-angers.fr

Keywords: Resveratrol, mitochondria, complex I, NAD⁺

Background: the mechanism of action of resveratrol on sirtuin and mitochondrial metabolism remains elusive.

Results: resveratrol increases mitochondrial NAD⁺ level by direct stimulation of complex I, leading to a SIRT3-dependent increase in substrate supplies.

Conclusion: our results link the direct stimulation by resveratrol of NADH oxidation to the SIRT3 activation.

Significance: mitochondrial NAD⁺/NADH ratio is a critical parameter mediating resveratrol effect on mitochondrial function.

ABSTRACT

Resveratrol (RSV) has been involved in the regulation of energetic metabolism, generating increasing interest for therapeutic use. SIRT1 is described as the main target of RSV. However, recent reports have challenged the hypothesis of its direct activation by RSV and the signaling pathways remain elusive. Here, the effects of RSV on mitochondrial metabolism were detailed both *in vivo* and *in vitro* using murine and cellular models and isolated enzymes. We demonstrate that low RSV doses (1-5 μ M) directly stimulate NADH

dehydrogenases, and more specifically mitochondrial complex I activity (EC50~1 μ M). In HepG2 cells, this complex I activation increases the mitochondrial NAD⁺/NADH ratio. This higher NAD⁺ level initiates a SIRT3-dependent increase in the mitochondrial substrate supply pathways, i.e. the tricarboxylic acid cycle and fatty acid oxidation. This effect is also seen in liver mitochondria of RSV fed animals (50 mg/kg/day). We conclude that the increase in NADH oxidation by complex I is a crucial event for SIRT3 activation by RSV. Our results open up new perspectives in the understanding of the RSV signaling pathway, and highlight the critical importance of RSV doses used for future clinical trials.

INTRODUCTION

Resveratrol (RSV), a natural polyphenolic antioxidant, possesses a wide range of biological properties, including protective effects on the nervous (1) and cardiovascular systems (2). RSV appears to be a major regulator of energetic metabolism, ameliorating the glucose homeostasis in obese mice (3,4), increasing fatty acid oxidation (FAO) (5) and inducing the expression of genes

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

involved in mitochondrial biogenesis (4). Mitochondria, encompassing catabolic pathways (FAO and tricarboxylic acid cycle, TCA) providers of reduced substrates (NADH and FADH₂) from fatty acids and carbohydrates to the oxidative phosphorylation, appear to be a preferential target of RSV. The effects of high RSV doses (10 to 100 μ M) on mitochondrial metabolism have been investigated in various models and most of the studies have reported an increase in mitochondrial biogenesis through a sirtuin dependent pathway. Sirtuins are a family of NAD-dependent deacetylases among which three isoforms (SIRT3, 4 and 5) are located in the mitochondrial compartment (6). Computational studies have shown that up to 20% of mitochondrial proteins can be acetylated on their lysine residues and are therefore putatively regulated by sirtuins (7). SIRT3, the most extensively studied mitochondrial sirtuin, has been shown to regulate the activity of key enzymes of mitochondrial metabolic pathways such as succinate dehydrogenase (SDH) and isocitrate dehydrogenase (ICDH) (TCA enzymes) and LCAD (FAO) in a nutrient sensitive fashion (8-12). SIRT3 is also involved in the regulation of oxidative phosphorylation through the deacetylation of complex I and succinate dehydrogenase subunits (8,9). The other mitochondrial sirtuins, SIRT4 and SIRT5, may target FAO and urea cycle enzymes. Although not found in the mitochondria, SIRT1 is considered as an important regulator of metabolism, able to activate both mitochondrial biogenesis by transcriptional activation of the PGC1-related signaling pathway (11,13) and the energetic metabolic fluxes by allosteric post-translational modifications of key enzymes. In addition, SIRT1 is reported to be the main target of RSV (10,12). However, the direct interaction between RSV and SIRT1 has been increasingly challenged during the last few years (14-16) and the signaling pathways linking RSV and sirtuin activation remain to be clarified. The hypothesis of indirect activation of sirtuins through the modulation of NAD⁺ concentration is now favored (17,18) and mitochondria concentrate a significant part of the cellular NAD⁺ pool (19). Thus, in this study, the effect of low RSV dose (1-5 μ M) on mitochondrial metabolism and the signaling pathways involved were analyzed by using three different models (*in vitro* study on isolated enzymes, HepG2 cells

treated with RSV, and an ageing model of mice fed with RSV).

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Trans-Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene), triacetyl-Resveratrol (3,5,4'-triacetyl-trans-stilbene) and gallotannin were purchased from Sigma Aldrich (Lyon, France). Compound C (6-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)-phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a]-pyrimidine), SIRT1 inhibitor III (6-Chloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-1-carboxamide, alternatively named EX-527, IC₅₀ = 98 nM, 19.6 and 48.7 μ M for SIRT1, SIRT2 and SIRT3 respectively) was obtained from Merck (Lyon, France). Quality and purity of Trans-resveratrol was checked by spectrum analysis before use.

Cell culture. Human hepatocarcinoma HepG2 cells (ATCC n° HB-8065) were cultured in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM-F12, JBOY Institute of Biotechnology, Reims, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine (PAA, Pasching, Austria) at 37°C, 5% CO₂. The medium was supplemented with either vehicle (ethanol, 1/5000) or RSV (1, 5, or 50 μ M) during 48h. Cellular toxicity assays showed no toxicity or anti-proliferative effect at up to 5 μ M RSV. For knock-down experiments, cells were reverse-transfected with SIRT3 siRNAs or two different scrambled siRNAs (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) by incubation with lipofectamineTM RNAiMAX Transfection Reagent (Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France). 24h after siRNA transfection, the medium was supplemented with either vehicle or RSV (1 μ M) during 48h. The expression of SIRT3 was decreased by 60% (qPCR measurement, Fig 1A) and the corresponding protein level was decreased by 80±9% for SIRT3 siRNA (Fig 1A), while scrambled siRNA had no effect on any SIRT isoform expression.

Animals. Male C57BL/6J strain mice (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) were housed in a room at 24±2°C with a 12h/12h light-dark cycle, with diet and water *ad libitum*. Two groups were used: young (Y) (aged 6 months), and old mice (O) (aged 22 months). Twelve weeks before

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

euthanasia, half of each group received a standard diet (M20 croquettes, (SDS®, Y Ctl and O Ctl groups), and the other half a diet of M20 croquettes supplemented with 0.04% trans-resveratrol (Yvery®, Y RSV and O RSV groups). After 12 weeks of RSV diet, mice were anesthetized with isoflurane, before decapitation and dissection of the liver, in accordance with European Community guidelines (directive 86/609/CEE), and the Ethical committee of University of Paris-Descartes (CEEA34.SB.008.12). RSV accumulation in liver was checked according to Menet et al. (20); the concentration of RSV and its derivatives was 1.29 ± 0.19 and 2.17 ± 0.46 $\mu\text{mol/kg}$ in young and old RSV mice, respectively (undetectable in control groups).

Determination of cellular concentrations of NADH and NAD⁺. NADH and NAD⁺ concentrations were measured using the NAD/NADH assay kit (Abcam, Paris, France) on lysates from 2.10^6 cells filtered under a 10 kDa column according to the manufacturer's instructions. The cytosolic NAD(H)-redox state was determined using the metabolite indicator method, i.e. the lactate dehydrogenase reaction (21,22). Lactate concentration was measured using lactate oxidase reaction (Lactate Assay Kit, Abbott, Rungis, France), and pyruvate concentration using the pyruvate assay kit (DiaSys, Condom, France) according to the manufacturer's instructions.

NAD(P)H autofluorescence imaging. HepG2 cells were grown in two-well glass chambers (Lab-Tek™ Chamber Slide™ System, Nunc, Langenselbold, Germany) for two days and treated with vehicle (ethanol, 1/5000e), RSV (1 μM) or rotenone (10 nM). Before acquisition, the cells were thoroughly washed with medium without phenol red, with or without drugs. NAD(P)H autofluorescence signals were acquired with a Leica microscope (DMI6000B, Microsystems, Nanterre, France, excitation wavelength : 330 nm and emission wavelength 450 nm) equipped with a Roper CoolSnap HQ2 camera (Roper Scientific, Tucson, USA), a high-sensitivity CCD camera for quantitative fluorescence microscopy Metamorph® 7.6 software (Molecular Devices, Saint-Grégoire, France) was used for acquisition

driving (2sec) and image analysis. Measurements were performed at 37°C. For quantitative analysis, 1.10^7 fresh HepG2 cells were resuspended in DMEM-F12 without red phenol and placed in an UV quartz cuvette. Cell autofluorescence was measured on a fluorimeter by exciting the cell suspension at 340 nm and reading the fluorescence at 450 nm according to (23). To measure non-mitochondrial NAD(P)H autofluorescence, 10 μM mCICCP were added to the cuvette (0% autofluorescence). The 100% autofluorescence was obtained by adding 5 μM rotenone + 1 mM KCN to the cell suspension.

Isolation of mitochondria from HepG2 cells.

Mitochondria were isolated from a pellet of 8.10^7 HepG2 cells treated for 48 hours either with vehicle (ethanol, 1/5000e) or RSV (1 μM). Briefly, cells were harvested, washed once with cold PBS, and re-suspended in isolation buffer (100 mM Saccharose, 50 mM KCl, 50 mM Tris/HCl, 5 mM EGTA, pH 7.4). Cells membranes were disrupted using digitonine (10 $\mu\text{g}/10^6$ cells, 10 minutes at 4 °C) and mitochondria were pelleted by centrifugation (10 000g, 10 minutes at 4°C). Mitochondrial pellet was washed twice in isolation buffer and re-suspended in respiration buffer (10 mM KH_2PO_4 , 300 mM Mannitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mg/ml BSA, pH 7.4). Quality of mitochondrial preparation was controlled by oxygraphic analysis, particularly, cytochrome c was added to check membrane integrity, and absence of NAD⁺ leakage during the isolation procedure was checked by NAD⁺ supplementation during maximal, ADP stimulated, respiration.

Isolation of mitochondria from mouse tissues.

Liver and brain mitochondria were isolated as described elsewhere (24,25). The entire operation was performed at 4°C and completed in less than an hour.

Mitochondrial respiration rates.

Oxygen consumption was measured on isolated mitochondria as previously described (24,25) at 37°C on a high-resolution oxygraph (Oroboros, Innsbruck, Austria), using substrates of complexes I, I+III, II, IV, FAO and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) shuttle as described elsewhere (24,25): complex I substrates: 5 mM malate and 2.5 mM pyruvate; complex I and

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

II substrates: 5 mM malate, 2.5 mM pyruvate and 5 mM succinate; complex II substrates: 10 mM succinate supplemented with 10 μ M rotenone; complex IV substrate: 5 mM N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine reduced with 50 mM ascorbate. 40 μ M palmitoyl-L-carnitine + 2.5 mM malate were used to induce liver β -oxidation and 20 mM glycerol-3-phosphate (G3P) to initiate GAPDH shuttle. The active state of respiration (coupled-respiration) was initiated by the addition of a saturating ADP concentration (0.5 mM). Cytochrome c (Cyt c) was added (8 μ M) to check the integrity of outer mitochondrial membranes.

Mitochondrial enzymatic activities. The activities of the mitochondrial OXPHOS complexes (I-IV), TCA and FAO enzymes were measured at 37°C on a UVmc² spectrophotometer (SAFAS, Monaco) as described elsewhere (26-28). Activity of the NADH ubiquinone reductase (complex I), succinate ubiquinone reductase (complex II), ubiquinol cytochrome C reductase (complex III), cytochrome C oxidase (complex IV) and citrate synthase (CS) were measured according to the method described by Medja *et al.* (27). NADH ubiquinone reductase activity was assayed in KH₂PO₄ buffer (50mM, pH 7.5), containing fatty acid-free BSA (3.75 mg/ml), 0.1mM decylubiquinone and 0.10 mM NADH was added to initiate the reaction. Parallel measurement in presence of Rotenone (5 μ M) was used to determine the background rate. NADH dehydrogenase activity of complex I was measured in the same medium using 0.05 mM NADH as substrate, but decylubiquinone was replaced by ferricyanide (1 mM FeKCN) as electron acceptors. For the measurement of succinate deshydrogenase (SDH), the electron acceptor decylubiquinone was replaced by phenazine methosulfate (PMS, 1 mM) and the reduction of 2,6 dichloroindophenol (DCIP, 50 μ M) in the presence of 30 mM succinate, 5 μ g/ml antimycin and 10 μ M rotenone was followed at 600 nm. GAPDH activity was measured in 50 mM KH₂PO₄ buffer, pH 7.5, supplemented with 2.5 mg/ml de BSA, 1 mM PMS and 50 μ M DCIP. Addition of 30 mM glycerol-3-phosphate activated the reaction. The same reaction medium was used for measurement of long-chain fatty acid dehydrogenase (LCAD) activity with palmitoyl-CoA as substrate. Isocitrate deshydrogenase activity was measured by

following the appearance of NADH using 0.8 mM NAD⁺ and NADP⁺ and 10 mM isocitrate as substrates in a mixture containing 2 mM CaCl₂, 0.2 mM EDTA and 10 mM MgCl₂, in 50 mM KH₂PO₄ buffer, pH 7.5 (42). For complex I and LDH activity on HepG2 cells, cell pellets were homogenized in cell buffer (250mM saccharose, 20mM tris, 2mM EGTA, 1mg/ml bovine serum albumin, pH 7.2). The activity of LDH was measured in a reaction mix comprising 100 mM KH₂PO₄, pH 7.1, triton 10X 0.25%; pyruvate 2.5 mM. The reaction was initiated in presence of 0.1 mM NADH and the NADH disappearance was recorded at 340 nm at 37°C. For complex I measurement, cells were further disrupted by one freezing in liquid nitrogen followed by rapid thawing at 37°C. Lysates were then enriched in mitochondria by centrifugation (16000g, 1 min. at 4°C), washed once in cell buffer (250 μ l/10⁶ cells), and sonicated (6 x 5 seconds with a Branson Sonic Power sonicator (SmithKline Company, Danbury, CT) on ice. Complex I (NADH ubiquinone reductase) activity was immediately assayed in KH₂PO₄ buffer (80mM, pH 7.4), containing 1mM KCN, 2mM NaN₃, 0.1mM ubiquinone-1 and 75 μ M of DCPIP. 0.10 mM NADH was added to initiate the reaction. Rotenone (5 μ M) was used to determine the background rate. NADH:FMN dehydrogenase (*EC* 1.5.1.39, *FMN*), Formate:NAD⁺ oxidoreductase (*EC* 1.2.1.2, *FDH*), Lactate Dehydrogenase (*EC* 1.1.1.27, *LDH*), Aldehyde:NAD⁺ oxidoreductase (*EC* 1.1.1.1, *ADH*) and L-glutamate:NAD(P)⁺ oxidoreductase (*EC* 1.4.1.3, *GDH*) (Roche Diagnostics, Meylan, France) activities were measured according manufacturer's instruction. FMN and FDH activities were measured at 30°C, GDH and LDH at 37°C and ADH activity was monitored at 25°C. Initial rate (vi) were determined using true initial tangent of the measured optic densities according with time.

UV-Visible spectroscopy. The UV-vis absorption spectra of RSV and BSA in the presence and absence of enzymes were recorded on a SAFAS UV-mc2 spectrophotometer equipped with 1.0 cm quartz cells with a slit of 2 nm and scan speed of 200 nm.min⁻¹. The absorbance assessments were performed at pH 7.0 in KH₂PO₄ 50 mM buffer, 25°C. Each spectrum is an average of at least two scans.

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

Western Blotting. Mitochondrial proteins (20-50 µg) solubilized in a Laemmli buffer were resolved by 8% or 12.5% SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane as described elsewhere (24) and incubated with primary monoclonal antibodies overnight at 4°C (subunits of respiratory chain: mouse monoclonal antibodies, Mitosciences, Eugene, OR, USA; mitochondrial biogenesis: rabbit monoclonal anti-PGC1α and goat anti-TFAM antibodies, Santa Cruz Biotechnologies; phospho-AMPK/total AMPK: rabbit antibodies against AMPKα1/α2 and phospho-AMPKα, Cell Signaling Technology, MA, USA).

Deacetylation analysis. For immunoprecipitations, 50.10⁶ HepG2 cells were solubilized in Lysis Buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8, 1mM Dithiothreitol, 1% deoxycholate, 0.1% triton 10X, antiproteases (Complete, Roche Diagnostic), 1mM PMSF, 10 mM nicotinamide and 1 mM sodium butyrate). Complex II immunocapture kit and p53 immunocapture kit (MitoSciences) were used to purify complex II and p53 from HepG2 cells according to manufacturer's instructions. The following antibodies were then used for immunoblotting: mouse monoclonal anti-complex II70kDa (Mitosciences), mouse monoclonal anti-p53 (Abcam) and rabbit polyclonal anti-acetyllysine (Abcam) antibodies.

Computational modeling. The structure of trans-RSV and triacetyl-RSV were automatically docked into the NADH:FMNdh enzyme using FlexX software (part of the LeadIT software, Biosolve IT, Germany) in presence of cofactors (NADH and FMN).

Statistical analysis. Statistical comparisons between Ctl and RSV mice were made with the Mann-Whitney *U* test. The Wilcoxon test for paired data was used for the analysis of the effects of inhibitors or drugs. Differences were considered statistically significant at *p*<0.05.

RESULTS

***In vitro*, RSV inhibits NAD⁺ hydrogenases and activates NADH dehydrogenases.** The inhibitory action of 20 µM RSV on a NAD⁺ dependent enzyme, Aldehyde dehydrogenase, has been

previously reported (29). This inhibition of NAD⁺:aldehyde reduction reaction at 5 µM RSV is confirmed by the present results (Fig. 2A). The exact mechanism is currently not precisely known, but is thought to imply the binding of RSV to the enzyme-NADH complex. Thus, we postulated that RSV could directly alter the kinetic parameters of others NAD⁺/NADH-metabolizing enzymes. One of the simplest examples of NAD⁺-dependent dehydrogenation is catalysed by NAD⁺-dependent formate dehydrogenase (FDH). RSV inhibited the NAD⁺-dependent FDH reaction in the 1-5 µM range (Fig. 2A, *V*_{max}=1.187 and 0.740 µmol.min⁻¹.mg of proteins⁻¹ with vehicle and 5 µM RSV, respectively). The addition of RSV slightly increased the activity of Lactate dehydrogenase (LDH) and directly stimulated Glutamate dehydrogenase (GDH) and NADH:FMN dehydrogenase (FMNdh) (Fig 2A). The strongest increase was observed for FMNdh activity. Lineweaver-Burk plots of FMNdh activity according to NADH concentrations (0.05–0.2 mM) indicated that RSV addition altered both the *V*_{max} and the *K*_m of the enzyme for NADH (Fig 2B, left panel). The increase in FMNdh activity was not observed using the triacetyl-RSV derivative (Ac. Fig 2B right panel), which possess acetylated groups instead of the hydroxyl ones and a higher steric hindrance.

It has been previously shown that the biological activity of RSV and its metabolites depends on concurrent, direct binding with its various molecular targets as Quinone Reductase 2, COX-1/2, Aldehyde dehydrogenase, and the mitochondrial F1-ATP synthase among others (30). The loss of potency using triacetyl-RSV, presenting a higher steric hindrance, also suggested a physical interaction of resveratrol with the enzyme. Computational modeling showed that trans-RSV could be located in the core of the FMNdh (Fig 2C₁), whereas the triacetyl-RSV form would preferentially interact with an external site of the enzyme (Fig 2C₂). Moreover, it was proposed that RSV and NAD⁺ substrate mutually co-operate to increase their binding to enzymes (29). UV-Visible measurements of RSV derivatives in the absence or presence of NAD⁺ and FMNdh were realized to estimate the quenching of RSV absorption by the enzyme. The absorption spectrum of trans-RSV in 100% ethanol showed absorption peaks at 317 and 306 nm (Fig. 2D 1-2),

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

in agreement with published results (31). In the presence of NAD⁺, a significant increase in UV absorption was observed for trans-RSV, and the maximum absorbance shifted to 303-306 nm. Addition of the FMNdH resulted in a dose-dependent decrease in this UV absorbance (Fig. 2D₂), from 10 % to 25 % with 1 µg to 20 µg.ml⁻¹ of the enzyme. By contrast, enzyme addition did not change the absorbance of NAD⁺ alone. A decrease in RSV absorption was also observed with Bovine Serum Albumin (Fig 2D₂, insert), known to bind to RSV (32). Only a slight reduction (5 %) was observed upon addition of FMNdH to RSV in absence of NAD⁺ (Fig 2D₁). Addition of pyruvate kinase, which was not identified to bind to RSV by computational analysis, did not modify RSV absorption, either in absence, or in presence, of NAD⁺. Overall, this suggested a direct binding of RSV to the enzyme in the presence of NAD⁺.

Complex I of the mitochondrial respiratory chain is an essential NADH dehydrogenase for cell metabolism. This enzyme is a multimeric structure comprising a flavin mononucleotide (FMN) moiety covalently linked to the complex at the active site for NADH oxidation. The mechanism of the complex I redox reaction comprises NADH oxidation by the flavin (NADH:FeKCN reductase activity, NFR), followed by the transfer of two electrons to bound quinone (NADH:ubiquinone reductase activity, NUR). On isolated, disrupted mitochondria, the addition of 0.05-5 µM RSV both increased NUR and NFR activity in a dose-dependent manner (Fig. 2E1), with an EC₅₀ of 0.94±0.087µM (Fig 2E2). A greater increase was observed for NADH dehydrogenase activity of complex I, (NFR) than for NUR one (Fig 2E1), suggesting that RSV directly modified the kinetic parameters of the dehydrogenase part of complex I. Here again, triacetyl-RSV analog had no effect on enzyme activity (Fig 2E3).

***In situ*, RSV activates NADH dehydrogenase enzymes and mitochondrial NADH oxidation, which increases NAD⁺/NADH ratio.** We next investigated whether RSV modulated NUR activity *in situ* at the active dose determined by *in vitro* study (i.e. roughly 1 µM). In HepG2 cells, the activity of NUR was increased by RSV (+82.4 ± 25.0 % for RSV 1 µM and +171.91 ± 43.1% for

RSV 5 µM compared with vehicle-treated cells, Fig. 3A, left panel). These data indicated that RSV also activated NUR *in situ*. The effect of RSV on cytosolic NADH dehydrogenases was also investigated. The L-lactate dehydrogenase (LDH) plays a central role in cellular metabolism and NADH/NAD⁺ equilibrium. Our results showed that RSV also stimulated LDH activity (+ 20.7 ± 5.1 % for RSV 1 µM and +56.9 ± 10.3 % for RSV 5 µM compared with vehicle-treated cells, Fig. 3A, right panel). However, this activity increased with RSV in a lesser extent than the NUR one (+80 and +20% for NUR and LDH respectively, at 1 µM RSV). In isolated mitochondria, the stimulation of NUR activity was followed by a higher NADH oxidation by complex I (Fig 3B), as shown by the increase in complex I-dependent respiration rates in mitochondria from RSV-treated cells.

An increase in NADH dehydrogenase activities accompanied by a stimulation of NADH oxidation could increase the NAD⁺/NADH ratio *in situ*. To test this hypothesis, the NADH and NAD⁺ levels were first determined on whole cells extracts. Results presented in figure 3C show that RSV significantly increased cellular NAD⁺ concentration by 56%. The total cellular NAD (NAD⁺ and NADH) was not significantly modified by RSV treatment. We then analyzed the NADH redox state by the measurement of NAD(P)H autofluorescence in HepG2 cells (Fig 3D). We observed lesser NAD(P)H autofluorescence (i.e. higher NAD(P)⁺) in RSV-treated cells compared with vehicle (Fig. 3D; left panel). Pretreatment of cells with complex I inhibitor rotenone (10 nM) prevented the decrease in NAD(P)H as evidenced by the similar autofluorescence level in RSV plus rotenone cells compared with vehicle plus rotenone ones. NAD(P)H autofluorescence rose in response to the blockade of the electron transport chain at complex I and IV level using rotenone and KCN, respectively (+50±12% in vehicle treated-cells) and was reduced by fully stimulating oxygen consumption with the uncoupler CCCP (-40±7%, not shown). The NADH redox index was calculated by expressing the basal cellular autofluorescence as a percentage of the fully reduced (respiration inhibition, i.e KCN+rotenone) and fully oxidized (i.e. CCCP) conditions (23). In RSV-treated cells, NAD(P)H autofluorescence was decreased by roughly 30% (p=0.0423) in RSV-

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

treated cells (Fig 3D, right) while the fluorescence signal with rotenone+KCN did not differ between vehicle and RSV-treated cells (not shown). Thus, the NADH redox index was lower in RSV-treated cells compared with vehicle ones, indicating an increase in mitochondrial NAD⁺/NADH ratio. The cytosolic NAD⁺/NADH ratio (calculated from pyruvate/lactate ratio) was also determined in HepG2 cells supernatants. The results presented Fig. 3E show that the cytosolic NAD⁺/NADH ratio was not modified by RSV treatment. Taken together, these results indicate that complex I stimulation by RSV results in an increase in NADH oxidation, mainly in the mitochondrial compartment, responsible for an increase in mitochondrial NAD⁺/NADH ratio.

SIRT3 activity is increased by RSV treatment and is involved in the stimulation of the Krebs cycle enzyme activities but does not stimulate mitochondrial biogenesis.

We next further investigated the signaling pathways involved in RSV effects on mitochondrial metabolism. NAD⁺ is a central co-substrate for the sirtuin deacetylases. Thus, we hypothesized that the increase in mitochondrial NAD⁺ concentration could lead to sirtuin activation. This hypothesis was checked by determining the acetylation status of p53 and SDH, known targets of SIRT1 and SIRT3 respectively. Figure 4A show that the acetylation status of p53 was not significantly modified by RSV treatment (left panel). In contrast, SDHA was hypoacetylated in RSV-treated HepG2 cells (Fig 4A, right panel), a situation that was abolished with the SIRT inhibitor EX-527 pre-incubation. These results supported a SIRT3 activation by RSV treatment in HepG2 cells. Moreover, RSV treatment stimulated SDH (203.73 ± 18.49 for veh and 269.9 ± 14.6 nmol.min.mg of proteins for RSV treated cells) and CS (701.2 ± 57.2 for veh and 872.1 ± 29.0 nmol.min.mg of proteins for RSV treated cells) activities, both targets of the mitochondrial SIRT3 isoform (Fig 4B). In order to control the implication of SIRT3 in these effects, sirtuins were inhibited either by pharmacological inhibitor using a high dose of EX-527 (100 μ M, Fig 4B) or by reducing SIRT3 expression using specific siRNAs (Fig 4C). The inhibition of sirtuins using EX-527 prevented the increase in SDH and CS activities in RSV-treated cells (Fig. 4B), but did not prevent the

increase in NUR activity. Moreover, the specific decrease of SIRT3 expression by siRNA also abrogated the increase in SDH and CS activities induced by RSV (without changing the NUR activity), whereas the enzymatic activity was not modified in scrambled-transfected cells (Fig 4C). Neither the inhibition of SIRT by EX-527 nor the transfection of cells with scrambled siRNA did change the activity of SDH and CS (data not shown). Thus, the mechanism of SDH and CS activation was closely linked to SIRT3 activity whereas the stimulation of NUR activity by RSV was sirtuin-independent.

RSV has been reported to activate the AMPK pathway in combination with SIRT1 or SIRT3, leading to mitochondrial biogenesis. In our model, SIRT3 activation did not lead to a stimulation of AMPK pathway as evidenced by the unchanged phospho-AMPK/total AMPK ratio between vehicle and RSV treated HepG2 cells (Fig 5A). Pre-treatment of cells with compound C (an AMPK inhibitor) did not modify the activity of SDH or CS (data not shown). AMPK inhibition did not prevent the stimulation of NUR, CS or SDH activities by RSV (Fig. 5B), also suggesting that AMPK was not involved in the RSV effects on the mitochondrial respiratory chain. Moreover, RSV specifically targeted mitochondrial complex I since 1 μ M of RSV only increased the activity of complex I (96.6 ± 8.7 for veh vs 155.1 ± 25.1 nmol.min⁻¹.mg of proteins⁻¹ for RSV 1 μ M) but did not significantly modify the activities of complexes III and IV (Fig 5C). Finally, at the dose of 1 μ M used here, RSV did neither increase the quantity of respiratory chain complexes (Fig 5D), nor the mitochondrial yield, nor the expression of proteins involved in mitochondrial biogenesis, i.e the PGC1 α co-activator and the mitochondrial transcription factor TFAM (Fig 5E).

The stimulation of NUR activity induced by RSV increases the mitochondrial NAD⁺ content, a prerequisite for stimulation of SDH and CS activities.

RSV stimulated the activities of succinate dehydrogenase (SDH) and citrate synthase (CS), by activating SIRT3. To test whether the RSV-induced increase in mitochondrial NAD⁺ was involved in these effects, the NAD⁺ pool was experimentally depleted using 100 μ M gallotannin (Fig. 6A). Cell incubation with gallotannin

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

effectively reduced the cellular NAD⁺ concentration (Fig 6A), whereas the cytosolic NAD⁺/NADH ratio was increased (Fig1B) suggesting that gallotanin preferentially depleted the mitochondrial NAD⁺ pool. Figure 6B show that this NAD⁺ depletion prevented the increase in SDH and CS activities induced by RSV, emphasizing the central role of NAD⁺ in SIRT3 dependent effects of RSV. We then aimed at determining if activation of TCA enzymes by mitochondrial NAD⁺ increase could be linked to RSV effect on NUR activity. For this purpose, SDH and CS activities were measured after cell incubation with a low rotenone dose (10 nM), a NUR inhibitor (NUR activity after rotenone treatment was decreased by 49%, $p=0.0464$, while SDH and CS activities were not modified by the rotenone treatment, not shown). Rotenone significantly decreased the cellular NAD⁺ content, and prevented the increase in NAD⁺ concentration induced by RSV (Fig 6C, left panel). In rotenone treated cells, the deacetylation of SDH induced by RSV was no longer observed (Fig 6C, right panel). Rotenone also prevented the RSV-induced stimulation of SDH and CS activities (Fig. 6D). Taken together, these data show that the RSV-induced increase in NAD⁺ production by complex I mediates the stimulation of TCA cycle enzyme activities by SIRT3.

High RSV doses display heterogeneous effects on NADH dehydrogenases and no longer increase mitochondrial enzymatic activities.

Most of the studies looking at the mitochondrial effects of RSV used higher concentrations than in our work (above 10 and up to 100 μ M of RSV(18,33-35)). To investigate if the results described in our model were still present at higher RSV concentration, we tested the effect of 50 μ M on isolated NAD⁺/NADH dependent enzymes activities, on NUR activity and on SDH and CS activities in HepG2 cells. At the higher dose of 50 μ M RSV, we did not see the same results on NAD⁺/NADH dependent enzymes (Fig. 7A) compared to 1 and 5 μ M RSV (Fig. 2A). Indeed, while RSV 50 μ M still inhibited ADH and FDH activities, it did no longer activate LDH, GDH and FMNdh, but even inhibited the two last ones (Fig 7A). Similarly, in HepG2 cells, a higher RSV dose (50 μ M) did no longer significantly increase NUR, SDH or CS activities (Fig 7B). These results

emphasize the importance of the RSV dose used in the study to obtain specific effects on mitochondrial respiratory chain.

RSV also stimulates mitochondrial metabolism in liver mitochondria of an RSV-fed mouse model.

To confirm the results obtained on HepG2 cells, mice were fed during 12 weeks on an RSV-enriched diet (50 mg/kg/day). During aging, the complex I activity and the NAD⁺ content are reduced due to mitochondrial dysfunction and oxidative stress (36). Thus, two groups of mice were studied: young (6 months) and old mice (22 months). The maximal NUR activity (Fig 8A) and respiration rate with complex I substrates (Fig 8B) was about 60% lower in the old mice compared to the young mice ($p<0.05$). First, the impact of RSV on NUR activity in mice was studied at different levels (Fig 8C): on frozen, disrupted mitochondrial membranes following addition of 1 μ M RSV (isolated NUR activity, Cx + RSV), on mitochondria of control mice incubated for 30 minutes with 1 μ M RSV (Mito + RSV) and in mice fed for 12 weeks with a RSV-enriched diet (Mice + RSV, RSV accumulation in liver: 1.29 μ mol/kg). We observed that RSV increased NUR activity on liver mitochondria of RSV fed mice, on isolated mitochondria incubated with RSV, but also directly on disrupted mitochondrial membranes, indicative of a direct effect of the molecule on complex I. This increase in NUR activity can be found both in young (Y) and old (O) RSV fed mice. However, a subsequent increase in complex I-linked respiration (malate and pyruvate as substrates) was only evidenced in old RSV mice (Fig 8D). The activity of the complexes oxidizing FADH₂, namely complex II and complex III, was also increased by RSV (Fig. 9A), in both groups (complex II), or only in the old one (complex III). The RSV diet also stimulated CS, SDH, ICDH (TCA cycle enzymes, Fig 9B), MDH and GAPDH (NADH and FADH₂ shuttles, Fig 9C) and LCAD (FAO, Fig 9D), activities, all key enzymes providing NADH and FADH₂ to the respiratory chain. In general, this increase was much higher in the old animals compared to the young ones (from 17% (CS, *ns*) to 228% higher effect (GAPDH, $p=0.017$) of RSV in old mice than in young ones). Oxygraphic analyses indicated a higher FADH₂ oxidation in RSV-treated groups with respect to the complex II, palmitoyl or G3P -

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

linked respirations (Fig. 9E). Similarly to the *in-vitro* study on HepG2 cells, the stimulation of mitochondrial enzyme activities by RSV was not associated with greater mitochondrial biogenesis. Indeed, western blotting did not increase subunits of respiratory chain or factors responsible for mitochondrial biogenesis, i.e. PGC1 α and TFAM (Fig. 5F).

DISCUSSION

The crucial role played by sirtuins in the regulation of metabolism has been extensively studied over the last decade (37-41). The ability of polyphenols to activate SIRT1, and consequently to stimulate energetic metabolism, has opened up new therapeutic perspectives in various diseases involving energetic disorders (33,37-44). However, numerous reports have challenged the hypothesis of the direct activation of SIRT1 by RSV (14,16). Some of these recent publications describe the crucial role of the cofactor NAD⁺ in sirtuin activation (18,34,35). However, the precise mechanism linking RSV treatment and the increase in the intracellular concentration of NAD⁺ has yet to be elucidated. Mitochondria may sequester up to 70% of the NAD⁺ pool depending on the tissue considered (19) and mitochondrial redox status could therefore appear as a potential sirtuin regulator (44). However, to our knowledge, no study has yet focused on the direct effect of RSV on mitochondrial metabolism. Here, we examine the impact of RSV on mitochondrial metabolism and identify complex I as a novel direct target of RSV. We demonstrate that the activation of NADH dehydrogenases by RSV occurs *in vitro* using purified enzyme, excluding the involvement of sirtuins in this effect. We also show that complex I is a key component modulating the mitochondrial NAD⁺/NADH ratio then triggering SIRT3 activation and finally stimulating TCA enzyme activities. Several studies have presented AMPK as a signaling intermediate between RSV and the activation of SIRT1 (18,33-35,43) and SIRT3 (45). In our study, effects of RSV on mitochondrial metabolism occur in the absence of mitochondrial biogenesis and are AMPK-independent at low dose (1 μ M).

RSV directly activates mitochondrial complex I

Investigation of the interaction between RSV and NAD⁺ metabolic enzymes has demonstrated the competitive inhibitory effect of RSV on NAD⁺ hydrogenases (29). Mitochondria are the site of various enzymatic reactions that generate or consume NAD⁺ (including complex I of the respiratory chain). Our study shows that RSV was responsible for the direct increase of isolated NADH-FMN dehydrogenase activity and of complex I activity in mitochondrial membranes, in HepG2 cells and in the liver mitochondria of RSV-fed mice. The RSV-induced increase in NADH-ferricyanide reductase activity was greater than NADH ubiquinone reductase one, which also points the NADH dehydrogenase part of complex I, which binds the FMN moiety, as the RSV target. In this study, we show that RSV can directly interact with an *in-vitro* model of NADH dehydrogenase containing a FMN moiety at the catalytic center (Fig 2E and F). Further studies would determine if RSV can also directly interact *in vivo* with the complex I of the respiratory chain (a multimeric enzyme), particularly near the FMN cofactor or at the NAD⁺ binding pocket. In our model, the stimulation of complex I activity was followed by NADH oxidation and electron transfer along respiratory chain leading to an increase in respiration rate in HepG2 cells and liver mitochondria of RSV-fed old mice. However, no increase in complex I-linked respiration can be evidenced in the young ones. FMN moiety is presumed to be almost completely reduced during NADH-linked coupled respiration (46), and re-oxidation of the terminal cluster N2 seems to be the rate limiting step of the overall NADH oxidase (47). Here, electron transfer at the quinone site (NUR activity) effectively appears as a limiting factor, thus the combined stimulation of complex I NADH dehydrogenase activity by RSV and limitation of re-oxidation at quinone-binding site would increase the reduced state of FMN (decrease FMN/FMNH₂ turnover). Fully reduced flavin (FMN) was evidenced as a significant source of superoxide (48,49). Further studies should analyze if RSV treatment effectively favor “electron leakage” from complex I.

Stimulation of complex I activity by RSV induces an increase in NAD⁺ level

As evidenced by the cellular NAD⁺ content, RSV treatment induces an increase in

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

NADH oxidation on HepG2 cells. We measured cellular and cytosolic pools and NAD(P)H autofluorescence. In cells, fluorometric measurement of autofluorescence between 420 and 540 nm has been shown to detect mainly the mitochondrial NADH pool (50-53). In HepG2 cells, after 1 μ M of RSV treatment, the NAD(P)H autofluorescence decreases, suggesting an increase in NAD⁺. This is reinforced by the higher concentration in cellular NAD⁺ found in HepG2 cells treated with RSV. A previous study demonstrated that complex I activity regulates cellular NAD⁺/NADH balance (54): a decrease in complex I activity by knocked down of NDUFV1 subunit reduces the NAD⁺/NADH ratio, while a 25-30 % increase in complex activity enhances by 30 % this ratio. In our study, rotenone inhibition of complex I in HepG2 cells indeed induces a decrease in NAD⁺ content; while RSV stimulation of complex I activity by roughly 70%, is paralleled by an increase in mitochondrial NADH oxidation that could trigger the increase in NAD⁺/NADH mitochondrial ratio. Pre-treatment of HepG2 cells with rotenone abrogated the increase in NADH oxidation induced by RSV. All together, these results are consistent with a modulation of NAD⁺/NADH ratio by complex I activity and indicate that the complex I is involved in the increase in mitochondrial NAD⁺ induced by RSV.

RSV stimulates mitochondrial substrate supply through the activation of sirtuins

In the HepG2 cellular model as well as in the liver mitochondria of RSV-fed mice, RSV stimulated the respiratory chain substrate supply pathways (TCA enzymes: SDH and CS activities). These results are in agreement with a recent report indicating increased citrate synthase activity and a higher fatty acid supported respiration rate in the muscle mitochondria of obese men receiving an oral RSV supplementation (42). Interestingly, we identified that the activation of TCA cycle enzymes by RSV depends on sirtuin activity since, in HepG2 cells, preincubation with the EX527, a sirtuin inhibitor, prevented the activation of TCA enzymes. Moreover, a decrease in acetylation of SDH (a target of SIRT3) was observed in RSV treated cells, underlying a stimulation of SIRT3 activity after RSV treatment. By contrast, SIRT1 activity did not appear to be modified after 1 μ M RSV treatment since there was no difference in the

p53 acetylation status between vehicle and RSV treated cells. The increase in NAD⁺ level is involved in the SIRT3-dependent effects on mitochondrial metabolism that we observed with RSV treatment. Indeed, a decrease in NAD⁺ synthesis induced by galloytannin, a potent inhibitor of the nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT1), suppressed the sirtuin-dependent effects of RSV on TCA enzyme activities. In addition, it has recently been shown that increasing the intracellular and mitochondrial NAD⁺ by supplementation with the NAD⁺ precursor, nicotinamide riboside, leads to the activation of both SIRT1 and SIRT3 (44).

The sirtuin activation relies on the increase NADH oxidation by complex I

Our study goes further by identifying the direct activation of complex I by RSV as a key mediator of the RSV-induced increase in NAD⁺ content. We therefore postulate that RSV may activate the sirtuins by increasing mitochondrial NAD⁺ content through the stimulation of complex I activity. This hypothesis is supported by our finding that the pre-treatment of HepG2 cells by rotenone, a complex I inhibitor, prevents the RSV-induced increase in both the NAD⁺ level and the TCA enzyme activities and abrogates the SDH deacetylation. It has been suggested that the control of the NAD⁺/NADH ratio by complex I is at the center of the oxidative process that occurs during aging (55). During this process, mitochondrial dysfunction, responsible for a reduction of complex I activity associated with oxidative stress, leads to a reduction in NAD⁺ content (36). The action of RSV on complex I activity should therefore help to maintain a high NAD⁺/NADH ratio, thereby increasing sirtuin activity. Indeed, in the liver mitochondria of old mice, the effects of RSV on the enzymatic activity of TCA and FAO are more pronounced than in the young ones.

The effects of RSV are dose-dependent

The concentration of RSV seems to be a crucial parameter responsible for its metabolic effects. Indeed, whereas most studies focusing on the mitochondrial effects of RSV essentially report an increase in mitochondrial biogenesis, our study with RSV at low doses mainly indicates a functional increase in energetic metabolism

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

without AMPK involvement. In our work, the effects of RSV on NUR and TCA enzymes were already seen after 4 hours of exposure, a finding that does not support the hypothesis of the activation of mitochondrial biogenesis by RSV. Most of the other studies used moderate to high doses of RSV (ranging from 10 to 100 μ M) and although the activation of the same key proteins, i.e. AMPK and SIRT1, was described (4,33,56-58), the signaling pathways leading to these events seem to differ according to the concentration of RSV used. In our study, contrary to the low concentrations of RSV (1-5 μ M), higher dose (50 μ M) did not induce the activities of NUR, SDH or CS anymore. Moreover, Price et al show that at high RSV dose (50 μ M), AMPK activation was no longer coupled to the induction of SIRT1 and that

this concentration led to a sharp reduction in mitochondrial oxidative metabolism (17).

In conclusion, our study further characterizes the effects of RSV on mitochondrial bioenergetics and proposes an original pathway linking RSV, sirtuin activation and mitochondrial respiratory chain. This hypothesis is summed up on the figure 10. Our work demonstrates that the mitochondrial NAD⁺/NADH ratio is a critical factor of sirtuin activation and depends on complex I activity. Thus, the modulation of the NAD⁺/NADH ratio appears to be a promising target in the prevention and treatment of metabolic diseases. Furthermore, the concentration of RSV could be a critical parameter and should therefore be taken into account in future clinical trials.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Marcia Haigis and Kanaya Malkani for their critical reading and comments on the manuscript and to MC Menet for high performance liquid chromatography analysis of resveratrol. We also gratefully thank Corinne Boudier and Eric Surget for their technical assistance during NAD⁺/NADH measurements. This work was supported by grants from the following research institutions : "Région Pays de la Loire", "Agence Nationale de la Recherche", "Fondation pour la Recherche Médicale", "Union Nationale des Aveugles et Déficients Visuels", "Retina France", "Ouvrir les Yeux", and "Association contre les Maladies Mitochondriales".

REFERENCES

1. Richard, T., Pawlus, A. D., Iglesias, M. L., Pedrot, E., Waffo-Teguo, P., Merillon, J. M., and Monti, J. P. (2001) Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives *Ann N Y Acad Sci* 1215, 103-108
2. Petrovski, G., Gurusamy, N., and Das, D. K. (2011) Resveratrol in cardiovascular health and disease *Ann N Y Acad Sci* 1215, 22-33
3. Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P. J., Poosala, S., Becker, K. G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., Lakatta, E. G., Le Couteur, D., Shaw, R. J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D. K., de Cabo, R., and Sinclair, D. A. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet *Nature* 444, 337-342
4. Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α *Cell* 127, 1109-1122
5. Mercader, J., Palou, A., and Bonet, M. L. (2010) Resveratrol enhances fatty acid oxidation capacity and reduces resistin and Retinol-Binding Protein 4 expression in white adipocytes *J Nutr Biochem* 22, 828-834

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

6. Li, X., and Kazgan, N. (2011) Mammalian sirtuins and energy metabolism *Int J Biol Sci* 7, 575-587
7. Kim, S. C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., Grishin, N. V., White, M., Yang, X. J., and Zhao, Y. (2006) Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey *Mol Cell* 23, 607-618
8. Ahn, B. H., Kim, H. S., Song, S., Lee, I. H., Liu, J., Vassilopoulos, A., Deng, C. X., and Finkel, T. (2008) A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14447-14452
9. Cimen, H., Han, M. J., Yang, Y., Tong, Q., Koc, H., and Koc, E. C. (2010) Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria *Biochemistry* 49, 304-311
10. Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L. L., Scherer, B., and Sinclair, D. A. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan *Nature* 425, 191-196
11. Csiszar, A., Labinskyy, N., Pinto, J. T., Ballabh, P., Zhang, H., Losonczy, G., Pearson, K., de Cabo, R., Pacher, P., Zhang, C., and Ungvari, Z. (2009) Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H13-20
12. Bastin, J., Lopes-Costa, A., and Djouadi, F. (2011) Exposure to resveratrol triggers pharmacological correction of fatty acid utilization in human fatty acid oxidation-deficient fibroblasts *Hum Mol Genet* 20, 2048-2057
13. Kitada, M., Kume, S., Imaizumi, N., and Koya, D. (2011) Resveratrol improves oxidative stress and protects against diabetic nephropathy through normalization of Mn-SOD dysfunction in AMPK/SIRT1-independent pathway *Diabetes* 60, 634-643
14. Beher, D., Wu, J., Cumine, S., Kim, K. W., Lu, S. C., Atangan, L., and Wang, M. (2009) Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity *Chem Biol Drug Des* 74, 619-624
15. Kaerberlein, M., McDonagh, T., Heltweg, B., Hixon, J., Westman, E. A., Caldwell, S. D., Napper, A., Curtis, R., DiStefano, P. S., Fields, S., Bedalov, A., and Kennedy, B. K. (2005) Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol *J Biol Chem* 280, 17038-17045
16. Pacholec, M., Bleasdale, J. E., Chrunk, B., Cunningham, D., Flynn, D., Garofalo, R. S., Griffith, D., Grifför, M., Loulakis, P., Pabst, B., Qiu, X., Stockman, B., Thanabal, V., Varghese, A., Ward, J., Withka, J., and Ahn, K. (2010) SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1 *J Biol Chem* 285, 8340-8351
17. Price, N. L., Gomes, A. P., Ling, A. J., Duarte, F. V., Martin-Montalvo, A., North, B. J., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, J. S., Hubbard, B. P., Varela, A. T., Davis, J. G., Varamini, B., Hafner, A., Moaddel, R., Rolo, A. P., Coppari, R., Palmeira, C. M., de Cabo, R., Baur, J. A., and Sinclair, D. A. (2012) SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function *Cell Metab* 15, 675-690
18. Park, S. J., Ahmad, F., Philp, A., Baar, K., Williams, T., Luo, H., Ke, H., Rehmann, H., Taussig, R., Brown, A. L., Kim, M. K., Beaven, M. A., Burgin, A. B., Manganiello, V., and Chung, J. H. (2012) Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases *Cell* 148, 421-433
19. Di Lisa, F., and Ziegler, M. (2001) Pathophysiological relevance of mitochondria in NAD(+) metabolism *FEBS Lett* 492, 4-8
20. Menet, M. C., Cottart, C. H., Taghi, M., Nivet-Antoine, V., Dargere, D., Vibert, F., Laprevote, O., and Beaudeau, J. L. (2013) Ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight analysis for the identification and the determination of resveratrol and its metabolites in mouse plasma *Anal Chim Acta* 761, 128-136
21. Williamson, D. H., Lund, P., and Krebs, H. A. (1967) The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver *Biochem J* 103, 514-527
22. Sun, F., Dai, C., Xie, J., and Hu, X. (2012) Biochemical issues in estimation of cytosolic free NAD/NADH ratio *PLoS One* 7, e34525

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

23. Duchen, M. R., and Biscoe, T. J. (1992) Mitochondrial function in type I cells isolated from rabbit arterial chemoreceptors *J Physiol* 450, 13-31
24. Guillet, V., Gueguen, N., Cartoni, R., Chevrollier, A., Desquiere, V., Angebault, C., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., Martinou, J. C., and Reynier, P. (2011) Bioenergetic defect associated with mKATP channel opening in a mouse model carrying a mitofusin 2 mutation *Faseb J* 25, 1618-1627
25. Flamment, M., Gueguen, N., Wetterwald, C., Simard, G., Malthiery, Y., and Ducluzeau, P. H. (2009) Effects of the cannabinoid CB1 antagonist rimonabant on hepatic mitochondrial function in rats fed a high-fat diet *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E1162-1170
26. Goncalves, S., Paupe, V., Dassa, E. P., Briere, J. J., Favier, J., Gimenez-Roqueplo, A. P., Benit, P., and Rustin, P. (2010) Rapid determination of tricarboxylic acid cycle enzyme activities in biological samples *BMC Biochem* 11, 5
27. Medja, F., Allouche, S., Frachon, P., Jardel, C., Malgat, M., Mousson de Camaret, B., Slama, A., Lunardi, J., Mazat, J. P., and Lombes, A. (2009) Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis *Mitochondrion* 9, 331-339
28. Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J. M., and Munnich, A. (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies *Clin Chim Acta* 228, 35-51
29. Kitson, T. M., Kitson, K. E., and Moore, S. A. (2001) Interaction of sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase with quercetin, resveratrol and diethylstilbestrol *Chem Biol Interact* 130-132, 57-69
30. Calamini, B., Ratia, K., Malkowski, M. G., Cuendet, M., Pezzuto, J. M., Santarsiero, B. D., and Mesecar, A. D. (2010) Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites *Biochem J* 429, 273-282
31. Lopez-Nicolas, J. M., and Garcia-Carmona, F. (2008) Aggregation state and pKa values of (E)-resveratrol as determined by fluorescence spectroscopy and UV-visible absorption *J Agric Food Chem* 56, 7600-7605
32. Jiang, Y. G., Peng, T., Luo, Y., Li, M. C., and Lin, Y. H. (2008) Resveratrol reestablishes spermatogenesis after testicular injury in rats caused by 2, 5-hexanedione *Chin Med J (Engl)* 121, 1204-1209
33. Canto, C., and Auwerx, J. (2009) PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure *Curr Opin Lipidol* 20, 98-105
34. Canto, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity *Nature* 458, 1056-1060
35. Canto, C., and Auwerx, J. (2012) Targeting Sirtuin 1 to Improve Metabolism: All You Need Is NAD+? *Pharmacol Rev*
36. Braid, N., Guillemin, G. J., Mansour, H., Chan-Ling, T., Poljak, A., and Grant, R. (2011) Age related changes in NAD+ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats *PLoS One* 6, e19194
37. Bao, J., and Sack, M. N. (2010) Protein deacetylation by sirtuins: delineating a post-translational regulatory program responsive to nutrient and redox stressors *Cell Mol Life Sci* 67, 3073-3087
38. Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J. T., Bare, O., Lerin, C., Kim, S. H., Mostoslavsky, R., Alt, F. W., Wu, Z., and Puigserver, P. (2007) Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha *Embo J* 26, 1913-1923
39. Rodgers, J. T., and Puigserver, P. (2007) Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1 *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12861-12866
40. Schenk, S., McCurdy, C. E., Philp, A., Chen, M. Z., Holliday, M. J., Bandyopadhyay, G. K., Osborn, O., Baar, K., and Olefsky, J. M. (2011) Sirt1 enhances skeletal muscle insulin sensitivity in mice during caloric restriction *J Clin Invest* 121, 4281-4288

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

41. Ungvari, Z., Sonntag, W. E., de Cabo, R., Baur, J. A., and Csiszar, A. (2011) Mitochondrial protection by resveratrol *Exerc Sport Sci Rev* 39, 128-132
42. Timmers, S., Konings, E., Bilet, L., Houtkooper, R. H., van de Weijer, T., Goossens, G. H., Hoeks, J., van der Krieken, S., Ryu, D., Kersten, S., Moonen-Kornips, E., Hesselink, M. K., Kunz, I., Schrauwen-Hinderling, V. B., Blaak, E. E., Auwerx, J., and Schrauwen, P. (2011) Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans *Cell Metab* 14, 612-622
43. Canto, C., and Auwerx, J. (2012) Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD(+)? *Pharmacol Rev* 64, 166-187
44. Canto, C., Houtkooper, R. H., Pirinen, E., Youn, D. Y., Oosterveer, M. H., Cen, Y., Fernandez-Marcos, P. J., Yamamoto, H., Andreux, P. A., Cettour-Rose, P., Gademann, K., Rinsch, C., Schoonjans, K., Sauve, A. A., and Auwerx, J. (2012) The NAD(+) Precursor Nicotinamide Riboside Enhances Oxidative Metabolism and Protects against High-Fat Diet-Induced Obesity *Cell Metab* 15, 838-847
45. Palacios, O. M., Carmona, J. J., Michan, S., Chen, K. Y., Manabe, Y., Ward, J. L., 3rd, Goodyear, L. J., and Tong, Q. (2009) Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle *Aging (Albany NY)* 1, 771-783
46. Krishnamoorthy, G., and Hinkle, P. C. (1988) Studies on the electron transfer pathway, topography of iron-sulfur centers, and site of coupling in NADH-Q oxidoreductase *J Biol Chem* 263, 17566-17575
47. Vinogradov, A. D. (2008) NADH/NAD⁺ interaction with NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) *Biochim Biophys Acta* 1777, 729-734
48. Kudin, A. P., Malinska, D., and Kunz, W. S. (2008) Sites of generation of reactive oxygen species in homogenates of brain tissue determined with the use of respiratory substrates and inhibitors *Biochim Biophys Acta* 1777, 689-695
49. Galkin, A., and Brandt, U. (2005) Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica* *J Biol Chem* 280, 30129-30135
50. Mayevsky, A., and Rogatsky, G. G. (2007) Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C615-640
51. Eng, J., Lynch, R. M., and Balaban, R. S. (1989) Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes *Biophys J* 55, 621-630
52. Minezaki, K. K., Suleiman, M. S., and Chapman, R. A. (1994) Changes in mitochondrial function induced in isolated guinea-pig ventricular myocytes by calcium overload *J Physiol* 476, 459-471
53. Duchon, M. R., and Biscoe, T. J. (1992) Relative mitochondrial membrane potential and [Ca²⁺]_i in type I cells isolated from the rabbit carotid body *J Physiol* 450, 33-61
54. Santidrian, A. F., Matsuno-Yagi, A., Ritland, M., Seo, B. B., LeBoeuf, S. E., Gay, L. J., Yagi, T., and Felding-Habermann, B. (2013) Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression *J Clin Invest* 123, 1068-1081
55. Stefanatos, R., and Sanz, A. (2011) Mitochondrial complex I: A central regulator of the aging process *Cell Cycle* 10, 1528-1532
56. Dasgupta, B., and Milbrandt, J. (2007) Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7217-7222
57. Hou, X., Xu, S., Maitland-Toolan, K. A., Sato, K., Jiang, B., Ido, Y., Lan, F., Walsh, K., Wierzbicki, M., Verbeuren, T. J., Cohen, R. A., and Zang, M. (2008) SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase *J Biol Chem* 283, 20015-20026
58. Um, J. H., Park, S. J., Kang, H., Yang, S., Foretz, M., McBurney, M. W., Kim, M. K., Viollet, B., and Chung, J. H. (2010) AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol *Diabetes* 59, 554-563

FIGURE LEGENDS

*Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I***FIGURE 1: Study of the involvement of NAD⁺/NADH ratio in mitochondrial effects of RSV.**

(A) Control of SIRT3 knock down by siRNA. SIRT3 knock down was determined at mRNA level by qPCR (ratio SIRT3/Actin calculated with the $-\Delta\Delta C_t$ method for these two genes with similar amplification efficiency) and at protein level by Western blot (SIRT3/HSP60 ratio). Results are expressed as a percentage of Scrambled transfected cells and are represented as the mean $\pm$ SEM of six experiments. The asterisk (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) compared with scrambled-transfected cells.

(B) Effect of gallotannin vs RSV on the NAD⁺/NADH cytosolic ratio. The cytosolic NAD⁺/NADH ratio was calculated as the ratio of pyruvate/lactate concentrations measured in the HepG2 cell culture medium after 48 hours of incubation with vehicle (Veh, ethanol 1/5000), RSV (RSV 1 μ M), or gallotannin (Gallo, 1 mM). Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of eight experiments.

FIGURE 2: RSV *in vitro* inhibits NAD⁺ hydrogenases and activates NADH dehydrogenases.

(A) Effect of RSV on activity of isolated NAD⁺:Aldehyde dehydrogenase (ADH), NAD⁺:formate hydrogenase (FDH), NADH:Lactate Dehydrogenase (LDH), NADH:Glutamate Hydrogenase (GDH) and NADH:FMN dehydrogenase (FMN). Activities of NAD⁺/NADH dependent enzymes were measured at 30°C for FMN and FDH, at 37°C for GDH and LDH and at 25°C for ADH on purified enzymes incubated with vehicle (Ethanol 1/5000) or RSV at 1 or 5 μ M. Results are expressed as percentage of vehicle activity. Absolute values were 199 ± 5.69 , 1.18 ± 0.06 , 260 ± 15 , 2.97 ± 0.53 and 0.31 ± 0.02 μ mol.min⁻¹.mg of proteins⁻¹ for ADH, FDH, LDH GDH and FMNdH, respectively. Data are represented as the mean $\pm$ SEM (n=5). The asterisk (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle.

(B) Detailed effects of RSV on isolated NADH:FMN dehydrogenase (FMNdH) activity. FMNdH activity was monitored on purified enzyme after the addition of vehicle (Veh, ethanol 1/1000), or RSV. Left panel, Lineweaver-Burk plot showing the effect of RSV on enzymatic activity in presence of different NADH, H⁺ (50, 100 or 200 μ M) and RSV (0 and 5 μ M) concentrations. V_{max} are expressed in nmol.min⁻¹.mg of proteins⁻¹ and K_m in mM of NADH. Right panel, effect of RSV on enzymatic activity in the presence of different RSV analogs (Trans-RSV or TriAcetyl-RSV, 0, 1 or 5 μ M). Results shown are representative of n=4 independent preparations.

(C): *In silico* prediction of the binding of Trans-RSV (C1) or Triacetyl-RSV (C2) to the FMNdH in the presence of NAD⁺ using FlexX software.

(D) UV-Vis adsorption spectra of RSV. (D1) Adsorption spectra of Trans-RSV and TriAcetyl-RSV in the absence or presence of NAD⁺, FMNdH or Pyruvate Kinase (5 μ g.ml⁻¹); (D2) Adsorption spectra of trans-RSV in the absence or presence of NAD⁺ and various concentrations of FMNdH (1, 2, 5, 10, 20 μ g.ml⁻¹) or in the absence or presence of various concentrations of BSA (Upper insert: 50, 250, 375, 500, 750 μ g.ml⁻¹).

(E) Effect of RSV on complex I activity. (E1) NADH Ubiquinone Reductase (NUR, rotenone sensitive) and NADH ferricyanide reductase (NFR) activities of complex I were measured on preparation of isolated, disrupted liver mitochondria after incubation with increasing RSV concentrations (0.05-5 μ M, left Panel). Absolute values for NUR and NFR activities were 193 ± 30 and 573 ± 81 nmol.min⁻¹.mg of proteins⁻¹, respectively, for vehicle condition and 384 ± 19 and 3540 ± 791 nmol.min⁻¹.mg of proteins⁻¹, respectively for RSV 5 μ M. (E2) Dose-response plot normalized to the maximal stimulation of NFR activity for EC₅₀ determination. (E3) Effect of either Trans-RSV or TriAcetyl-RSV (0, 1 or 5 μ M) on NUR activity. Data are represented as the mean $\pm$ SEM (n=5). The asterisk (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle.

FIGURE 3: RSV stimulates NADH dehydrogenase activities in HepG2 cells and increases mitochondrial NAD⁺ content.

(A) Effect of different RSV doses on two NADH dehydrogenases (NUR and LDH) activities on HepG2 cells. HepG2 cells were incubated during 48 hours with vehicle (Veh, ethanol 1/5000) or RSV (1 or 5 μ M). Maximal activities of NADH ubiquinone reductase (NUR) and lactate dehydrogenase (LDH) were measured on cell extracts. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM (n=4). The asterisk (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle treated cells.

(B) Effect of RSV on NADH oxidation in isolated mitochondria. Respiration rates were measured on isolated mitochondria of RSV (48 hours, 1 μ M) or vehicle (Veh, ethanol 1/5000) treated HepG2 cells. MP: respiration rate with complex

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

I substrates, i.e. 5mM malate + 2.5mM pyruvate; NAD⁺ addition of 0.5mM NAD⁺; cyt c addition of 8 μ M cytochrome c; MPS: complexes I and II substrates, i.e. malate, pyruvate and 10mM succinate; SR: addition of 5 μ M rotenone. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM (n=6). The asterisk (*) indicates significant differences (p<0.05) compared with vehicle treated cells. **(C) Effect of RSV treatment on cellular NADH and NAD⁺ levels in HepG2 cells.** The cellular free NADH and NAD⁺ levels were determined on HepG2 cells incubated during 48 hours with vehicle (Veh, ethanol 1/5000) or RSV (1 μ M). Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of eight experiments. **(D) Effect of RSV treatment on NADH autofluorescence on HepG2 cells.** (Left panel) NADH autofluorescence was measured by fluorescent microscopy on HepG2 cells incubated with vehicle (Veh, ethanol 1/5000) or RSV (1 μ M, 4 hours). In positive control, Rotenone (10 nM) was added 15 minutes before RSV treatment. Data are shown as a representative picture of n=3. (Right panel) NADH redox index measured in vehicle and RSV-treated cells by recording the NADH auto-fluorescence in basal condition, following addition of an uncoupler (CCCP, 10 μ M) and respiration inhibitors (KCN, 1 mM and rotenone, 5 μ M) in both vehicle and RSV-treated cells. The NADH redox index is then calculated by expressing the basal autofluorescence as a ratio of this range and as the mean $\pm$ SEM of five experiments. The asterisk (*) indicates significant differences (p<0.05) compared with vehicle treated cells. **(E) Effect of RSV on cytosolic NAD⁺/NADH ratio.** The cytosolic NAD⁺/NADH ratio was calculated as the ratio of pyruvate/lactate concentrations measured in culture medium of vehicle (Veh, ethanol 1/5000) or RSV (RSV 1 μ M, 48 hours) treated cells. The asterisk (*) indicates significant differences (p<0.05) compared with vehicle treated cells.

FIGURE 4: SIRT3 is involved in the effects of RSV on SDH, CS but not NUR activities.

(A) Effect of RSV on acetylation status of sirtein target proteins. (Left panel) p53 was immunoprecipitated from HepG2 cells incubated with RSV (48 hours, 1 μ M). (Right panel) SDH was immuno-precipitated from HepG2 cells incubated with RSV (48 hours, 1 μ M) and/or with EX-527 (100 μ M). The graph represent the mean of the acetyl-lysine/SDH protein ratio of n=11 experiments. The asterisk (*) indicates significant differences (p<0.05) compared with vehicle treated cells. **(B) Effect of sirtein inhibition on RSV-induced stimulation of SDH, CS and NUR activities.** HepG2 cells were incubated with EX-527 (100 μ M) or without (vehicle: DMSO, 1/1000) before addition of RSV 1 μ M or vehicle (Veh, ethanol, 1/5000). Enzymatic activities of SDH, CS and NUR were measured. Results are expressed as a percentage of vehicle-treated cells and are represented as the mean $\pm$ SEM (n=4). The asterisk (*) indicates significant differences (p<0.05) compared with vehicle treated cells. **(C) Effect of SIRT3 knock down on RSV-induced stimulation of SDH, CS and NUR activities.** HepG2 cells were transfected with scrambled or SIRT3 siRNAs and incubated with vehicle (Ethanol, 1/5000) or RSV (1 μ M) for 48 hours. Data are represented as the mean $\pm$ SEM of n=9 for SDH and CS measurement and n=6 for NUR. The asterisk (*) indicates significant differences (p<0.05) compared with vehicle treated cells.

FIGURE 5: RSV treatment does activate mitochondrial biogenesis pathways neither in HepG2 cells (1 μ M, 48h) nor in mice liver (50 mg.kg.day)

(A) Western blot quantification phospho AMPK/total AMPK ratio in HepG2 cells treated for 48h with RSV (1 μ M). Blot on left represents a representative blot of eight experiments. **(B) Effect of AMPK inhibition on RSV-induced activation of NUR, SDH and CS activities.** HepG2 cells were first treated with vehicle (ethanol, 1/5000) or compound C (10 μ M), an inhibitor of AMPK activity, and then incubated with 1 μ M RSV or vehicle (Veh, ethanol, 1/5000). Enzymatic activities of NADH ubiquinone reductase (NUR), succinate dehydrogenase (SDH) and citrate synthase (CS) were then measured on cell lysates. Results are expressed as a percentage of vehicle-matched treated cells, and as the mean $\pm$ SEM of four experiments. The dotted line placed at 100% represents the vehicle value. **(C), (D), (E): Mitochondrial biogenesis in HepG2 cells treated during 48 hours with RSV (1 μ M).** (C) Maximal activity of the complexes I, II, III, and IV (n=8 $\pm$ SEM) on HepG2 cells after RSV treatment. Data are represented as the mean $\pm$ SEM of four experiments. Results are expressed as a percentage of vehicle-treated cells and are represented as the mean $\pm$ SEM (n=4). The actual values of complex activities are precised above the corresponding graph bar and are expressed in nmol.min⁻¹.mg proteins⁻¹. The asterisk

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

(*) indicates significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle-treated cells. (D) Western blot analysis of one subunit for each mitochondrial respiratory chain complex after 48 hours of RSV treatment: NDUF8 (complex I), SDHB (complex II), COX2 (complex IV), V α (Complex V). Representative blots of four experiments. (E) Left panel: mitochondrial extraction yield in HepG2 cells treated for 48 h with RSV (1 μ M). The results presented are the ratio of mitochondrial versus cellular protein amount. Data are represented as the mean $\pm$ SEM of four experiments. Right panel: Western blot analysis of one PGC1 α and Tfam expression after 48 hours of RSV treatment. Representative blots of four experiments. **(F) Mitochondrial biogenesis in liver mitochondria of controls and RSV-treated mice.** (Left panel) Mitochondrial protein amount was determined in young (Y) and old (O) mice fed on control (Ctl) and RSV-enriched (RSV) diet and expressed as a quantity of mitochondrial proteins (quantity) and normalized to the tissue weight (yield). $n = 6$ for each group, data are represented as mean $\pm$ SEM. (Right panel) The protein expression of respiratory chain complex subunits was evaluated by western blotting using antibodies directed against one subunit of each complex. Nuclear co-activator (PGC1 α), nuclear transcription factor NRF1 or mitochondrial transcription factor (TFAM) protein expression were assessed by western blot analysis. Loading was controlled by detection of VDAC (mitochondrial fraction, M) and tubulin (cytoplasmic fraction, C) proteins. Representative blot of four experiments.

FIGURE 6: The mitochondrial NAD⁺ increase induced by RSV is responsible for SDH and CS activation.

(A) Effect of gallotannin pretreatment on RSV-induced increase in the cellular level of NAD⁺. cellular NADH and NAD⁺ levels were determined on HepG2 cells treated for 4h with vehicle (Veh, ethanol 1/5000), RSV (1 μ M) or gallotannin (Gallo, 1 mM). Results are expressed as a percentage of vehicle-treated cells and are represented as the mean $\pm$ SEM of eight experiments. The actual values are precised above the corresponding graph bar and are expressed in pmol.mg proteins⁻¹. The asterisk (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle treated cells. **(B) Effect of NAD⁺ increase on SDH and CS activities.** HepG2 cells were incubated with RSV (1 μ M) or gallotannin + RSV (Gallo 1 mM, RSV 1 μ M). Enzymatic activities of SDH and CS were measured. Results are expressed as a percentage of vehicle treated cells and are represented as the mean $\pm$ SEM of four experiments. **(C) Effect of Rotenone pretreatment on RSV-induced increase in cellular NAD⁺ level and SDH acetylation status.** (left panel) NAD⁺ content was determined in HepG2 cells preincubated with rotenone (10 nM) before RSV (1 μ M) or vehicle (Veh, ethanol 1/5000) treatment. Data are represented as mean $\pm$ SEM of four experiments and expressed as percentage of RSV-treated cells. The actual values of NAD⁺ content are precised on the top of the corresponding graph bar and are expressed in pmol.mg proteins⁻¹. The asterisk (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle and # indicates significant differences ($p < 0.05$) between vehicle and rotenone-treated cells. (right panel) SDH was immunoprecipitated from HepG2 cells incubated with RSV (48 hours, 1 μ M) and/or with rotenone (10 nM). The graph represent the mean of the acetyl-lysine/SDH protein ratio of $n = 6$ experiments. The asterisk (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle treated cells. **(D) Effect of modulation of NAD⁺ concentration on SDH and CS activities.** Enzymatic activities of SDH and CS were measured on HepG2 cells preincubated with rotenone (Rot, 10 nM) or compared to Vehicle (V) before RSV treatment (1 μ M). Results are expressed as a percentage of vehicle-treated cells and are represented as the mean $\pm$ SEM of four experiments. The asterisk (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle.

FIGURE 7: High RSV dose (50 μ M) inhibits dehydrogenase activities and does not increase the TCA cycle enzymatic activities. (A) Effect of high RSV dose on activity of isolated dehydrogenases: NAD⁺:Aldehyde dehydrogenase (ADH), NAD⁺:formate hydrogenase (FDH), NADH:Lactate Dehydrogenase (LDH), NADH:Glutamate Hydrogenase (GDH) and NADH:FMN dehydrogenase (FMN). Actual values of enzyme activities measured at 30°C for FMN and FDH, at 37°C for GDH and LDH and at 25°C for ADH are indicated on the top of the corresponding bar graph (data are expressed in μ mol.min⁻¹.mg of proteins⁻¹) **(B) Effect of high RSV dose on TCA enzymatic activities.** Enzymatic activities of

Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

NUR, SDH, and CS measured on HepG2 cells (RSV 5 or 50 μ M, 48 hours). Results are expressed as a percentage of vehicle-treated cells and are represented as the mean $\pm$ SEM ($n=4$). The asterisk (*) indicates significant differences ($p<0.05$) compared with vehicle.

FIGURE 8: RSV induces an increase in complex I activity in liver.

(A) Complex I activity and substrate oxidation by complex I measured on isolated liver mitochondria of Young vs Old mice. Left panel: Enzymatic activities of complex I (NUR). Right panel: oxygraphic measurement of maximal, phosphorylating, complex I-linked respiration using malate and pyruvate (+ADP) as substrates. The (+) indicates significant differences ($p<0.05$) compared with old mice. **(B) Effect of RSV on complex I properties of mice liver mitochondria.** (B1) Effect of RSV on NUR activity on control mitochondria. Ctr: isolated liver mitochondria of control young mice, Cx + RSV: activity of complex I measured on preparation of isolated, disrupted liver mitochondria after 1 μ M RSV addition, Mito+RSV: activity of complex I measured on isolated intact mitochondria incubated (30 minutes) with 1 μ M RSV and Mice + RSV: activity of complex I measured on isolated mitochondria from young mice with RSV diet (1.3 μ mol/kg in liver). (B2) Effect of RSV diet on complex I properties in liver mitochondria of young and old mice. Left panel: NUR activity, Right panel: oxygraphic measurement of maximal, phosphorylating, complex I-linked respiration using malate and pyruvate (+ADP) as substrates.

FIGURE 9: RSV induces an increase in the substrate supply in liver.

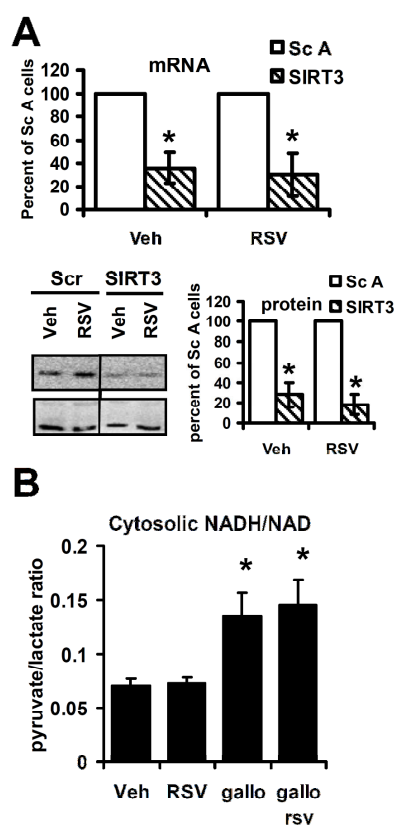
(A) Maximal activities of respiratory chain complexes in controls and RSV fed mice. Activity of complexes II (succinate ubiquinone reductase), III (ubiquinol cytochrome c reductase) and IV (cytochrome c oxidase) were measured on liver mitochondria of control (Ctl) and RSV-fed (RSV) young and old mice. **(B) Maximal activities of enzymes involved in respiratory chain substrate supply pathways.** Activity of Krebs cycle (SDH, CS and ICDH), enzymes were measured on liver mitochondria of control (Ctl) and RSV-fed (RSV) mice. **(C) Maximal activities of enzymes involved in GAPDH shuttle.** Activities of malate dehydrogenase (MDH) and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were measured on liver mitochondria of control (Ctl) and RSV-fed (RSV) mice. **(D) Maximal activities of enzyme involved in fatty acid oxidation.** Long chain acylCoA dehydrogenase (LCAD) activity was measured on liver mitochondria of control (Ctl) and RSV-fed (RSV) mice. **(E) Maximal coupled respiration in liver mitochondria.** Coupled respiration measured on isolated liver mitochondria using complexes I, II or III or FAO substrates. White bars represent control diet mice (Y) and grey bars represent RSV fed groups, shadings are used for old mice. Data are represented as the mean $\pm$ SEM of five animals for each group. The (+) indicates significant differences ($p<0.05$) compared with old mice and the (*) indicates significant differences ($p<0.05$) compared with control diet.

FIGURE 10: Recapitulative scheme of the suggested resveratrol signalling pathway on mitochondrial metabolism.

Resveratrol (RSV) directly stimulates complex I activity (1), thus turning on the mitochondrial NAD⁺/NADH balance toward increasing NAD⁺ concentration (2). This favors sirtuin activation (3), which finally enhances substrate supply to respiratory chain by both tricarboxylic cycle and fatty acid oxidation (4). This increase in substrate supplies to the respiratory chain leads to an increase in respiration rates (5) after Resveratrol treatment.

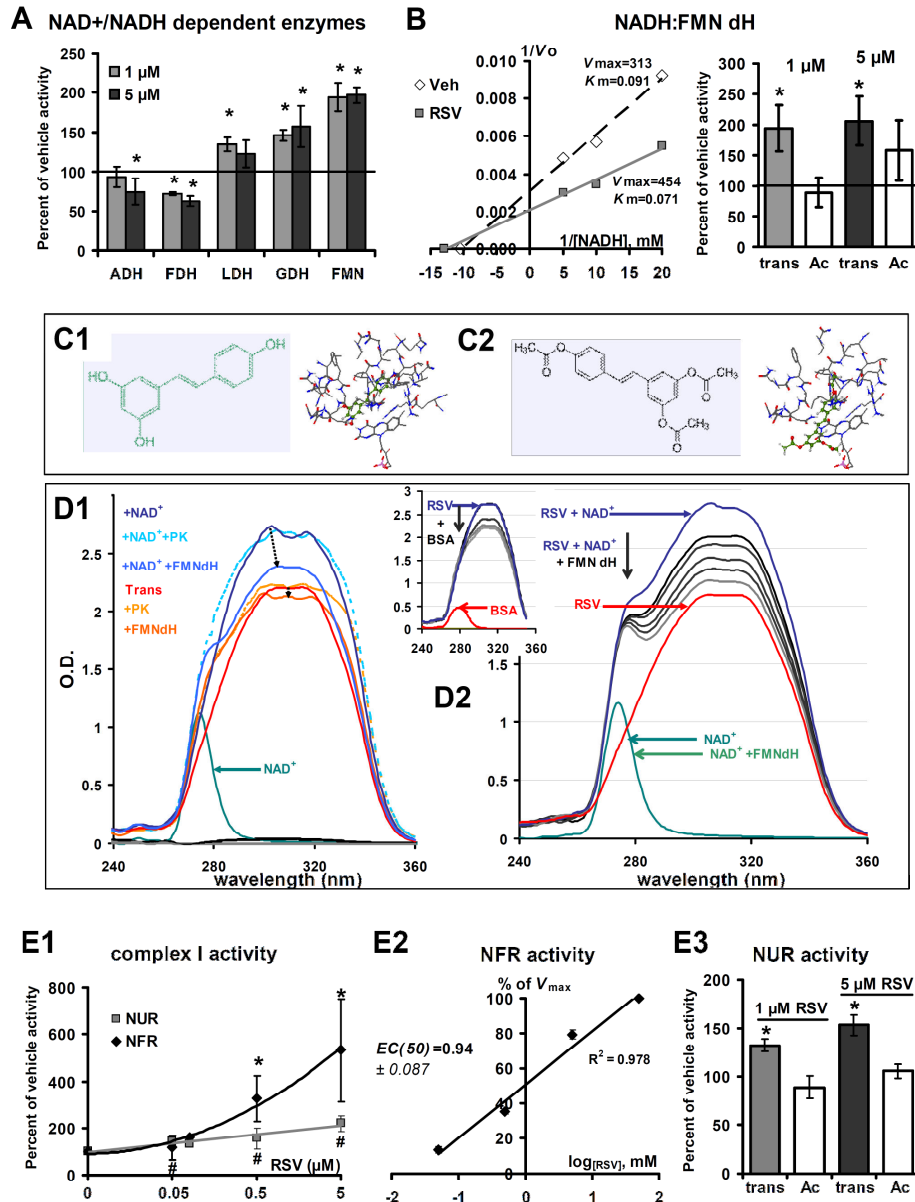
Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

FIGURE 1



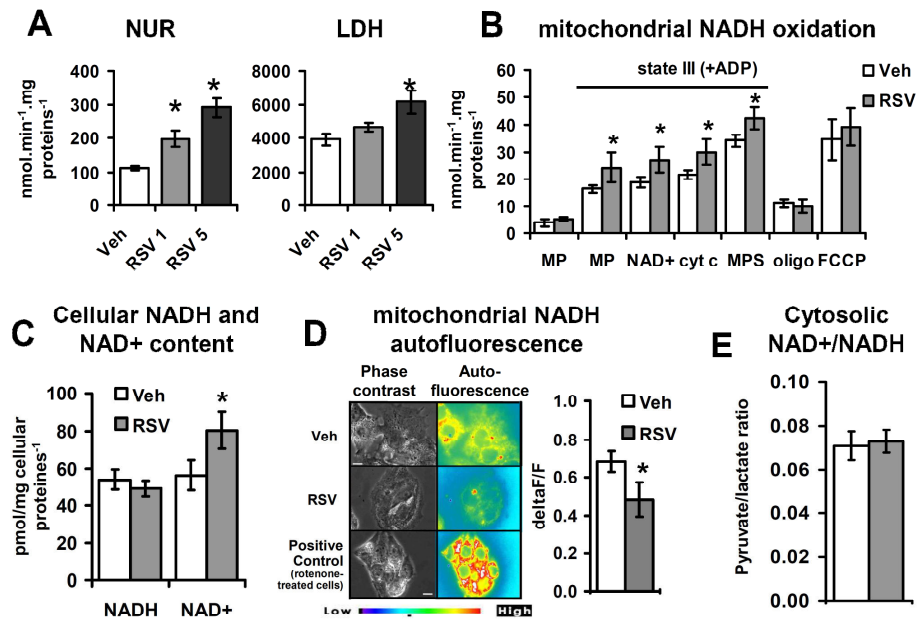
Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

FIGURE 2



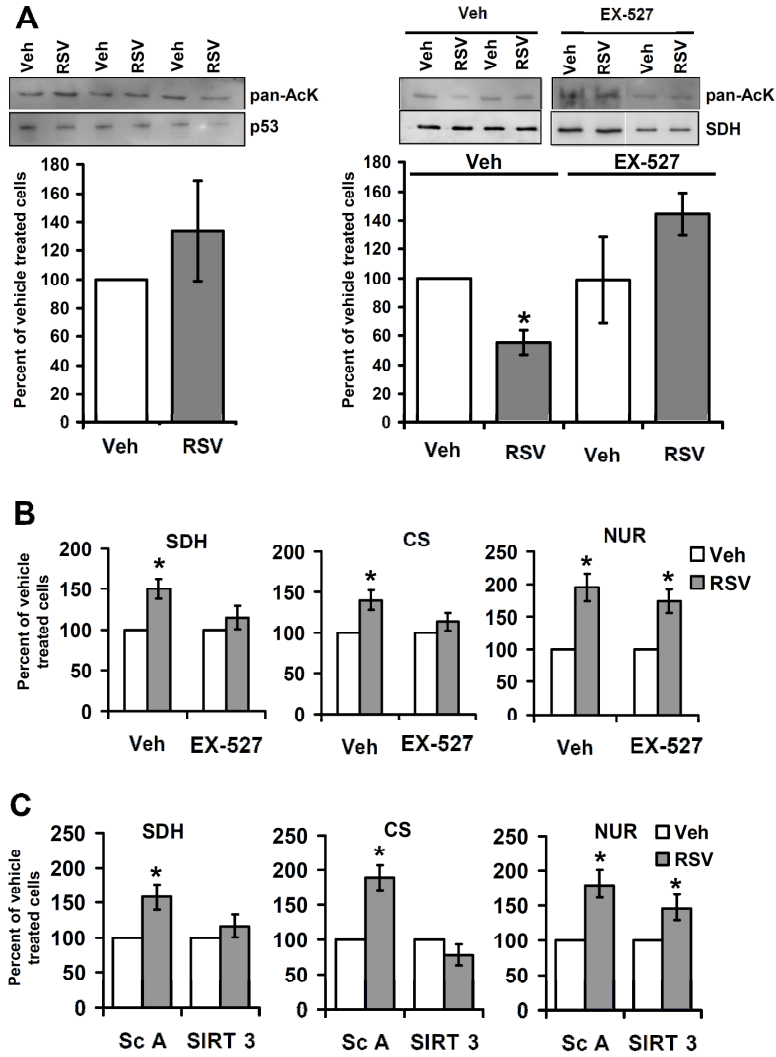
Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

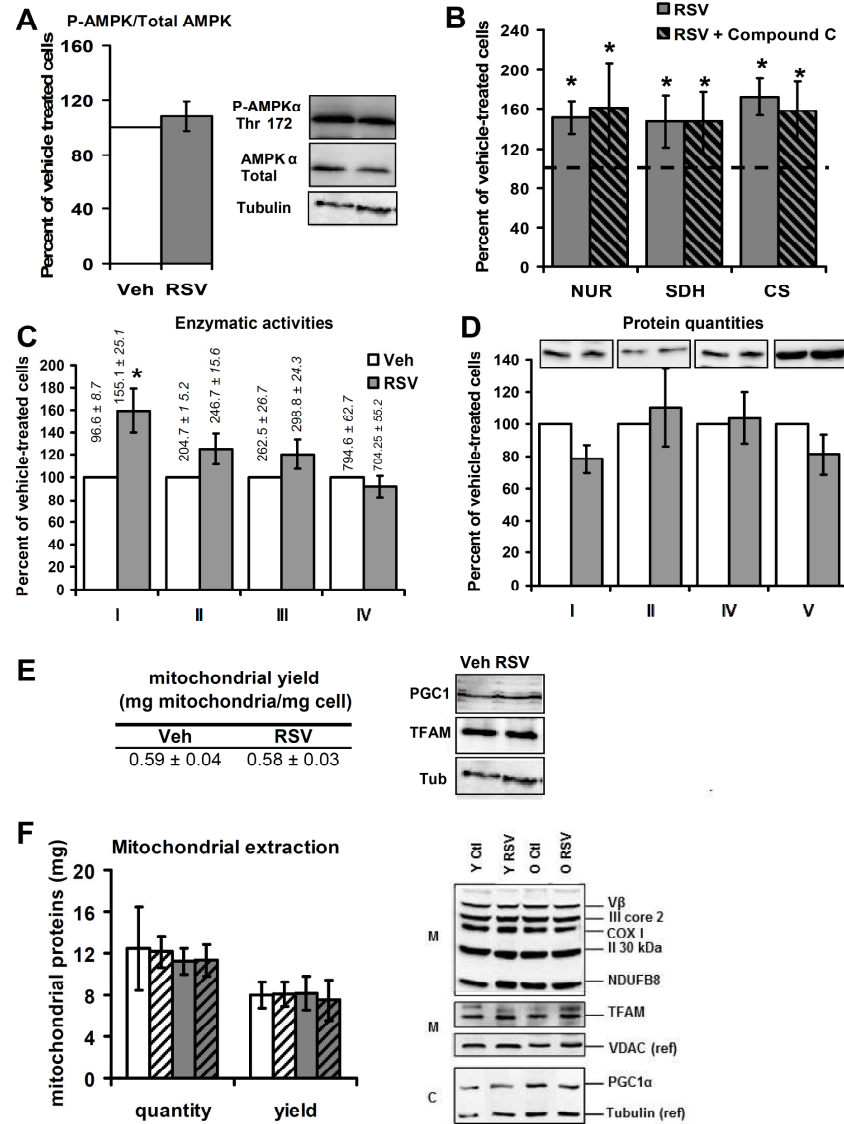
FIGURE 3

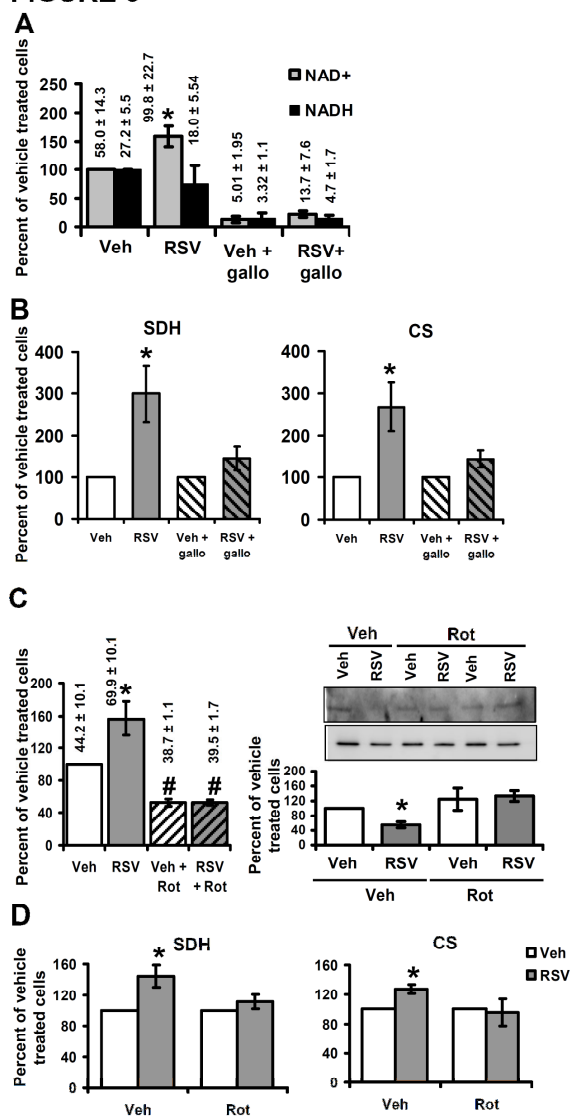


Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

FIGURE 4

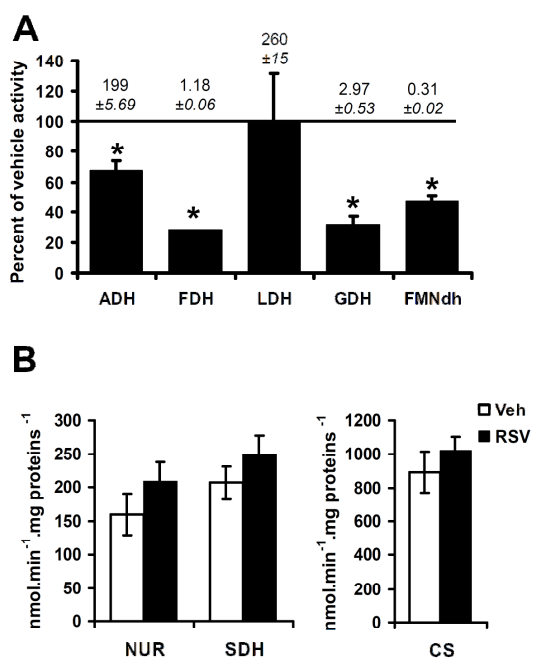


Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I
FIGURE 5


Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I
FIGURE 6


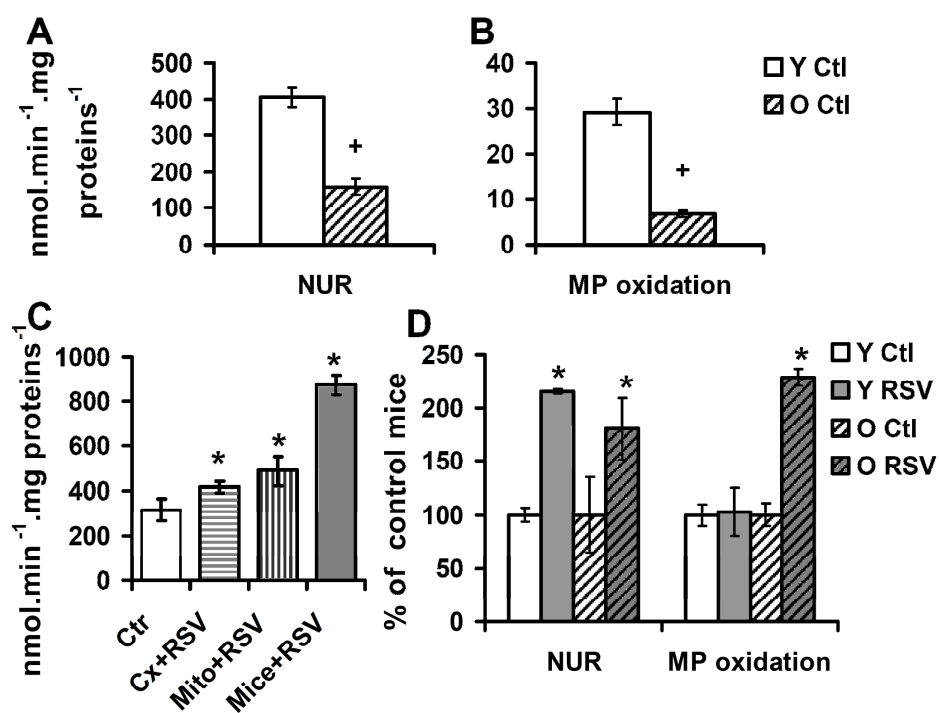
Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

FIGURE 7



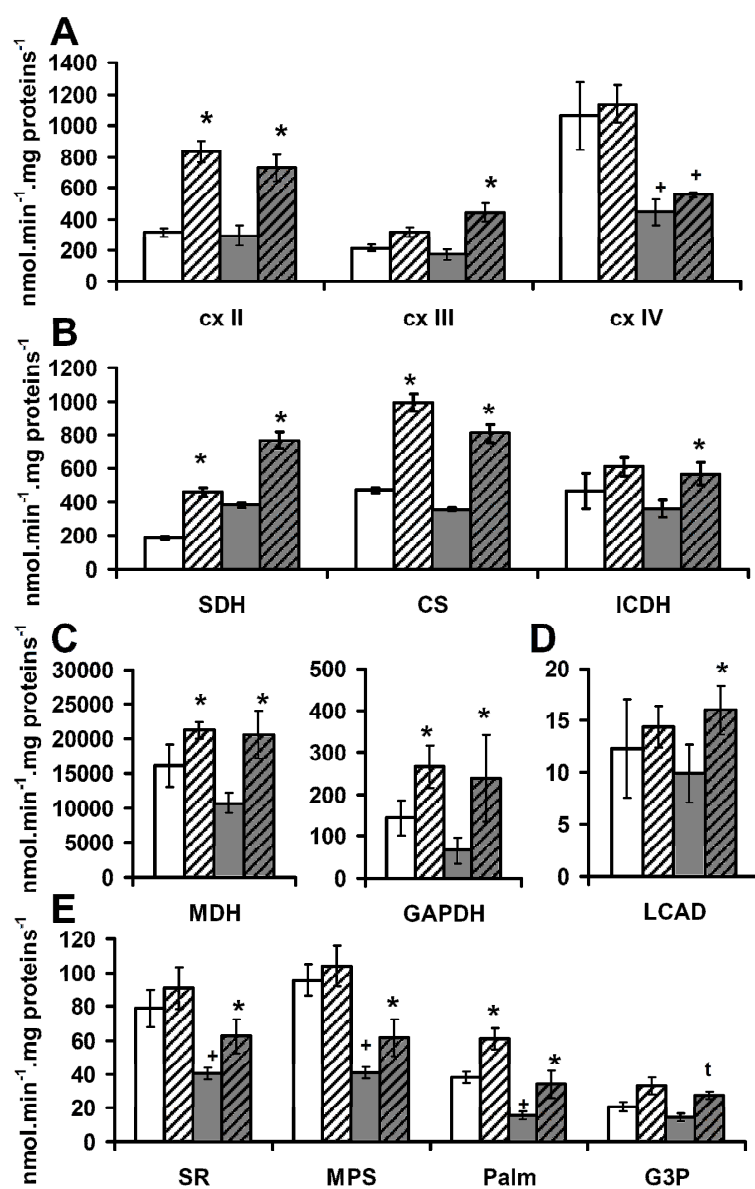
Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

FIGURE 8



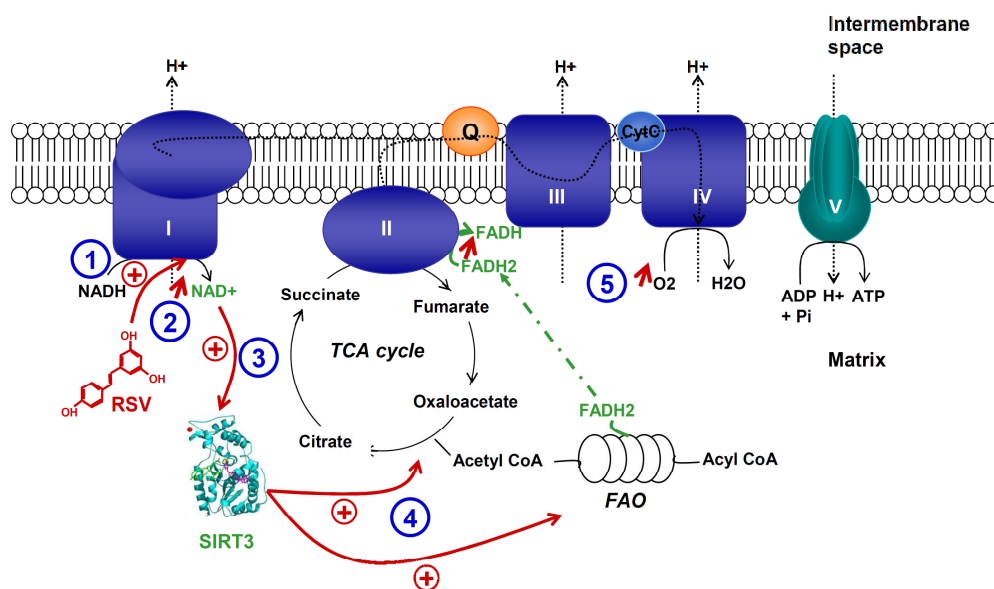
Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

FIGURE 9



Resveratrol directly stimulates NADH oxidation by complex I

FIGURE 10



Résumé :

Le vieillissement de la population est le résultat de l'amélioration de la prise en charge des individus, en particulier des sujets âgés, conduisant à l'apparition d'une nouvelle catégorie démographique, le quatrième âge avec les plus de 75 ans. Cette population polypathologique présente de nombreuses spécificités, avec entre autres, une intolérance au glucose, un état de dénutrition et une altération des fonctions cardiovasculaires, les maladies cardiovasculaires restant la première cause de mortalité dans cette tranche d'âge. Comme évoqué dès les années 50 par Harman, le stress oxydant pourrait jouer un rôle important dans l'ensemble de ces comorbidités. Le resvératrol, un polyphénol anti-oxydant connu pour ses bienfaits cardiovasculaires pourrait ainsi être une molécule d'intérêt dans ce contexte.

Nos objectifs dans ce travail ont donc été d'évaluer les effets d'un traitement chronique par le resvératrol accompagné ou non d'une prise en charge nutritionnelle chez la souris très âgée. Ces effets du resvératrol ont été étudiés aussi bien sur le plan métabolique que sur le phénotype cardiovasculaire. Nos résultats montrent qu'un régime riche en protéines et pauvre en glucides a des effets variables en fonction de l'âge. Sans effet sur la souris jeune, il devient délétère chez la souris adulte et très âgée avec une majoration de l'altération de l'homéostasie glucidique associée à une détérioration du bilan lipidique. Ces dysrégulations métaboliques ont pour conséquence une dégradation accrue des fonctions artérielles et cardiaques. Chez la souris très âgée, un traitement par le resvératrol amplifie les dommages liés à ce régime en accentuant les altérations métaboliques et cardiovasculaires, soulignant, et ce pour la première fois, de potentiels effets délétères du resvératrol dans le cadre du vieillissement. En revanche, chez la souris âgée dénutrie en l'absence de prise en charge nutritionnelle, le resvératrol présente des effets bénéfiques avec une amélioration de l'insulino-sensibilité et des fonctions artérielles, associée à une modification d'expression de TXNIP, protéine à l'interface de la régulation de l'homéostasie du glucose et de la balance oxydative, faisant d'elle une piste à explorer tant pour expliquer certains mécanismes impliqués dans le vieillissement que dans les effets du resvératrol.

Mots clés : vieillissement cardiovasculaire, resvératrol, insulino-résistance, régime riche en protéines – pauvre en glucides

Title : Insulin resistance and cardiovascular aging: could a chronic treatment with resveratrol improve them ?

Abstract:

The aging of the population is the result of the improvement of the care of individuals, especially the elderly, leading to the emergence of a new demographic category, the « fourth age » with people more than 75 years old. This polypathological population has many specificities, with among other things, glucose intolerance, a state of malnutrition and impaired cardiovascular function. Cardiovascular disease remains the leading cause of death in this age group. As mentioned in the 50s by Harman, oxidative stress may play an important role in all of these diseases. Resveratrol, an antioxidant polyphenol known for its properties on cardiovascular events could thus be a molecule of interest in this context. Our objectives in this study were therefore to assess the effects of chronic treatment with resveratrol with or without a nutritional care in the very old mice. These metabolic and cardiovascular effects of resveratrol have been studied. Our results show that a high protein and low carbohydrate diet has different effects depending on age. Despite no effect have been observed on young mice, this diet becomes deleterious in adult and very old mice with an increase of impaired glucose homeostasis associated with a deterioration of the lipid profile. These metabolic dysregulations result in a further deterioration of arterial and cardiac function. In the very old mice, treatment with resveratrol boosts the damage related to this plan by increasing the metabolic and cardiovascular alterations, highlighting, for the first time, potential deleterious effects of resveratrol in aging. However, in elderly malnourished mice in the absence of nutritional care, resveratrol has beneficial effects with improved insulin sensitivity and arterial functions associated with altered expression of TXNIP, protein regulating glucose homeostasis and oxidative balance, making it worth exploring as to explain some of the mechanisms involved in aging and in the effects of resveratrol.

Keywords : cardiovascular aging, elderly, resveratrol, insulin resistance, high protein – low carbohydrate diet