

**UNIVERSITE LOUIS PASTEUR – STRASBOURG I**

**Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé**

Pharmacologie et Physico-chimie des Interactions Cellulaires et Moléculaires

UMR CNRS 7034 – Faculté de Pharmacie

**THESE**

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Louis Pasteur

Discipline : Sciences Pharmaceutiques

Spécialité : Physiologie /Pharmacologie

**Par Mamadou SARR**

**« MODULATION DE LA BIODISPONIBILITE DU MONOXYDE D'AZOTE (NO) EN PHYSIOPATHOLOGIE VASCULAIRE : INTERET DES STOCKS MOBILISABLES DE NO ET DES ANTIOXYDANTS NATURELS »**

Présentée et soutenue publiquement le 29 Novembre 2004

**Membres du jury**

Professeur **Valérie B. Schini-Kerth**, Strasbourg

Directeur de thèse

Professeur **Bernard Muller**, Bordeaux

Co-Directeur de thèse

Docteur **François Piquard**, Strasbourg

Rapporteur Interne

Docteur **Vincent Richard**, Rouen

Rapporteur Externe

Professeur **Alexander Mülsch**, Mainz

Rapporteur Externe

Professeur **Jean Claude Stoclet**, Strasbourg

Examinateur

## SOMMAIRE

<u>AVANT-PROPOS</u> .....	4
<u>REMERCIEMENTS</u> .....	5
<u>LISTES DES PUBLICATIONS</u> .....	8
<u>LISTES DES ABRÉVIATIONS ET PRINCIPAUX SYMBOLES</u> .....	11
<u>LISTES DES FIGURES</u> .....	13
<u>INTRODUCTION GÉNÉRALE</u> .....	14
<u>CHAPITRE 1 : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</u> .....	18
<u>1<sup>ÈRE</sup> PARTIE : RÔLE DU NO ENDOTHELIAL DANS LE CONTRÔLE DE L'HOMÉOSTASIE VASCULAIRE</u> ..	19
<u>I.1. STRUCTURE ET FONCTIONS DE LA PAROI VASCULAIRE</u> .....	19
<u>I.2. DONNÉES GÉNÉRALES SUR LES FACTEURS VASOACTIFS DÉRIVÉS DE L'ENDOTHÉLIUM</u> .....	21
<u>I.3. LE MONOXYDE D'AZOTE</u> .....	24
<u>I.3.1. BIOSYNTHÈSE PAR LES NO-SYNTHASES</u> .....	24
<u>I.3.1.1. ISOFORMES DE NOS</u> .....	26
<u>I.3.1.2. RÉGULATION DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVITÉ DE LA NOS ENDOTHÉLIALE</u> .....	27
<u>I.3.1.3. INHIBITEURS DE NO SYNTHASES</u> .....	28
<u>I.3.2. RÔLE PHYSIOLOGIQUE DU NO D'ORIGINE ENDOTHÉLIALE</u> .....	29
<u>I.3.3. MÉCANISMES DES EFFETS DU NO</u> .....	30
<u>2<sup>ÈME</sup> PARTIE : DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE</u> .....	34
<u>II.1. DONNÉES GÉNÉRALES</u> .....	34
<u>II.2. ESPÈCES RÉACTIVES DÉRIVÉES DE L'OXYGÈNE</u> .....	35
<u>II.2.1. Nature et localisation des espèces réactives dérivées de l'oxygène</u> .....	35
<u>II.2.2. Rôle de la NADPH oxydase comme source d'anions superoxydes</u> .....	38
<u>II.2.3. Rôle des NO synthases comme source d'anions superoxydes</u> .....	39
<u>II.3. RÔLE DU STRESS OXYDANT DANS LA DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE : EXEMPLE DE L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE SYSTÉMIQUE</u> .....	41
<u>II.3.1. Modèles expérimentaux d'hypertension artérielle systémique</u> .....	41
<u>II.3.2. Stress oxydant et hypertension artérielle systémique</u> .....	43
<u>3<sup>ÈME</sup> PARTIE : APPROCHES PHARMACOLOGIQUES POUR AUGMENTER LA BIODISPONIBILITÉ EN NO</u> .....	46

<b><u>III.1. SUPPLÉMENTATION EN NO</u></b> .....	<b>47</b>
<u>III.1.1. Les donneurs de NO</u> .....	47
<u>III.1.2. Formation de stocks mobilisables de NO</u> .....	61
<b><u>III.2. LES ANTIOXYDANTS NATURELS ET LES COMPOSÉS POLYPHÉNOLIQUES DU VIN ROUGE</u></b> .....	<b>64</b>
<u>III.2.1. Effets des antioxydants sur le système cardiovasculaire</u> .....	64
<u>III.2.2. Les polyphénols du vin rouge</u> .....	66
<b><u>CHAPITRE 2 : OBJECTIFS ET CONDUITE DU TRAVAIL</u></b> .....	<b>72</b>
<b><u>I. OBJECTIFS</u></b> .....	<b>73</b>
<b><u>II. APPROCHES EXPERIMENTALES</u></b> .....	<b>74</b>
<b><u>CHAPITRE 3 : RESULTATS EXPERIMENTAUX</u></b> .....	<b>77</b>
<b><u>MÉMOIRE 1</u></b> .....	<b>78</b>
<b><u>MÉMOIRE 2</u></b> .....	<b>92</b>
<b><u>MÉMOIRE 3</u></b> .....	<b>115</b>
<b><u>AUTRES PUBLICATIONS NON PRÉSENTÉES DANS CETTE THESE</u></b> .....	<b>142</b>
<b><u>CHAPITRE 4 : DISCUSSION</u></b> .....	<b>143</b>
<b><u>I. MODÈLES EXPÉRIMENTAUX</u></b> .....	<b>144</b>
<u>I.1. MODÈLE DE TOLÉRANCE INDUITE PAR EXPOSITION PROLONGÉE IN VITRO À LA TRINITRINE (MÉMOIRE 1)</u> .....	144
<u>I.2. MODÈLE DE DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE INDUITE PAR LE TRAITEMENT CHRONIQUE IN VIVO À L'ANGIOTENSINE II (MÉMOIRES 2 ET 3)</u> .....	149
<b><u>II. CONSTITUTION DE STOCKS MOBILISABLES DE NO PAR LE S-NITROSOGLUTATHION</u></b> .....	<b>153</b>
<u>II.1. AORTES DE RATS DÉPOURVUES D'ENDOTHÉLIUM, TOLÉRANTES À LA TRINITRINE (MÉMOIRE 1)</u> .....	153
<u>II.2. AORTES DE RATS POURVUES D'ENDOTHÉLIUM (MÉMOIRE 2)</u> .....	156
<u>II.3. AORTES DE RATS PRÉSENTANT UNE DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE (MÉMOIRE 2)</u> .....	157
<b><u>III. EFFETS PROTECTEURS DES POLYPHÉNOLS DU VIN</u></b> .....	<b>159</b>
<b><u>CHAPITRE 5 : CONCLUSION GÉNÉRALE - PERSPECTIVES</u></b> .....	<b>164</b>
<b><u>REFERENCES</u></b> .....	<b>168</b>

# **Avant-propos**

# **Remerciements**

---

## **A mes Maîtres et Juges**

### **- Le Professeur Valérie Schini-Kerth**

Vous avez su nous transmettre avec beaucoup de patience, de générosité et d'indulgence, toute la passion de la recherche qui vous habite. Votre simplicité et votre modestie sont à la dimension de votre envergure scientifique. Vous êtes pour nous un modèle à suivre. Que tout le bien que vous faites autour de vous soit équitablement rendu ainsi qu'à votre famille. Nous tenons à vous exprimer toute notre gratitude et notre reconnaissance sera sans bornes.

### **- Le Professeur Bernard Muller**

Le plus grand héritage que vous avez su nous transmettre est votre intégrité scientifique. Avec vous, nous avons pu perfectionner notre sens analytique. Vos conseils nous ont permis d'être plus attentif, plus critique. Merci aussi pour toute la sagesse dont vous savez su faire preuve et qui, nous l'espérons, saura être contagieuse. Toute notre reconnaissance.

### **- Le Professeur Jean Claude Stoclet**

Le seul fait de vous avoir rencontré et connu était déjà pour nous un immense privilège. Vous nous avez toujours orienté mais surtout nous aiguillé au cours de notre formation à divers moments et à chaque sollicitation de notre part. Pour nous, votre bureau a toujours été ouvert. Vos qualités morales, intellectuelles et surtout votre intérêt pour la Science forcent le respect et l'admiration. Nous pourrons affirmer sans risque de nous tromper, que, quelque part, c'est grâce à vous que tout cela a été possible. Toute notre reconnaissance.

### **- Les Professeurs Alexander Mulsch, Vincent Richard et François Piquard**

La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail malgré vos nombreuses occupations nous a profondément touché. Vos qualités scientifiques et votre intérêt pour la Recherche sont pour nous une source de motivation supplémentaire pour la suite de notre formation. Recevez ici, toute notre gratitude et toute notre reconnaissance.

**A tous les responsables scientifiques de l'UMR 7034**

**A Mr Kenneth Takeda, Directeur de l'Unité.**

Merci de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Pharmacologie et Physicochimie des Interactions Cellulaires et Moléculaires.

**A Mrs Bernard Bucher et Alain Beretz**

Merci de m'avoir permis de passer mon DEA de Pharmacologie.

**A l'ensemble du Personnel administratif et technique du l'UMR 7034.**

**A Christa Schott** pour toute l'aide technique et les conseils.

**A Jean François Poirier et tout le personnel de l'animalerie de la Faculté de Pharmacie.**

Merci de votre soutien.

**A Jean Michel Lantz et Denis Wagner pour leur assistance et leur soutien.**

**A Evelyne, Marlyse, Ingrid, Monique, Thérèse, Philippe et Héraude.** Merci pour tout.

**Aux Institutions et Organismes qui nous ont permis de réaliser ce travail**

(Fondation de France, ONIVINS, Université de Dakar).

**Au Professeur Aminata Sall Diallo**

Nous tenons à vous renouveler toute notre fidélité et toute notre dévouement.

Merci pour tout le soutien pendant ces quatre années.

**Au Personnel du Laboratoire de Biochimie Générale et Spécialisée, d'Urgence et de Garde des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.**

**Aux Drs Christian Khoel, Maurice Offner, Jean-Paul Heinrich, Marie Noël Tulasne, Lydia Lehr, Maurice Grucker, Geneviève Coumaros et Michèle Grima.**

Vous avez contribuer chacun à ce qui le concerne à notre formation en Biologie Médicale, mais le soutien que vous nous avez apporté a été déterminant et même décisif pour la poursuite de nos travaux de recherche. Merci pour toute la

confiance et de nous avoir accepter parmi vous. Nous vous serions éternellement reconnaissant.

**Au Personnel du Laboratoire de Pharmacologie et de Physiologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Dakar.**

**A Mamadou Diallo, Demba Ndiaye, Makhary et Yacine Fall.**

**A Ramtohul Parmeseeven (*in memorium*) et toute sa famille**

**A Muriel, Jasser, MinHo et Eric**

Merci d'avoir agrémenter nos journées et partager cette enrichissante période de notre vie.

**A Marta et Thierry Chataigneau**

Pour tous les agréables moments passés ensemble.

**A Yoro Sy, Mamadou Ndiaye, Mor Guéye, Madièye, Gora Mbaye et Modou Oumy Kane.**

**A Joseph SARR et Famille**

**A mes parents, mes frères et sœurs**

**A Fatou Bintou et Gorane**

Cette thèse est aussi la vôtre. Et elle est terminée ! Seulement, la Recherche, elle, continue ...

## Listes des publications

---

### I.1 – Articles publiés

ALENCAR JL, LOBYSHEVA I, GEFFARD M, **SARR M**, SCHOTT C, SCHINI-KERTH VB, NEPVEU F, STOCLET JC, MULLER B (2003a). Role of S-nitrosation of cysteine residues in long-lasting inhibitory effect of nitric oxide on arterial tone. **Mol Pharmacol** **63**: 1148-1158.

ALENCAR JL, CHALUPSKY K, **SARR M**, SCHINI-KERTH V, VANIN AF, STOCLET JC, MULLER B (2003b). Inhibition of arterial contraction by dinitrosyl-iron complexes: critical role of the thiol ligand in determining rate of nitric oxide (NO) release and formation of releasable NO stores by S-nitrosation. **Biochem Pharmacol** **66**: 2365-2374.

### II.2. - Articles soumis ou en préparation

**SARR M**, LOBYSHEVA I, DIALLO AS, STOCLET JC, SCHINI-KERTH VB, MULLER B (2004). Formation of releasable NO stores by S-nitrosoglutathione in arteries exhibiting tolerance to glyceryl-trinitrate.

**SARR M**, CHATAIGNEAU M, SCHOTT C, DIALLO AS, GEFFARD M, STOCLET JC, MULLER B, SCHINI-KERTH VB (2004). Targeted and sustained effect of NO by S-nitrosation of cysteine residues in arteries exhibiting endothelial dysfunction.

**SARR M**, CHATAIGNEAU M, MARTINS S, OAK M, SCHOTT C, EL BEDOUI J, MULLER B, CHATAIGNEAU T, SCHINI-KERTH VB (2004). Red wine polyphenols prevent the angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction by inhibiting the vascular expression of NADPH oxidase.

### **II.3. – Abstracts**

**SARR M**, CHATAIGNEAU M, MARTINS S, SCHOTT C, EL BEDOUI J, MULLER B, SCHINI-KERTH VB (2004). Formation of releasable NO stores by S-nitrosoglutathione in arteries exhibiting an endothelial dysfunction induced by chronic infusion of Angiotensin II. **Fundamental & Clinical Pharmacology 18, O-10, 215-226.**

**SARR M**, ZERR M, MULLER B, SCHINI-KERTH VB (2004). Red wine polyphenolic compounds prevent the induction of tolerance to organic nitrates in the isolated rat aorta. **Fundamental & Clinical Pharmacology 18, P-177, 215-226.**

**SARR M**, LOBYSHEVA I, SCHINI-KERTH VB, MULLER B (2004). Formation of releasable NO stores by S-nitrosoglutathione in arteries tolerant to glyceryl-trinitrate. **Fundamental & Clinical Pharmacology 18, P-182, 215-226.**

**SARR M**, LOBYSHEVA I, SCHINI-KERTH VB, MULLER B (2004). S-nitrosoglutathione caused the formation of releasable NO stores in arteries tolerant to glyceryl-trinitrate. **Arch Mal Cœur : 97 : 375-461.**

**SARR M**, CHATAIGNEAU M, MARTINS S, SCHOTT C, EL BEDOUI J, MULLER B, SCHINI-KERTH VB (2004). S-nitrosoglutathione caused the formation of releasable NO stores in arteries exhibiting an endothelial dysfunction induced by chronic infusion of angiotensin II. **Arch Mal Cœur : 96 : 359-450.**

**SARR M**, ZERR M, MULLER B, SCHINI-KERTH VB (2004). Prevention of the induction of tolerance to organic nitrates in rat isolated aorta by red wine polyphenolic compounds. **Arch Mal Cœur : 96 : 359-450.**

**SARR M**, ALENCAR JC, STOCLET JC, SCHINI-KERTH VB, MULLER B (2003). Differential influence of the endothelium on NO-induced persistent inhibition of tone among arteries. *Arch Mal Cœur* : **96** : 359-450.

ALENCAR JL, LOBYSHEVA I, GEFFARD M, **SARR M**, SCOTT C, SCHINI-KERTH V, NEPVEU F, STOCLET JC, MULLER B (2002). S-nitrosation of tissue thiols as a mechanism of formation of releasable NO stores in arteries. *Arch. Mal Cœur* : **95** : 313-388.

## Listes des abréviations et principaux symboles

---

ACEI : inhibiteurs de l'enzyme de conversion,  
ADMA : dimethylarginine asymétrique  
ADP : adénosine diphosphate  
ALDH2 : aldéhyde déshydrogénase de type II  
Ang I : angiotensine I  
Ang II : angiotensine II  
ATP : adénosine triphosphate  
BK : bradykinine  
BKDP : produits de dégradation de la bradykinine  
CCB : bloqueurs des canaux calciques,  
CysNO : S-nitrosocystéine  
DEA-NO : N-diethylamino-diazenolate-2-oxide  
DNIC : Complexes fer-dinitrosyls  
DOCA : acétate de désoxycorticostérone  
DPI : diphenyle iodinium  
EDHF : Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium  
EDRF : Facteur relaxant dérivé de l'endothélium  
ERO : Espèces réactives dérivées de l'oxygène  
FMD : dilatation médiée par le flux  
GDN : glyceryl dinitrate.  
GMPc : guanosine 3', 5' monophosphate cyclique  
GSNO : S-nitrosoglutathion  
GTN : trinitrine (glyceryl trinitrate)  
 $H_2O_2$ : peroxyde d'hydrogène  
HOPE : *Heart outcomes Prevention Evaluation*  
IEC : Inhibiteur de l'enzyme de conversion  
LDL : lipoprotéine de faible densité  
LysoPC : lysophosphatidylcholine

MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein-1*  
MLCK : kinase de la chaîne légère de la myosine  
mtALDH : aldéhyde deshydrogenase mitochondriale  
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
NEDH : *New England Diaconness Hospital*  
NO : Monoxyde d'azote  
NOS : NO Synthase  
PGH2 prostaglandine H2  
PI3-Kinase : phosphoinositide-3 kinase  
RSNO : S-nitrosothiols  
SHR : *spontaneous hypertensive rat*  
SHR-SP : *stroke-prone*  
SIN-1 : 3-morpholino-sydnonimine  
SNAC : S-nitroso-N-acétylcystéine  
SNAP : S-nitroso-N-acétylpenicillamine  
SOD : Superoxyde dismutase  
TNF- $\alpha$  : facteur nécrosant de tumeur  $\alpha$   
VEGF : *vascular endothelial growth factor*

## Listes des figures

---

**Figure 1 :** Représentation schématique des différentes tuniques de la paroi vasculaire.

**Figure 2 :** Réaction catalysée par les NO-synthases.

**Figure 3 :** Représentation schématique de la structure des NOS et du transfert d'électron du domaine réductase vers le domaine oxygénase de l'enzyme.

**Figure 4 :** Effets multiples du NO endothérial.

**Figure 5 :** Représentation schématique de la structure de la NADPH oxydase des cellules musculaires lisses.

**Figure 6 :** Représentation schématique du fonctionnement normal et découplé de la NOS et de ses conséquences.

**Figure 7 :** Mécanismes d'agents modulant indirectement l'activité biologique du NO endothérial.

**Figure 8 :** Représentation schématique des principales voies impliquées dans la relaxation vasculaire induite par le NO endothérial et par la trinitrine.

**Figure 9 :** Représentation schématique des voies impliquées dans le développement de la tolérance à la trinitrine.

**Figure 10 :** Représentation schématique des effets de thiols de faible poids moléculaire (R-SH) sur des protéines S-nitrosées et sur des complexes fer-dinitrosyls liés à des protéines.

# **Introduction générale**

Dans le système cardiovasculaire, une des découvertes majeures de ces vingt dernières années est celle du rôle exercé par le monoxyde d'azote (NO) d'origine endothéliale pour maintenir l'homéostasie vasculaire. De par ses divers effets sur les cellules circulantes et vasculaires, le NO endothélial est reconnu comme un facteur protecteur.

Malgré les progrès considérables réalisés dans le domaine de la chirurgie et de la thérapeutique, les pathologies cardiovasculaires restent encore aujourd'hui la première cause de mortalité dans les pays développés. Les recherches réalisées au cours de ces dernières années, sur divers modèles animaux mais aussi chez l'Homme, ont permis d'établir que les principaux facteurs de risque prédisposant à l'athérosclérose (diabète, hypercholestérolémie, hypertension artérielle, tabagisme, obésité) ainsi que différentes pathologies établies comme l'insuffisance cardiaque, sont associées à un dysfonctionnement de la voie du NO endothélial (concept de 'dysfonction endothéliale'). Cette dysfonction endothéliale joue un rôle important dans l'initiation et la progression du processus d'athérosclérose. Elle est liée en grande partie à un 'stress oxydant' qui conduit à une diminution de l'effet protecteur du NO endothélial. Devant ces situations, différentes stratégies ont été envisagées pour restaurer l'effet protecteur du NO endothélial, par diminution du stress oxydant et/ou par supplémentation en NO.

Parmi les agents communément appelés ‘donneurs de NO’, certains comme les nitrates organiques ont été utilisés en thérapeutique bien avant la découverte du rôle du NO dans les vaisseaux. Les nitrates organiques présentent l’inconvénient d’induire un phénomène de tolérance imputable, au moins en partie, à un stress oxydant consécutif à la biotransformation de ces composés dans la paroi vasculaire. D’une manière générale, l’intérêt des donneurs de NO pour suppléer au NO endothérial pourrait être limité du fait de la faible demi-vie du NO radicalaire produit à partir de ces composés. Des travaux récents menés dans le laboratoire ont permis de montrer que certains ‘donneurs de NO’ peuvent exercer des effets persistants dans les vaisseaux, par transfert de NO sur des groupements thiols, induisant ainsi la constitution de stocks de NO sous forme de protéines S-nitros(yl)ées. Au début de notre travail de thèse, ce mécanisme avait été décrit au laboratoire sur des modèles d’artères ‘saines’, dépourvues d’endothélium. Aucune information n’était disponible sur des modèles d’artères ‘pathologiques’, comme celles présentant une tolérance à l’effet des nitrates organiques, ou celles présentant une dysfonction endothéliale.

Selon différentes données épidémiologiques, il existe une corrélation inverse entre risque cardiovasculaire et consommation de polyphénols d’origine naturelle. Les effets potentiellement bénéfiques des polyphénols sur le système cardiovasculaire pourraient être en partie dus à des effets directs sur la paroi vasculaire. Il a été montré au laboratoire que des extraits

polyphénoliques de vin rouge et des polyphénols d'autres origines augmentent la production par l'endothélium de facteurs relaxants, et notamment de NO. Ces composés étant aussi connus pour leurs propriétés anti-oxydantes, une partie de leur effet protecteur pourrait ainsi être liée à la restauration de la biodisponibilité du NO. Là encore, au début de notre travail, les effets des polyphénols sur la fonction endothéliale avaient été étudiés au laboratoire sur la fonction endothéliale dans des modèles d'artères 'saines', et non pas sur les modèles 'pathologiques' cités précédemment.

Ainsi, l'objectif général de ce travail de thèse a été d'évaluer l'intérêt, en vue de prévenir et/ou de limiter l'évolution des pathologies vasculaires, de la modulation de la biodisponibilité du NO par la formation de stocks mobilisables de NO, ou par la consommation modérée d'un extrait polyphénolique du vin rouge.

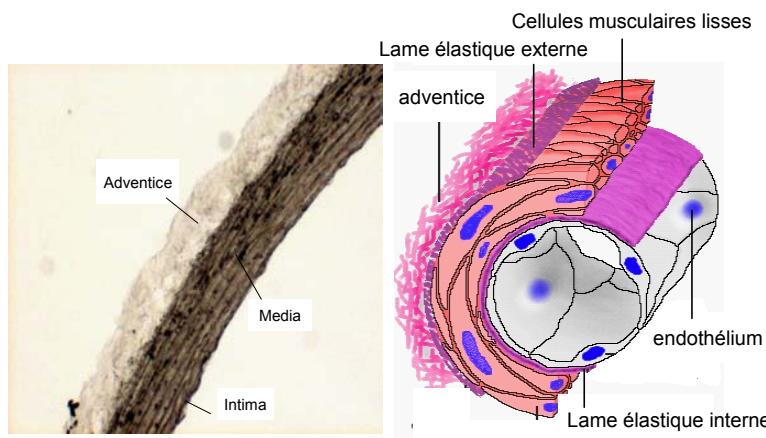
# **CHAPITRE 1**

## **Données bibliographiques**

# 1<sup>ERE</sup> PARTIE : ROLE DU NO ENDOTHELIAL DANS LE CONTROLE DE L'HOMEOSTASIE VASCULAIRE

## I.1. Structure et fonctions de la paroi vasculaire

Tous les vaisseaux sanguins, à l'exception des capillaires, sont structurellement et fonctionnellement compartimentés en 3 couches cellulaires qui, de la lumière vers l'extérieur, comprennent l'intima, la média et l'aventice.



**Figure 1 :** Microphotographie originale d'une coupe transversale d'aorte de rat (© Sarr et Martins, 2004) et représentation schématique des différentes tuniques de la paroi vasculaire (© [www.lab.anhb.uwa.edu.au](http://www.lab.anhb.uwa.edu.au) , modifiée).

L'intima, en contact direct avec le sang, est composée de cellules endothéliales en monocouche. La monocouche endothéliale repose sur une membrane basale pouvant être elle-même en contact étroit avec une couche sous-endothéliale. L'endothélium a principalement des fonctions fibrinolytiques, antithrombotiques, de transferts cellulaires et d'échanges

liquidiens et de régulation du tonus vasculaire par la libération de facteurs vasoactifs (voir I.2.).

La média (tunique médiane) contient les cellules musculaires lisses arrangeées de manière circulaire dans une matrice composée d'élastine et de fibres de collagène. Les cellules musculaires lisses sont le siège des mécanismes de contraction et de relâchement du vaisseau. Elles perçoivent des signaux provenant de l'endothélium et du tissu métaboliquement actif, des terminaisons nerveuses adventitiales et de l'interstitium. La contraction des cellules musculaires lisses survient suite à une augmentation de la concentration cytosolique en ions calcium. Celle-ci peut être la conséquence d'une libération de calcium à partir des stocks du réticulum et/ou d'une entrée de calcium d'origine extracellulaire. Le calcium libre cytosolique, en se liant à la calmoduline, va entraîner l'activation de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK) qui, phosphorylée, va désinhiber l'activité ATPasique de la chaîne lourde et permettre la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC) et la contraction, suite à l'interaction entre les filaments d'actine et de myosine (Walker J.S., 1994). L'état de contraction et de relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire réalise le tonus vasomoteur, définissant ainsi le niveau de pression artérielle et répartissant le flux en fonction des besoins métaboliques (Michel, 1998).

L'adventice est la couche la plus externe de la paroi vasculaire, en contact avec le tissu environnant. Son épaisseur varie selon le type vasculaire

et sa localisation. Elle est constituée d'un tissu conjonctif dense composé de fibroblastes et de macrophages-résidents, de fibres de collagène, de fibres élastiques et de varicosités nerveuses qui peuvent libérer différents facteurs vasoactifs. La couche adventitielle des artères de gros calibre contient de nombreux vaisseaux nourriciers (artéries, veinules, capillaires, vaisseaux lymphatiques) ou *vasa vasorum* qui apportent l'oxygène et les principaux nutriments à la couche médiale. Des données récentes, obtenues dans le laboratoire et par d'autres groupes, montrent que la production de facteurs vasoactifs par l'adventice n'est pas limitée au varicosités nerveuses. Les fibroblastes de l'adventice sont en effet capables de produire des médiateurs vasoactifs comme le NO (Kleschyov et al., 1998; Kleschyov et al., 2000b) ou les anions superoxydes (Pagano et al., 1997). De par la production de divers médiateurs, les fibroblastes de l'adventice seraient ainsi capables d'affecter le tonus et la structure des vaisseaux (Gutterman, 1999; Rey et al., 2002).

## I.2. Données générales sur les facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium

L'endothélium vasculaire ne constitue pas une simple barrière inerte entre le sang et les tissus. Depuis les travaux menés par les équipes de Sir John Vane (Bunting et al., 1976) et de Robert Furchtgott (Furchtgott and Zawadzki, 1980), il est bien établi que l'endothélium est capable de synthétiser et de libérer différents médiateurs susceptibles d'exercer des effets sur les cellules vasculaires et circulantes, et ainsi d'affecter les fonctions vasculaires par

exemple le tonus et la prolifération, les interactions entre cellules circulantes et cellules vasculaires et entre les cellules circulantes (adhésion, agrégation).

Divers facteurs dérivés de l'endothélium ont comme point commun d'exercer un effet relaxant vasculaire : c'est le cas du NO (voir paragraphe I.3.), de la prostacycline (qui inhibe également l'agrégation plaquettaire) et du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ou 'EDHF' (Busse et al., 2002). A ces facteurs relaxants synthétisés dans les cellules endothéliales et secrétés par ces cellules (tout au moins en ce qui concerne le NO et la prostacycline), s'ajoutent des substances vasoconstrictrices produites par des enzymes présentes sur la face des cellules endothéliales au contact de la circulation. Ainsi au niveau endothérial, l'activité de l'enzyme de conversion produit de l'angiotensine II, un octapeptide qui est le principal peptide actif du système rénine-angiotensine. Il intervient dans la régulation de la vasomotricité et de l'équilibre hydrosodé. L'une des conséquences fonctionnelles de l'action à long-terme de l'angiotensine II sur le système vasculaire est l'hypertrophie des parois artérielles et ventriculaires gauches. Bien que la production d'angiotensine II soit normale voire abaissée dans l'hypertension essentielle, le rôle du système rénine/angiotensine s'explique par une action favorisante sur la dysfonction endothéliale et une réponse exacerbée des cellules musculaires lisses à l'angiotensine II et à d'autres facteurs de croissance, ce qui favorise l'hypertrophie (voir également paragraphe II.3.2. ; [pour revue récente : (Schiffrin and Touyz, 2004)]. Parmi les

facteurs vasoconstricteurs et mitogènes d'origine endothélique, on peut également citer l'endothéline-1.

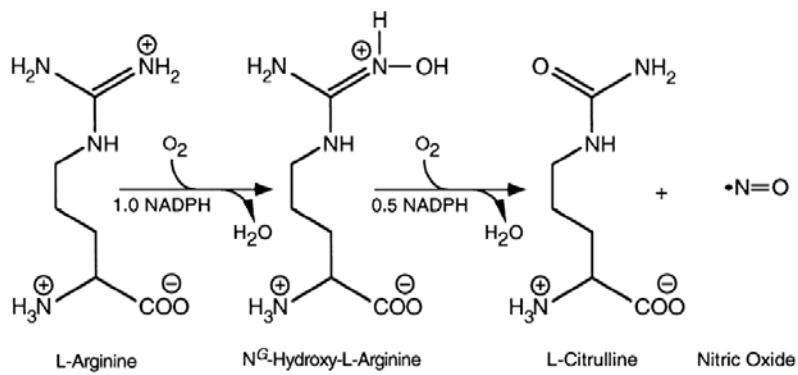
Aux facteurs endothéliaux cités précédemment, s'ajoutent les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO), même si celles-ci peuvent être produites par d'autres types cellulaires de la paroi vasculaire, comme les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. Parmi les ERO de nature radicalaire, les anions superoxyde ( $O_2^-$ ) exercent des effets propres au niveau de certaines voies de transduction dans les cellules vasculaires (Griendling et al., 2000a; Ellis and Triggle, 2003). Ils exercent également des effets indirects, en interagissant très rapidement avec le NO. Les effets qui découlent de cette interaction sont consécutifs à la diminution de l'activité biologique du NO et/ou à la formation de peroxynitrites (voir paragraphe 1.3.3.). Certaines ERO, de nature non radicalaire comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), exercent un effet relaxant direct au niveau vasculaire. Le  $H_2O_2$  produit au niveau de l'endothélium à partir des anions superoxydes par l'activité superoxyde dismutase a été identifié comme un 'EDHF' dans certaines artères (Matoba et al., 2000; Matoba et al., 2002; Morikawa et al., 2003; Rabelo et al., 2003). Il pourrait également intervenir comme facteur relaxant d'origine endothélique dans certains modèles de dysfonction endothélique associée à une hypertension systémique (Landmesser et al., 2003), voir (paragraphe II.3.2.)

### I.3. Le monoxyde d'azote

Le rôle physiologique du NO a été découvert suite aux travaux initialement menés par Furchtgott et Zawadzki (1980) montrant la production par l'endothélium d'un facteur relaxant de nature non prostanoïque appelé *endothelium derived relaxing factor* ou 'EDRF'. Le NO a été identifié quelques années plus tard comme rendant compte des principales propriétés biologiques de l'EDRF (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987).

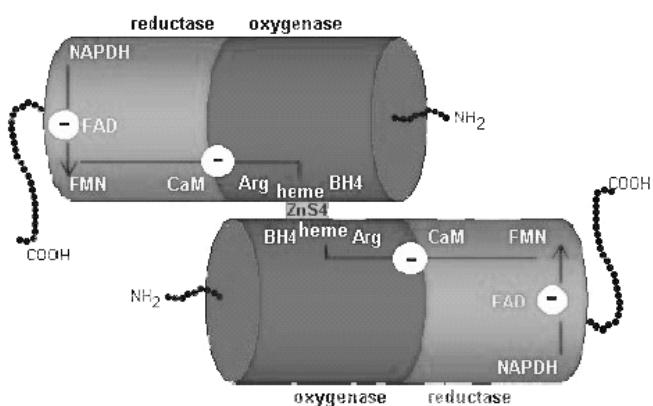
#### I.3.1. Biosynthèse par les NO-synthases

La biosynthèse du NO est assurée par les NO-synthases (NOS) (Andrew and Mayer, 1999). En présence de NADPH, d'oxygène, de tétrahydrobioptérine ( $\text{BH}_4$ ), de FAD et de FMN, les NOS catalysent dans une première étape l'oxydation de la L-arginine (acide aminé semi-essentiel) en  $\text{N}^{\omega}\text{-hydroxy-L-arginine}$ . Cet intermédiaire peut être libéré du site actif de l'enzyme et exercer des effets autocrines ou paracrines. Dans une deuxième étape, la  $\text{N}^{\omega}\text{-hydroxy-L-arginine}$  est transformée en L-citrulline et NO [Pour revue (Schini and Vanhoutte, 1993)](figure 2).



**Figure 2 :** Réaction catalysée par les NO-synthases

Les formes actives de NOS sont des homodimères. Chaque monomère comprend un domaine réductase en C-terminal liant NADPH et flavines et un domaine oxygénase en N-terminal comportant le site catalytique, le site BH4 et l'hème. Ce dernier joue un rôle important pour la dimérisation de l'enzyme, tandis que la liaison du BH<sub>4</sub> stabilisera la forme dimère. Le complexe calcium/calmoduline se fixe entre le domaine oxygénase et domaine réductase et contrôle le transfert d'électron du domaine réductase vers le domaine oxygénase pour permettre la réaction enzymatique [figure 3, (Albrecht et al., 2003)].



**Figure 3 :** Représentation schématique de la structure des NOS et du transfert d'électron du domaine réductase vers le domaine oxygénase de l'enzyme (Albrecht et al., 2003).

### I.3.1.1. Isoformes de NOS

Trois isoformes de NOS ont été bien identifiées. L'isoenzyme de type II (NOS2 ou NOS-II, NOS inducible ou iNOS) peut être induite dans de très nombreux types de cellules, dont les diverses cellules vasculaires, après exposition à des composants bactériens (lipopolysaccharide, acide lipotechoïque) ou des cytokines proinflammatoires telles que l'interleukine-1 bêta et le TNF alpha (Vanhoutte et al., 1989; Schini et al., 1994; Stoclet et al., 1999b; Muller et al., 2000). Contrairement aux autres isoformes de NOS, la NOS 2 est susceptible de produire des quantités importantes de NO, indépendamment des variations de la concentration en calcium cytosolique. Une telle production de NO par la NOS-II peut avoir lieu au niveau de types cellulaires ne produisant pas habituellement de NO, comme les fibroblastes de l'aventice vasculaire (Stoclet et al., 1998; Kleschyov et al., 2000b).

L'isoenzyme de type I (NOS1 ou NOS-I, NOS neuronale ou nNOS) est exprimée dans les neurones centraux et périphériques, mais aussi dans d'autres cellules comme les cellules épithéliales ou les cellules musculaires lisses de média, comme cela a été décrit dans l'artère carotide de rats spontanément hypertendus (Boulanger et al., 1998). L'isoenzyme de type III (NOS3 ou NOS-III, NOS endothéliale ou eNOS) est présente dans les cellules endothéliales et les cardiomyocytes. Comme la NOS 1, la NOS 3 est exprimée de façon constitutive. Elle produit de faible quantité de NO suite à

l'activation réversible par le complexe calcium/calmoduline qui lève l'inhibition exercée sur l'enzyme par la cavéoline-1 (Michel and Feron, 1997). Le NO produit par les NOS constitutives peut participer à des processus physiologiques de neurotransmission, de vasodilatation et d'inhibition de l'agrégation et/ou de l'adhésion plaquettaires, contribuant ainsi à l'homéostasie vasculaire.

### **I.3.1.2. Régulation de l'expression et de l'activité de la NOS endothéliale**

L'activité enzymatique de la NOS 3 peut être modulée [pour revues :(Forstermann et al., 1998; Li et al., 2002a; Li et al., 2002b)]. Les médiateurs circulants et les forces de cisaillement sont les deux facteurs régulateurs majeurs non seulement de l'activité de cette enzyme, mais également de la quantité de protéine et d'ARN messager correspondant (Arnal et al., 1999). En effet, la stimulation de récepteurs spécifiques d'agonistes variés (bradykinine, sérotonine, adénosine, ADP/ATP, histamine, thrombine) peut augmenter l'activité de la NOS-III (Schini et al., 1990; Castro et al., 1998). La phosphorylation des résidus sérine de la NOS 3 est essentielle pour sa régulation. Les conséquences de cette phosphorylation sont soit une augmentation soit une réduction de son activité en fonction du type de kinase (Protéine kinase A, Protéine kinase B encore appelée sérine/thréonine kinase Akt, de même que la Protéine Kinase C) et du résidu sérine impliqués (Hirata et al., 1995; Chen et al., 1999; Fulton et al., 1999; Gallis et al., 1999). En

outre, plusieurs facteurs peuvent augmenter l'expression et/ou l'activité de la NOS 3, incluant le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Kroll and Waltenberger, 1998; Bouloumié et al., 1999), l'insuline (Fleming et al., 2003), le *Transforming Growth Factor* (TGF- $\beta$ ), l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) ou de concentrations faibles de LDL oxydées ou son facteur athérogénique majeur le lysophosphatidylcholine (lysoPC). D'autres facteurs sont connus pour réduire l'expression de la NOS 3, en particulier le TNF- $\alpha$ , l'érythropoïétine, l'hypoxie et des concentrations fortes de LDL oxydées (Fleming and Busse, 1999; Govers and Rabelink, 2001).

### I.3.1.3. Inhibiteurs de NO synthases

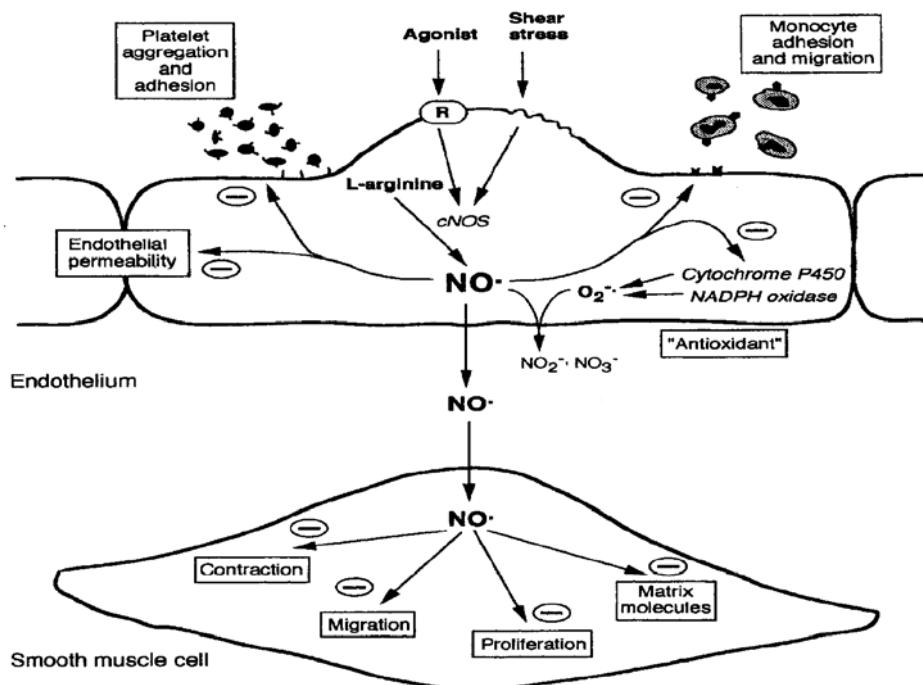
Il existe différents inhibiteurs de NOS (Stoclet et al., 1999b). Les premiers inhibiteurs de NOS ont été les analogues de la L-arginine ( $L\text{-N}^{\omega}\text{-methylarginine}$ ,  $N^{\omega}\text{-diméthylarginine}$ ,  $L\text{-N}^{\omega}\text{-nitroarginine}$ ,  $L\text{-N}^{\omega}\text{-aminoarginine}$ ), les mêmes dérivés de la série D étant inactifs. Ces dérivés sont des inhibiteurs efficaces mais peu sélectifs d'une classe particulière de NOS. Ils sont utilisés comme outils dans les études *in vitro*, mais peuvent se révéler délétères dans des études *in vivo* (Henrion et al., 1996; Bartunek et al., 2000; Ciani et al., 2001). Même dans le cas du choc septique où les résistances vasculaires sont dangereusement basses du fait notamment de l'induction de NOS2, leur administration s'est révélée néfaste. D'autres molécules plus sélectives ont été évaluées. C'est le cas notamment du composé 1400 W qui présente une

bonne affinité et une sélectivité pour la NOS 2 (Stoclet et al., 1999b). La dimethylarginine asymétrique (ADMA) est un inhibiteur endogène la NOS 3. Des concentrations plasmatiques élevées en ADMA constituent un nouveau facteur de risque pour le développement d'une dysfonction endothéliale (Boger, 2003).

### **I.3.2. Rôle physiologique du NO d'origine endothéliale**

Le NO d'origine endothéliale exerce localement des effets multiples (figure 4). Il peut diffuser vers les couches cellulaires sous-jacentes. Le NO inhibe le tonus vasculaire, la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses ainsi que la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire (Schini-Kerth, 1999a). Le NO peut aussi diffuser vers le lumen du vaisseau sanguin où il contribue au maintien de la fluidité du sang. Le NO inhibe l'adhésion des plaquettes sanguines et des leucocytes aux cellules endothéliales. De plus, il prévient l'agrégation plaquettaire et facilite la dissolution d'agrégats plaquettaires. Le NO exerce vraisemblablement son rôle régulateur sur l'hémostase uniquement à l'interface de la surface lumineuse des cellules endothéliales et du sang, car il est rapidement capté par l'hémoglobine des érythrocytes et est inactivé par les radicaux oxygénés tels que les anions superoxyde. Le NO peut également affecter l'activité du système fibrinolytique en régulant la libération de l'activateur du plasminogène (t-PA) et de son inhibiteur le PAI-1, mais aussi inhibiter l'expression de divers gènes pro-athérosclérotiques comme le monocyte

chemoattractant protein-1 (MCP-1) et le facteur tissulaire. L'importance du NO d'origine systémique sur le contrôle de la fluidité du sang a été démontrée *in vivo* chez l'homme par la régulation du temps de saignement (Schini-Kerth, 1999b).



**Figure 4 :** Effets multiples du NO endothérial (Schini-Kerth, 1999).

### I.3.3. Mécanismes des effets du NO

Les effets biologiques du NO découlent de l'interaction de l'une ou l'autre de ses formes rédox (NO radical, NO<sup>+</sup>, NO<sup>-</sup>) avec différentes cibles biologiques. On distingue classiquement des effets GMPc (Guanosine 3',5'-MonoPhosphate cyclique)-dépendants et indépendants du NO.

Une grande part des effets du NO dans les vaisseaux est liée à la liaison réversible de NO radical au fer héminique de la guanylyl cyclase cytosolique. Cette dernière constitue la cible la plus sensible du NO produit par la NOS 3 (Boulanger et al., 1990). Cette hémoprotéine soluble activée en présence de 50 à 100 nM de NO, transforme la guanosine triphosphate (GTP) en un composé cyclique, la guanosine-3',5' monophosphate (GMPc). En dehors de certains canaux ioniques et des phosphodiestérases des nucléotides cycliques (qui non seulement hydrolysent le GMPc en 5'GMP inactif, mais peuvent également, selon les isoformes être soit activées soit inhibées par le GMPc), une des cibles principales du GMPc sont les protéines-kinases dépendantes des nucléotides cycliques (Lincoln and Cornwell, 1993; Lucas et al., 2000). Dans les vaisseaux, l'activation de la protéine-kinase GMPc dépendante va induire une relaxation, par diminution de la concentration en calcium cytosolique (avec pour conséquence la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine) et/ou diminution de la sensibilité des myofilaments pour le calcium par activation de la phosphatase des chaînes légères de la myosine (Carvajal et al., 2000; Hofmann et al., 2000; Lincoln et al., 2001).

Les effets indépendants du GMPc découlent de l'interaction de NO avec d'autres cibles que la guanylyl cyclase cytosolique. Le NO peut interagir avec les anions superoxydes produits par diverses oxydases dont les NOS elles-mêmes dans certaines conditions (voir paragraphe II.2.3.). Beaucoup

d'effets cytotoxiques du NO sont attribués aux peroxynitrites formés suite à l'interaction entre NO et anions superoxydes. La cyclooxygénase est une des cibles vasculaires du peroxynitrite. Ce dernier constitue le principal peroxyde capable d'activer la cyclooxygénase *in vivo* (Landino et al., 1996; Marnett et al., 2000). La prostacycline synthase est inhibée par les peroxynitrites (Zou et al., 1997). Il résulte de ces deux mécanismes une augmentation de la prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), puissant agent vasoconstricteur agissant par activation des récepteurs TP.

La S-nitrosation de résidus cystéine a été décrite comme un mécanisme de régulation ou de modulation de la fonction de plusieurs récepteurs, canaux ioniques, enzymes, transporteurs et facteurs de transcription (Ahern et al., 2002). Il a récemment été montré, dans divers cellules et tissus dont des artères isolées et des cellules endothéliales en culture, que l'activation de toutes les isoformes de NOS est associée à la S-nitrosation de protéines (Gow et al., 2002). Cela conforte l'hypothèse que la S-nitrosation est un mécanisme universel dans la voie de signalisation du NO et peut être responsable de certains de ses effets biologiques. Dans les vaisseaux, il a été montré que la S-nitrosation de certaines familles de canaux potassiques (canaux potassiques à large conductance activés par le calcium, ou BK<sub>Ca</sub>) entraîne leur activation, conduisant ainsi à une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses et à un relâchement vasculaire (Bolotina et al., 1994). Un certain nombre d'autres études montrent le rôle de S-nitrosation dans des effets du NO

indépendants du GMPC au niveau vasculaire (Plane et al., 1996; Mistry and Garland, 1998b; Mistry and Garland, 1998a; Sun et al., 2001). Il a été montré récemment au laboratoire que la S-nitrosation de résidus cysteine est responsable de la diminution persistante du tonus vasculaire induite par certains donneurs de NO sur des artères dépourvues d'endothélium (Alencar et al., 2003a; Alencar et al., 2003b; Alencar et al., 2003c). Par analogie avec la circulation sanguine, dans laquelle la S-nitrosation de l'albumine ou de l'hémoglobine pourrait intervenir dans les phénomènes de transport de NO (Muller et al., 2002), il a été proposé que la S-nitrosation de protéines pourrait représenter une forme de stockage de NO dans les vaisseaux (voir paragraphe III.1.2.).

## **2EME PARTIE : DYSFONCTION ENDOTHELIALE**

### **II.1. Données générales**

Le NO d'origine endothéliale exerce des effets protecteurs multiples sur les cellules vasculaires et sur les cellules circulantes. Expérimentalement, la fonction endothéliale peut être évaluée relativement aisément par l'étude des propriétés vasorelaxantes immédiates d'agonistes endothélium-dépendants comme l'acétylcholine (ou carbachol, métacholine) ou la bradykinine. Ces études sont réalisées *ex vivo*, sur des artères issues d'animaux (voire sur des artères d'origine humaine dans certains cas) servant de modèles aux pathologies humaines. La fonction endothéliale peut être évaluée *in vivo* chez l'Homme, suite à l'injection d'acétylcholine ou de métacholine dans l'artère brachiale. Quelque soient les modèles, l'effet d'un donneur de NO (nitroprussiate de sodium, trinitrine) se doit d'être étudié en parallèle, afin d'évaluer la réponse du muscle lisse au NO exogène.

Il est clair à l'heure actuelle que la dysfonction endothéliale est associée aux facteurs de risque qui prédisposent aux maladies ischémiques tels le tabagisme (Hutchison, 1998), le diabète (Angulo et al., 2003), l'hypertension artérielle ou l'hypercholestérolémie (John and Schmieder, 2000) de même que le vieillissement (Andrawis et al., 2000), et à des pathologies installées telles que l'athérosclérose ou l'insuffisance cardiaque (Badimon et al., 1992;

Busse and Fleming, 1996; Barton, 2000; Bousette and Giaid, 2003; Davignon and Ganz, 2004). Des situations cliniques telle que la tolérance aux dérivés nitrés sont également associés à une dysfonction endothéiale (Warnholtz et al., 2002; Fayers et al., 2003; Leopold and Loscalzo, 2003). Dans ces divers modèles, l'analyse des mécanismes qui sous-tendent la dysfonction endothéiale a permis de mettre en évidence d'une part le rôle d'une réduction de la biodisponibilité du NO endothéial (par déficit de sa production ou par augmentation de sa dégradation) et d'autre part le rôle joué par le stress oxydant dans ces altérations. Néanmoins, le stress oxydant ne saurait à lui seul expliquer la dysfonction endothéiale. D'autres mécanismes sont probablement impliqués, comme altération de l'expression et de l'activité des NOS par exemple, la production accrue d'ADMA, des altérations de l'interaction NOS/cavéoline, des altérations de la voie GMPC [pour revue : (Maxwell, 2002)].

## **II.2. Espèces réactives dérivées de l'oxygène**

### **II.2.1. Nature et localisation des espèces réactives dérivées de l'oxygène**

Les ERO sont constituées principalement par des radicaux libres oxygénés dont la production se trouve notablement augmentée au cours du stress oxydatif. Les principaux radicaux libres oxygénés sont l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) et le radical hydroxyle ( $OH\cdot$ ). D'autres ERO telles que le

peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ), le dioxyde d'azote ( $N_2O$ ) et l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ) ne sont pas considérées comme des radicaux libres, mais elles ont des pouvoirs oxydants contribuant ainsi au stress oxydatif.

Dans une situation normale, l'anion superoxyde se forme de façon continue au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale comme résidu de la réduction imparfaite de l'oxygène. Il apparaît aussi au cours du fonctionnement de certaines enzymes telles que les monoamines oxydases et des prostaglandines synthases à des concentrations qui normalement devraient être réduites par les superoxydes dismutases (SOD) (Ducrocq et al., 2001). Les SOD représentent un mécanisme de défense important vis-à-vis des  $O_2^-$ . Trois isoenzymes ont été identifiées : une forme cytosolique (CuZnSOD), une forme d'origine mitochondriale (MnSOD) et une isoenzyme extracellulaire qui est également une CuZnSOD et représentant environ 50% de l'activité totale des SOD (Stralin et al., 1995; Fukai et al., 2002). Les SOD dismutent les anions superoxydes en ( $H_2O_2$ ), qui lui-même peut être dégradé en  $H_2O$  par la catalase, ou former le radical hydroxyle ( $OH\cdot$ ) par la réaction de Fenton. Dans certaines situations pathologiques, en dehors de la chaîne respiratoire mitochondriale, des enzymes de la voie de l'acide arachidonique (lipoxygénase et cyclooxygénase), de la xanthine oxydase, de certaines peroxydases et d'autres hémoprotéines, deux sources particulièrement importantes de ERO ont été bien étudiées au niveau du système

cardiovasculaire. Il s'agit de la NADPH oxydase et de la NOS (Cai and Harrison, 2000) (voir paragraphe II.2.2. et II.2.3.). La production cellulaire d'une ERO peut entraîner la formation de plusieurs autres à travers des réactions en cascade. Par exemple, la réaction de ces radicaux avec les acides gras polyinsaturés peut former des radicaux peroxydes ( $R-COO\cdot$ ) qui, par l'attaque radicalaire des acides gras adjacents, entraînent la peroxydation des lipides dont l'accumulation au niveau cellulaire a de nombreuses conséquences cytotoxiques (Cai and Harrison, 2000).

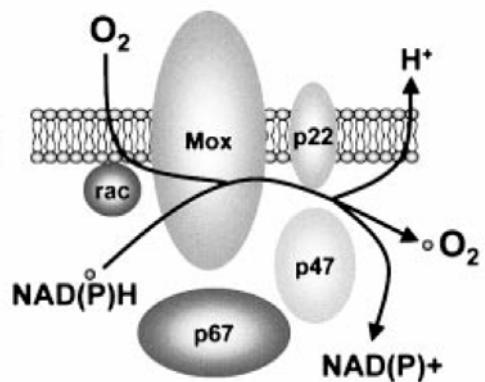
Parmi les moyens de détection des ERO, l'utilisation des techniques d'immunofluorescence présente l'avantage de permettre de les localiser dans la paroi vasculaire dans des modèles pathologiques (Munzel et al., 2002). Plusieurs études ont montré la présence d'ERO au niveau de tous les types cellulaires, en particulier fibroblastes de l'aventice, cellules musculaires lisses et endothéliales (Mori et al., 2001; Li and Shah, 2002; Brennan et al., 2003). La localisation vasculaire de ces ERO dépend de la nature du stimulus et de la pathologie associée (Wolin et al., 2002). En effet, une production importante de ces ERO a été observée au niveau de l'endothélium dans des modèles de rat diabétique, chez des patients au cours du diabète (Hink et al., 2001; Guzik et al., 2002) mais également dans des modèles d'hypertension artérielle « DOCA + sel » (Cai and Harrison, 2000). Cependant, dans d'autres modèles d'hypertension artérielle comme celle induite par infusion chronique d'angiotensine II, les fibroblastes de l'aventice ont été considérées comme une source importante de ces ERO (Wang et al., 1998). Une production

accrue d'ERO par les cellules musculaires lisses a été rapportée dans des modèles d'athérosclérose chez le lapin (Miller et al., 1998). Ces différences de localisation de la production d'ERO pourraient aussi refléter l'hétérogénéité des sources enzymatiques.

### **II.2.2. Rôle de la NADPH oxydase comme source d'anions superoxydes**

De nombreuses études ont montré, notamment par l'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes à flavine telle que le diphenylène iodinium (DPI), que la NADPH oxydase est une source importante d'anions superoxydes aussi bien au niveau de vaisseaux humains que dans de modèles animaux associés à des pathologies vasculaires (Rajagopalan et al., 1996; Griendling et al., 2000b). De plus, le niveau de production d'anions superoxydes par la NADPH oxydase détermine la sévérité de la dysfonction endothéliale et pourrait permettre de caractériser expérimentalement et cliniquement le profil du risque cardiovasculaire (Guzik et al., 2000). Cette production explosive d'anions superoxydes par la NADPH oxydase est en rapport avec l'activité de l'enzyme et le niveau d'expression des sous-unités qui la composent peut également être augmenté [pour revues récentes : (Griendling et al., 2000b; Cai et al., 2003; Lassegue and Clempus, 2003)]. En effet, l'activation du complexe NADPH oxydase s'accompagne de certaines modifications conformationnelles de son composant redox, la flavoprotéine b<sub>558</sub> [protéine membranaire hétérodimérique avec une sous-unité glycosylée de masse 91 kDa portant deux composants héminiques, les sites FAD et NADPH (gp91phox) et une autre sous-unité de 22 kDa (p22phox)]. Les deux facteurs

cytosoliques présents ont des masses moléculaires de 67 et 47 KDa (p67phox et p47phox, respectivement). Une autre protéine de 40 KDa est également présente dans le complexe et semble jouer un rôle de régulateur du niveau d'activation de l'enzyme (Sorescu et al., 2002; Touyz et al., 2002).



**Figure 5 :** Représentation schématique de la structure de la NADPH oxydase des cellules musculaires lisses [modifié d'après (Griendling et al., 2000b)]. La distribution des différentes sous-unités de la NADPH oxydase dans les cellules vasculaires a été également étudiée comme montré au niveau du tableau 1.

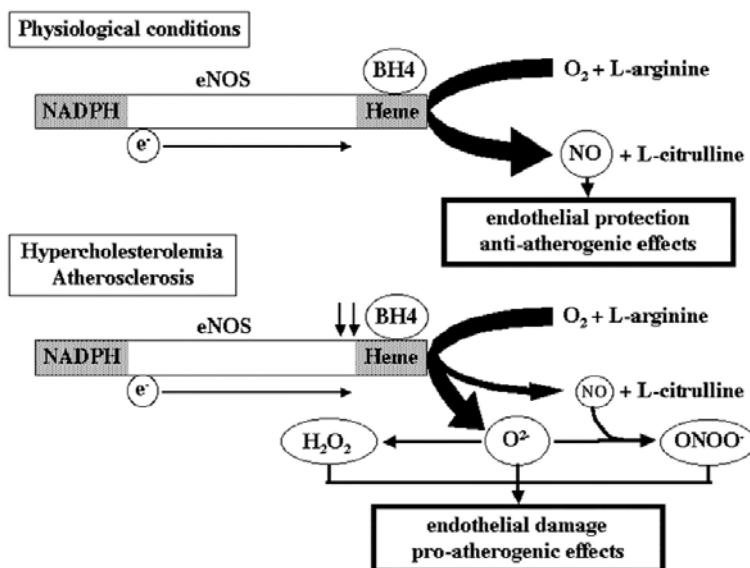
Tableau 1 : Niveau d'expression des sous-unités de la NADPH oxydase dans les cellules vasculaires (modifié d'après Griendling et al., 2000b).

	gp91phox		mox		p22phox		rac		p47phox		p67phox	
	RNA	Protein	RNA	Protein	RNA	Protein	RNA	Protein	RNA	Protein	RNA	Protein
VSMC	-/+	-	++	ND	+++	+++	+++	+++	+	+?	+	?
EC	+	-/+	ND	ND	+	+	+	+	-/+	-/+	+	-/+
Fibroblast	-/+	-/+	-	ND+	+	+	+	+	+	+	+	+

### II.2.3. Rôle des NO synthases comme source d'anions superoxydes

La NOS 3 est également considérée comme une source potentielle d'ERO, lorsqu'elle fonctionne en mode appelé 'découplé'. En effet, les études réalisées à l'aide des enzymes purifiées ou recombinantes ont montré

que la NOS 3, tout comme les NOS 1 et NOS 2, est capable de générer des anions superoxydes dans des situations de déficit de son substrat, la L-arginine, ou de ces cofacteurs d'activation, en particulier la tétrahydrobioptérine ( $\text{BH}_4$ ). Inversement, dans des systèmes déplétés en  $\text{BH}_4$ , la supplémentation en  $\text{BH}_4$  augmente la production de NO et diminue celle d'anions superoxydes (Wever et al., 1997; Vasquez-Vivar et al., 1998; Xia et al., 1998). Il semble que lors d'un déficit en  $\text{BH}_4$ , les électrons ne sont pas correctement transférés du domaine réductase vers le site catalytique du domaine oxygénase, et réagissent avec l'oxygène pour former des anions superoxydes. Lorsque la NOS 3 fonctionne en mode partiellement découplé, la production locale d'anions superoxydes et de NO pourrait conduire à une production significative de peroxynitrites [figure 6 : (Goligorsky et al., 2002; Kawashima and Yokoyama. 2004)].



**Figure 6 :** Représentation schématique du fonctionnement normal et découplé de la NOS, et de ses conséquences (Kawashima and Yokoyama, 2004).

## **II.3. Rôle du stress oxydant dans la dysfonction endothéliale : exemple de l'hypertension artérielle systémique**

L'hypertension artérielle est caractérisée par une augmentation chronique de la pression artérielle. Les complications vasculaires liées à cette pathologie sont à la base des conséquences organiques qui sont essentiellement les accidents ischémiques cardiaques et cérébraux, l'insuffisance rénale, l'hypertrophie cardiaque et le remodelage pariétal. Plusieurs modèles d'hypertension artérielle expérimentale ont été développés, dans lesquels existe une dysfonction endothéliale liée à un stress oxydant.

### **II.3.1. Modèles expérimentaux d'hypertension artérielle systémique**

De l'implication physiologique du NO endothérial dans la régulation de la pression artérielle découle un modèle d'inhibition chronique de l'activité des NOS, soit par l'administration chronique d'inhibiteurs de NOS, soit par invalidation spécifique du gène de la NOS 3. Un modèle ancien d'hypertension expérimentale est l'hypertension rénovasculaire de Goldblatt (pour historique, (Basso and Terragno, 2001)). Il s'agit de provoquer une sténose unilatérale par clampage d'une artère rénale et d'exposer de ce fait le rein controlatéral à l'hypertension. Un autre modèle est l'hypertension secondaire à un surdosage en minéralocorticoïde et en sel encore appelé « DOCA + sel » qui consiste à administrer l'acétate de désoxcorticostérone (DOCA) en présence de concentrations élevées de chlorure de sodium.

L'hypertension qui en découle est le reflet d'une rétention hydrosodée entraînant une hypervolémie.

Aux modèles d'hypertensions secondaires précédents s'ajoutent un certain nombre de modèles génétiques. Les rats spontanément hypertendus (SHR) sont des rats génétiquement hypertendus. Ils présentent un syndrome d'hypertension spontanée avec une surcharge de pression chronique dans toute la durée de leur vie. Ces rats sont obtenus par croisement successif de souches hypertendues dont la tension était supérieure à celles des précédentes. La souche SHR se caractérise également par une hypertrophie ventriculaire gauche comme observée dans le modèle DOCA + sel. Il est alors important de prendre comme témoin la souche normotendue Wistar Kyoto (Okamoto and Aoki, 1963) qui présente la même hypertrophie cardiaque apparaissant très tôt au cours de son développement. Un autre modèle expérimental de rat spontanément hypertendu est la souche « stroke-prone » ou SHR-SP. Elle dérive de la souche SHR avec des niveaux de pression artérielle plus élevés et des risques d'accidents vasculaires plus sévères. Les mécanismes génétiques responsables de l'hypertension artérielle de ces différentes lignées ne sont pas encore établis. Cependant, des études récentes ont montré l'existence d'un stress oxydatif qui pourrait contribuer comme facteur aggravant dans la pathogénicité de ces types d'hypertension artérielle (Kishi et al., 2004; Lee et al., 2004; Tanito et al., 2004).

D'autres souches de rats hypertendus peuvent également être citées : la souche de Dahl, qui de modifications génétiques, est devenue hypersensible à l'apport sodé ; la souche de rat New England Diaconness Hospital (NEDH) qui présente spontanément au cours de son développement des médullosurénalomes malins ou phéochromocytomes. Les conséquences physiopathologiques sont une hypersécrétion de catécholamines et une HTA. Enfin, un autre modèle d'hypertension génétique est constitué par les rats lyonnais hypertendus (LH) avec leurs 2 souches témoins LN (à pression normale) et LL (à basse pression).

### **II.3.2. Stress oxydant et hypertension artérielle systémique**

Il existe de nombreuses évidences qui supportent l'implication des anions superoxydes dans divers modèles d'hypertension systémique. Ces anions superoxydes réagissent très rapidement avec le NO endothérial, qui, dans les conditions physiologiques, réduit en permanence les résistances vasculaires. La conséquence de l'interaction entre les anions superoxydes et le NO est la baisse de la biodisponibilité en NO, contribuant ainsi à l'élévation de la pression artérielle. Bien que le stress oxydatif soit impliqué dans différents modèles, les résultats de nombreuses études sont en accord avec la notion selon laquelle il intervient plus dans l'aggravation que dans la genèse de la pathologie hypertensive (Nakazono et al., 1991; Thomas et al., 2003). Il est également à noter que la production accrue d'ERO pourrait aussi, directement ou indirectement, altérer les mécanismes responsables de l'effet relaxant du NO sur les cellules musculaires lisses. Dans le modèle de rats SHR

ou de rats traités de façon chronique par l'AngII, il existe un phénomène de 'down regulation' de la guanylyl cyclase cytosolique et une diminution de l'activité de la voie GMPC au niveau vasculaire (Kloss et al., 2000; Mollnau et al., 2002). Ceci pourrait expliquer la diminution de l'effet relaxant d'un donneur de NO comme la trinitrine, qui est aussi observée dans certains de ces modèles (Rajagopalan et al., 1996; Mollnau et al., 2002).

La production vasculaire d'anions superoxydes est augmentée dans les modèles SHR (Wu et al., 2001), DOCA-salt (Somers et al., 2000; Beswick et al., 2001), par clampage de l'artère rénale (Heitzer et al., 1999; Dobrian et al., 2001), par inhibition chronique de NOS (Kitamoto et al., 2000) et par infusion chronique d'Ang II (Rajagopalan et al., 1996; Landmesser et al., 2002a). Cette production accrue d'anions superoxydes a une importance fonctionnelle, car l'administration d'anti-oxydants de diverses natures permet de normaliser la pression artérielle des animaux (Laursen et al., 1997; Mizutani et al., 2000; Beswick et al., 2001; Chen et al., 2001; Dobrian et al., 2001; Nishiyama et al., 2001; Noguchi et al., 2001; Wu et al., 2001; Park et al., 2002; Cuzzocrea et al., 2004; Negishi et al., 2004). Certaines études rapportent également que le traitement anti-oxydant permet de corriger la dysfonction endothéiale (Rajagopalan et al., 1996; Cuzzocrea et al., 2004).

Dans de nombreuses études, le rôle de NADPH oxydase comme source d'anions superoxyde a été démontré à l'aide d'inhibiteurs, ou de modèles de

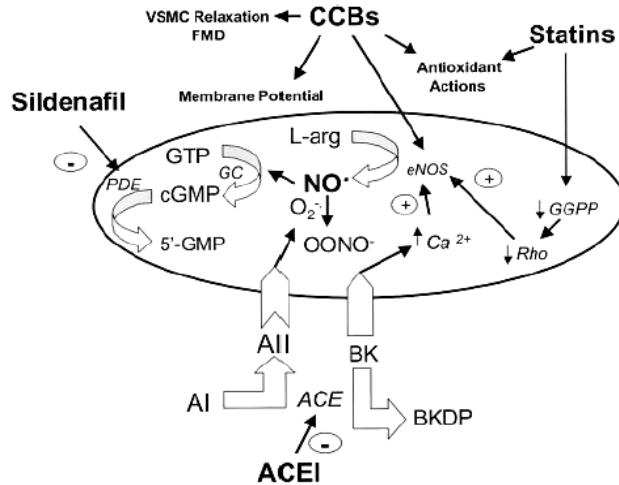
souris déficientes pour l'une des sous-unités de la NADPH oxydase (Rajagopalan et al., 1996; Beswick et al., 2001; Landmesser et al., 2002b).

Dans certains modèles comme celui de l'hypertension induite par infusion chronique d'Ang II, une augmentation de l'expression de diverses sous-unités de la NADPH oxydase a été rapporté (Fukai et al., 2002; Mollnau et al., 2002).

La production accrue d'ERO par la NADPH oxydase pourrait aussi initier le phénomène de découplage de la NOS (Mollnau et al., 2002; Griendling and FitzGerald, 2003). Des travaux récents menés dans le modèle 'DOCA – salt' (à l'aide de souris déficientes ou non en NOS 3 ou en sous-unité p47<sup>phox</sup> de la NADPH oxydase) ont mis en évidence que la production d'ERO par la NADPH oxydase conduit à l'oxydation de la BH<sub>4</sub> et au découplage de la NOS endothéliale. Ceci entraîne une diminution de la production de NO et une augmentation de la production d'ERO par la NOS-3. Une supplémentation en BH<sub>4</sub> diminue la production vasculaire d'ERO, augmente la production de NO par cette enzyme, et réduit la pression artérielle. La fonction endothéliale des aortes issues de souris 'DOCA-salt' n'est que faiblement altérée, mais semble être médiée par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formé par la NOS découpée (Landmesser et al., 2003). Des résultats très similaires ont été décrits chez des souris mutantes présentant une réduction très importante en GTP cyclohydrolase I, l'enzyme limitante dans la synthèse de BH<sub>4</sub> (Cosentino et al., 2001), ce qui supporte l'importance du rôle du déficit en BH<sub>4</sub> dans les modifications de la fonction endothéliale observée dans certains modèles d'hypertension.

## **3EME PARTIE : APPROCHES PHARMACOLOGIQUES POUR AUGMENTER LA BIODISPONIBILITE EN NO**

La dysfonction endothéliale peut être considérée comme une manifestation précoce de beaucoup de pathologies vasculaires. En clinique humaine, de nombreuses approches pharmacologiques, aussi bien préventives que curatives, incluant l'administration de L-arginine (Andrasi et al., 2003; Bilgen et al., 2003; Ahlers et al., 2004), d'hypcholestérolémiants, d'acide folique ou d'agents antioxydants (Andrews et al., 2001; Fang et al., 2002; Hornig, 2002) ont été évaluées dans le but de restaurer la fonction endothéliale (Bell et al., 1998; Abeywardena and Head, 2001; Adamopoulos et al., 2002). De nombreuses études expérimentales et cliniques ont montré l'intérêt potentiel d'agents pharmacologiques à propriétés antioxydantes ou capables de reproduire par divers mécanismes les effets biologiques du NO endogène sur le système vasculaire [figure 7 ; (Ignarro et al., 2002)]. Parmi ces agents, divers donneurs exogènes de NO pourraient être utilisés pour suppléer au déficit ou à la diminution de l'activité biologique du NO d'origine endothéliale, et ainsi restaurer l'effet protecteur vasculaire (Megson and Webb, 2002). Parmi les autres approches évaluées, on peut aussi citer le transfert du gène de la NOS 3 dans les cellules vasculaires (Chen et al., 1998).



**Figure 7 :** Mécanismes d'agents modulant indirectement l'activité biologique du NO endothérial. Abréviations : CCB : bloqueurs des canaux calciques, ACEI : inhibiteurs de l'enzyme de conversion, AI : angiotensine I ; All : angiotensine II ; BK : bradykinine, BKDP : produits de dégradation de la bradykinine ; FMD : dilatation médiée par le flux (Ignarro et al., 2002).

### III.1. Supplémentation en NO

#### III.1.1. Les donneurs de NO

##### III.1.1.1. Données générales

Le terme « donneur de NO » se réfère à des composés appartenant à différentes familles chimiques qui libèrent directement le médiateur actif NO, mais il inclut aussi les composés qui ne donnent pas le NO directement, mais sous une forme intermédiaire qui est convertie en NO après sa libération. L'efficacité et l'amplitude des réponses biologiques au NO changent en fonction du temps d'exposition et de la concentration finale en donneur de NO utilisé (Feelisch, 1998). Dans les milieux biologiques, toutes ses formes rédox ( $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{NO}^+$ , ou  $\text{NO}^-$ ) peuvent être libérées. Ces différentes formes présentent chacune des propriétés et des réactivités différentes par rapport

aux molécules cibles. En plus, la proportion de NO<sup>+</sup> ou NO<sup>-</sup> formés dépend de l'environnement réactionnel et du profil enzymatique du tissu ou de la préparation d'organe utilisés (Feelisch, 1998). Les mécanismes par lesquels ces composés induisent la formation de NO ne sont pas toujours clairement définis. Ils sont complètement différents d'un composé à l'autre, de même que leur réactivité chimique et la cinétique de libération de NO. Certains d'entre eux comme par exemple, la trinitrine (un nitrate organique) requièrent l'intervention catalytique d'une enzyme (Ahlnér et al., 1991; Bennett et al., 1994; Chen et al., 2002), tandis que d'autres comme le 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) et les diazeniumdiolates (NONOates) peuvent donner du NO spontanément en solution (Feelisch et al., 1989; Morley and Keefer, 1993). D'autres comme le nitroprussiate de sodium (SNP) ou les RSNO nécessitent l'intervention d'autres espèces chimiques ou de processus rédox pour la formation de NO (Arnelle and Stamler, 1995; Butler et al., 1995; Hughes, 1999; Hogg, 2000).

### III.1.1.2. Nitrates organiques

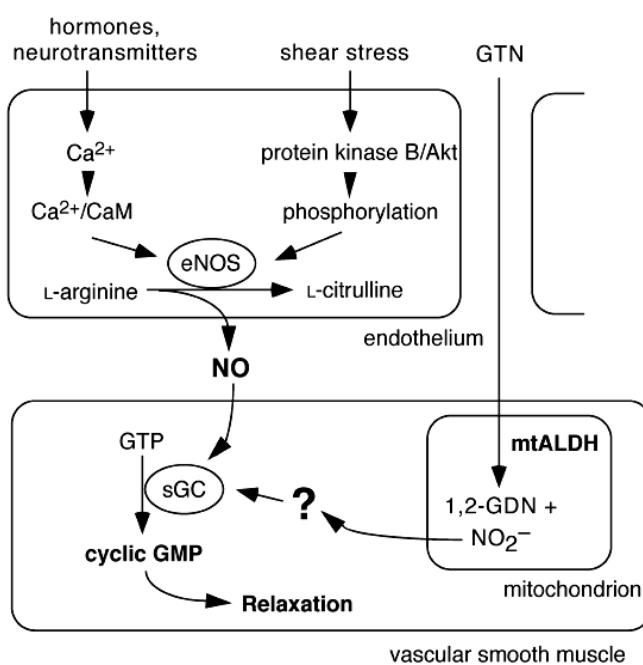
Les nitrates organiques sont des esters d'alcools mono- ou polyhydroxylés. Utilisés depuis plus d'un siècle pour soulager très rapidement les symptômes d'une ischémie ou d'une insuffisance myocardique aiguë, ils représentent les plus anciens donneurs de NO utilisés en thérapeutique. Parmi eux, on peut citer le trinitrate de glycéryle ou trinitrine, le tétranitrate de

pentaérythrytyle, le dinitrate d'isosorbide et le 5-mononitrate d'isosorbide. Il a été montré que certains de ces composés, comme le tétranitrate de pentaérythrytyle, sont capables après traitement chronique de réduire la progression des lésions et la dysfonction endothéliale dans un modèle animal d'athérosclérose liée à un régime hypercholestérolémique (Hacker et al., 2001).

### III.1.1.2.1. Biotransformation des nitrates organiques

La capacité des nitrates organiques à activer la guanylyl cyclase cytosolique et à éléver la concentration tissulaire en GMPc a été mise en évidence par les travaux de Ferid Murad (Katsuki et al., 1977). Récemment, l'implication du radical libre NO dans l'activation de la guanylyl cyclase et l'effet relaxant exercés par de faibles concentrations de trinitrine a été cependant remise en question (Kleschyov et al., 2003). Quoiqu'il en soit, un processus de biotransformation enzymatique semble être nécessaire à l'activité biologique des nitrates organiques. Plusieurs familles d'enzymes semblent être impliquées, comme la glutathion-transférase et les cytochromes P-450 (Bennett et al., 1994; Braun et al., 1995). Cependant, les études utilisant des inhibiteurs dits sélectifs de ces différents systèmes enzymatiques n'ont pas pu réellement démontrer leur implication dans l'effet relaxant de faibles concentrations de nitrates organiques. Des travaux récents ont mis en évidence le rôle de l'aldéhyde déshydrogénase

mitochondriale (ALDH2) dans la biotransformation des nitrates organiques, *in vitro* (Chen et al., 2002) et *in vivo* (Zhang et al., 2004). Il apparaît que cette enzyme est impliquée dans l'effet des nitrates organiques les plus puissants (trinitrine, tétranitrate de pentaérythrytyle) mais pas dans celui d'autres composés moins puissants (dinitrate d'isosorbide, 5-mononitrate d'isosorbide) (Daiber et al., 2004). L'activité de l'ALDH-2 nécessite la présence de thiols réducteurs comme cofacteurs (Chen et al., 2002). Le nitrite produit lors de cette réaction est vraisemblablement transformé en NO<sup>•</sup> au niveau de la mitochondrie, par un mécanisme encore inconnu.



**Figure 8 :** Représentation schématique des principales voies impliquées dans la relaxation vasculaire induite par le NO endothérial et par la trinitrine. *Abbréviations :* sCC : guanylyl cyclase cytosolique ; mtALDH : aldehyde deshydrogenase mitochondriale ; GTN : trinitrine (glyceryl trinitrate) ; 1,2-GDN : glycercyl dinitrate (Mayer, 2003).

### **III.1.1.2.2. Mécanismes de tolérance**

Malgré des effets bénéfiques incontestables après administration aiguë, l'utilisation au long cours des nitrates organiques est limitée par une diminution de l'effet vasodilatateur, phénomène communément appelé 'tolérance'. Ce phénomène est plus marqué avec la trinitrine qu'avec le dinitrate d'isosorbide. Les mécanismes impliqués dans le phénomène de tolérance à la trinitrine sont complexes, et impliquent en partie des réponses systémiques d'origine neuro-humorale capables de contrebalancer les effets hémodynamiques de la trinitrine (Parker et al., 1991). Cependant, le fait de pourvoir observer une tolérance *in vitro*, sur des vaisseaux isolés pourvus ou dépourvus d'endothélium préalablement exposés à la trinitrine, montre l'implication de mécanismes purement vasculaires.

La déplétion en groupements sulfhydryls a été initialement proposée comme mécanisme responsable de la tolérance. Elle pourrait être responsable d'une diminution de la biotransformation de la trinitrine (Needleman et Johnson, 1973). Cependant, cette hypothèse a beaucoup été controversée (Fung and Bauer, 1994). L'une des principales objections formulées en son encontre est que la mesure des groupements thiols lors de nombreuses études n'est pas corrélée au degré de tolérance observée tant *in vivo* qu'*in vitro* (Gruetter and Lemke, 1985; Boesgaard et al., 1994; Haj-Yehia and Benet, 1996). Une autre objection est que les thiols ont des effets propres, indépendamment de la formation de NO à partir des nitrates.

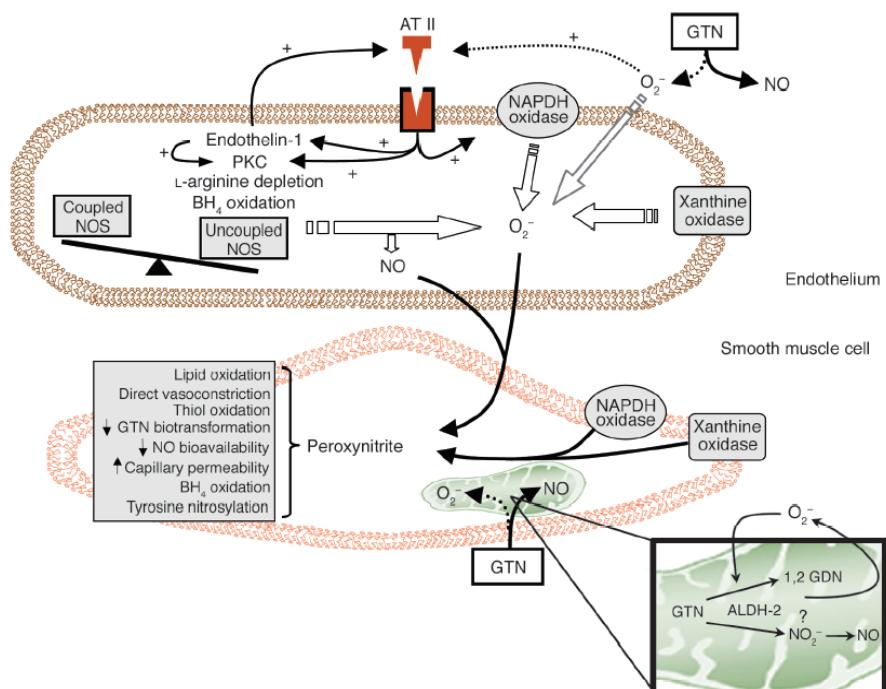
organiques. En effet, des travaux ont montré que la trinitrine et les thiols, en interagissant au niveau extracellulaire, peuvent former des S-nitrosothiols capables d'élever directement le GMPC intracellulaire (Noack and Feelisch, 1991). Il a été également montré que la N-acétylcystéine était capable de potentialiser les réponses vasodilatatriques à la trinitrine avec ou sans état de tolérance (Horowitz et al., 1983; Fung et al., 1988; Levy et al., 1988). Ces différentes observations ont permis à de nombreux auteurs de conclure que les effets de la supplémentation de groupements thiols sont d'avantage dus à une potentialisation non spécifique, qu'à une amélioration de l'état de tolérance (Holtz et al., 1989). Néanmoins, même si la tolérance n'est probablement pas due à une déplétion en thiols tissulaires, une altération de la biotransformation de la trinitrine a été mise en évidence dans divers modèles, y compris chez l'Homme (Sage et al., 2000).

La démonstration du rôle des ERO dans les altérations des effets du NO endothérial (voir paragraphe II.3.) a conduit à analyser le rôle du stress oxydant dans la tolérance aux nitrates organiques. La capacité d'un traitement chronique par la trinitrine à augmenter la production d'anions superoxydes dans les cellules vasculaires a été démontrée dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Munzel et al., 1995; Dikalov et al., 1998a; Dikalov et al., 1998b; Dikalov et al., 1998c), de même que la capacité d'agents antioxydants à prévenir la tolérance dans certaines études, y compris chez l'Homme (Watanabe et al., 1997; Bassenge et al., 1998; Dikalov et al., 1999).

Une NADPH oxydase endothéliale et la NOS 3 découplée ont été identifiées comme sources d'anions superoxydes après traitement chronique par la trinitrine (Munzel et al., 1996; Munzel et al., 2000a; Gori and Parker, 2002). Selon ces données, la tolérance serait liée à une diminution de la biodisponibilité du NO formé à partir des nitrates organiques, induite par un excès d'anions superoxydes probablement d'origine endothéliale.

La découverte du rôle de l'ALDH2 dans le processus de biotransformation des nitrates organiques a conduit à analyser son implication dans le phénomène de tolérance. La tolérance *in vitro* semble être associée à un dysfonctionnement de cette enzyme mitochondriale, conduisant à une diminution de l'effet vasorelaxant de la trinitrine (Chen et al., 2002). De même, un traitement continu *in vivo* à la trinitrine est associé à une diminution de la biotransformation de la trinitrine par l'ALDH2 mitochondriale (Sydow et al., 2004). De plus, cette altération est associée à une augmentation de la production d'ERO par les mitochondries (Sydow et al., 2004). L'efficacité d'antioxydants à réduire la production mitochondriale d'ERO et à restaurer l'activité ALDH2 suggère un rôle inhibiteur des ERO d'origine mitochondriale sur l'ALDH2, par oxydation des groupements thiols de son site catalytique par exemple (Sydow et al., 2004). Ce mécanisme, associé à une augmentation de la production endothéliale d'anions superoxydes consécutive à l'activation du système rénine/angiotensine, pourrait rendre compte de la tolérance *in vivo* [figure 9 ; (Parker, 2004)]. Dans les modèles *in vivo*

d'induction de tolérance à la trinitrine, la production endothéiale d'anions superoxydes pourrait être responsable d'une tolérance croisée avec les agents relaxants endothéum-dépendants (Munzel et al., 2000a). Tant au niveau expérimental que clinique, il existe un lien entre tolérance aux nitrates organiques et installation d'une dysfonction endothéiale (Warnholtz et al., 2002; Fayers et al., 2003; Leopold and Loscalzo, 2003).



**Figure 9 :** Représentation schématique des voies impliquées dans le développement de la tolérance à la trinitrine (Parker, 2004).

Dans les vaisseaux tolérants, d'autres types d'altérations ont été rapportés au niveau de la voie NO/GMPc. Le traitement continu à la trinitrine conduit par exemple à une augmentation de l'expression et de l'activité de la phosphodiesterase 1A1 (De Garavilla et al., 1996; Kim et al., 2001). Après un

traitement chronique par la trinitrine, des altérations ont également été rapportées au niveau de la guanylyl cyclase cytosolique [désensibilisation, (Molina et al., 1987) ; augmentation d'expression des sous-unités  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  (Mulsch et al., 2001)] et de la protéine kinase G de type I [(diminution de l'activité mais non de l'expression (Mulsch et al., 2001)]. Certaines de ces altérations pourraient être responsable de la diminution de l'effet d'autres agents relaxant NO et GMPC-dépendants (tolérance croisée).

### III.1.1.3. Sydnonimines

Les sydnonimines sont des composés hétérocycliques initialement utilisés dans le traitement de l'angine de poitrine. Les plus étudiées sont la molsidomine (*N*-ethoxycarbonyl-3-morpholinosydnonimine) et le SIN-1 (3-morpholino-sydnonimine). La molsidomine présente une faible activité vasodilatatrice, alors que le SIN-1 est beaucoup plus puissant. La molsidomine est en fait une prodrogue qui doit être convertie par les estérases hépatiques pour former le SIN-1, le métabolite actif (Feelisch et al., 1989). En présence d'oxygène moléculaire, le SIN-1 est oxydé en *N*-morpholino-aminoacetonitrile qui lui-même produit simultanément NO et  $O_2^-$ . Comme la réaction entre ces deux espèces radicalaires peut conduire à la formation de  $ONOO^-$ , le SIN-1 est plutôt considéré actuellement comme un donneur de  $ONOO^-$  (Hermann et al., 1999). Il a été démontré par exemple que c'est par la formation de  $ONOO^-$  que le SIN-1 induit la peroxydation de lipides (Hogg et al., 1992).

### III.1.1.4. Diazeniumdiolates (NONOates)

Les NONOates sont des composés synthétisés par l'exposition d'agents nucléophiles ( $X^-$ ; normalement une amine) au NO. Un « dimère de NO » est relié via un atome d'azote, ce qui donne leur structure générale  $X-[N(O)NO]^-$  (Morley and Keefer, 1993 ; Feelisch, 1998). Les NONOates se décomposent spontanément en NO en solution, sans subir de biotransformations. Par contre, leur vitesse de décomposition dépend extrêmement de l'agent nucléophile relié, de la température et du pH (Keefer et al., 2001). Ce fait rend possible la prévision de l'efficacité et de la durée de leurs effets biologiques. Sur la base de ces caractéristiques, il a été synthétisé toute une gamme de composés présentant des vitesses de décomposition différentes, ce qui permet de choisir le composé selon l'effet désiré, d'une durée qui varie de quelques secondes à des heures d'activité biologique (Megson and Webb, 2002). Les NONOates semblent exercer la majorité de leurs effets biologiques par activation de la guanylyl cyclase cytosolique. Dans certaines expériences cependant, leurs effets se sont montrés qualitativement dépendants de la vitesse de libération du NO, probablement du fait de la concentration de NO atteinte dans les cellules.

### **III.1.1.5. Composés porteurs d'un groupement C=NOH**

Le groupement C=NOH de divers composés est susceptible d'être oxydé en oxydes d'azote, dont NO lui-même. Ce type de biotransformation a été décrit initialement pour la N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine, l'intermédiaire dans la réaction catalysée par la NOS (Stuehr et al., 1991; Klatt et al., 1993). Il a été montré que la transformation de la N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine en oxyde d'azote peut être catalysée non seulement par la NOS, mais aussi par d'autres hémoprotéines comme des peroxydases (Boucher et al., 1992a) et les cytochromes P450 (Boucher et al., 1992b). Ces dernières assurent également la conversion en oxydes d'azotes d'autres composés porteurs d'un groupement C=NOH (N-hydroxyguanidines, amidoximes, kétoximes) : [pour revue : (Mansuy and Boucher, 2002)].

Dans les vaisseaux, il a été montré au laboratoire que la N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine et d'autres composés porteurs d'un groupement C=NOH induisent une relaxation sur des anneaux d'aorte isolée, dépourvus d'endothélium (Vetrovsky et al., 2002; Chalupsky et al., 2004). Cet effet relaxant est du à la libération de NO (ou d'un composé apparenté) par des voies indépendantes des NOS et qui se sont révélées insensibles aux inhibiteurs classiques de cytochromes P450 (Vetrovsky et al., 2002; Chalupsky et al., 2004). Il a aussi été montré que la conversion en NO des dérivés de type oximes est assurée par des voies distinctes de celles des nitrates organiques (Chalupsky et al., 2004).

La possibilité d'obtenir une formation de NO par des voies indépendantes de l'endothélium et des NOS est particulièrement intéressante dans des situations de dysfonctions endothéliales.

### III.1.1.6. Complexes inorganiques Metal-NO

Le complexe de fer le plus étudié à ce jour est le nitroprussiate de sodium (SNP, ou pentacyanonitrosyl ferrate (II) de sodium). Il s'agit d'un complexe inorganique où le fer est sous forme ferreux et est lié au NO (lequel est sous forme  $\text{NO}^+$ ). Malgré de nombreuses études sur la réactivité chimique du SNP (en particulier avec des thiols), le(s) mécanisme(s) de libération du NO reste(nt) mal connu(s). Cependant, il est bien établi que la libération du NO à partir du SNP requiert une irradiation lumineuse ou une réduction du type un-electron. Dans les systèmes biologiques, le SNP peut libérer NO par des mécanismes enzymatiques ou non-enzymatiques. Il a été proposé par plusieurs auteurs qu'une enzyme membranaire serait impliquée dans la dégradation du SNP. Cette enzyme nécessite du NADH ou NADPH comme co-facteur (Mohazzab et al., 1999). Par l'attaque des ions thiolates, le SNP peut se décomposer en NO et cyanure ( $\text{CN}^-$ ), avec la formation de disulfure (RSSR). Le  $\text{CN}^-$  produit lors de la décomposition du SNP peut s'accumuler dans l'organisme lors d'un usage de longue durée et induire des effets toxiques. Pour cela, l'usage clinique du SNP est relativement limité (Feelisch, 1998<sup>Ê</sup>;

Wang et al., 2002a). En raison du caractère NO<sup>+</sup> du NO coordonné à l'atome de fer du SNP, il peut réagir avec des thiols pour former des RSNO.

### III.1.1.7. S-nitrosothiols

Les S-nitrosothiols (RSNO) sont des composés susceptibles d'être formés de manière endogène dans la circulation et les tissus. C'est le cas de la S-nitrosocystéine (Scharfstein et al., 1994; Richardson and Benjamin, 2002), du S-nitrosoglutathion (Gaston et al., 1993), de la S-nitrosoalbumine (Stamler et al., 1992; Jourd'heuil et al., 2000) et de la S-nitrosohémoglobine (Jia et al., 1996; Jourd'heuil et al., 2000). Les RSNO de faible poids moléculaire présentent une stabilité moindre que celle des S-nitrosoprotéines. Il a été démontré que les RSNO peuvent être décomposés de manière homolytique produisant le radical thiyl (RS•) et le NO radicalaire. Cependant, cette réaction semble ne pas avoir lieu dans des systèmes biologiques à pH physiologique (Mathews and Kerr, 1993). Les RSNO peuvent être aussi décomposés par clivage hétérolytique catalysé par des ions métalliques, produisant NO<sup>+</sup> ou NO<sup>-</sup>. Ce mécanisme, plus efficace pour la libération du NO, semble prédominer dans les milieux biologiques (Singh et al., 1996; Al-Sa'doni et al., 1997; Stamler and Toone, 2002; Vanin et al., 2002). L'intermédiaire NO<sup>+</sup> est susceptible d'être rapidement transféré sur d'autres résidus cystéines, par transnitrosation. Les RSNO et en particulier le S-nitrosoglutathion (GSNO), peuvent également être décomposés par diverses enzymes, notamment par la thioredoxine

réductase (Nikitovic and Holmgren, 1996), la xanthine oxydase (Trujillo et al., 1998), l'alcool déshydrogénase (Jensen et al., 1998) ou la formaldéhyde déhydrogénase (Liu et al., 2001). De plus, il n'est pas clairement établi que la production de NO, lorsqu'elle a lieu, résulte de l'activité enzymatique ou de la transformation du NO par les métaux de transition inclus dans les métalloprotéines (Gordge et al., 1996). Le rôle de composants tissulaires de type enzymatique dans la libération de NO à partir des RSNO est suggéré par le fait que certaines activités pharmacologiques des RSNO ne sont pas corrélées avec leur liposolubilité, leur charge, leur stabilité en solution ni avec la quantité de NO libérée en solution (Feelisch, 1998).

### III.1.1.8. Complexes fer-dinitrosyls

Comme les RSNO, les DNIC sont des composés qui peuvent être formés dans les milieux biologiques (Vanin, 1998). Les DNIC les plus étudiés comme 'donneurs de NO' sont les complexes de faible poids moléculaire liés à la cystéine (DNIC-CYS) et liés au glutathion (DNIC-GSH). Ces DNIC sont relativement instables, et leur vitesse de décomposition semble varier en fonction du thiol lié (Vanin et al., 1996). Les DNIC peuvent libérer NO sous forme radicalaire et ainsi exercer des effets liés à l'activation de la guanylyl-cyclase soluble (Mulsch et al., 1991). Ce mécanisme rend probablement compte des propriétés inhibitrices de l'agrégation plaquettaire, vasodilatatrice et hypotensive des DNIC de faible poids moléculaire.

(Manukhina et al., 1998 ; Muller et al., 1998 ; Mulsch, 1994; Vanin, 1991 ). Les DNIC sont au même titre que les RSNO (et le SNP) des agents S-nitrosant (Boese et al., 1995), probablement du fait du caractère NO<sup>+</sup> du groupement NO lié à l'atome de fer des DNIC. Enfin, en plus de libérer NO sous forme radicalaire et de transférer NO<sup>+</sup>, les DNIC peuvent également transférer le groupement Fe(NO)<sub>2</sub> sur d'autres cibles présentant des groupements thiols (Mulsch, 1994; Vanin and Kleschyov, 1998).

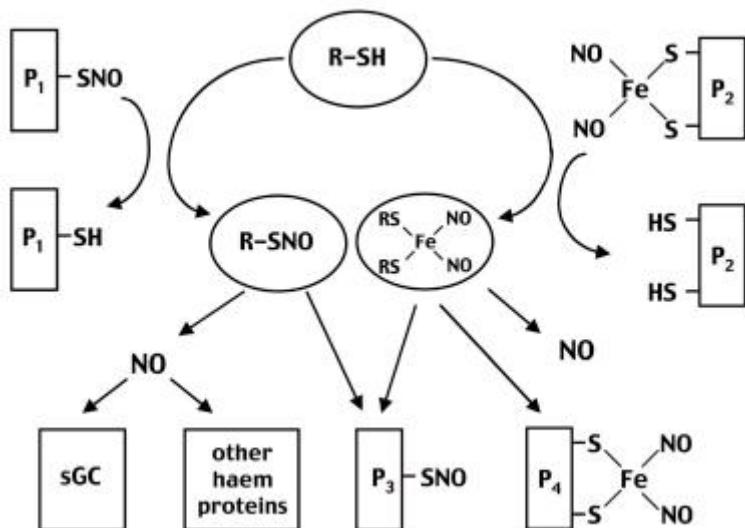
### **III.1.2. Formation de stocks mobilisables de NO**

Malgré des structures chimiques très diverses et des processus très différents de formation de NO, tous ces composés induisent un effet relaxant immédiat lorsqu'ils sont appliqués sur des artères isolées. Cet effet vasorelaxant est généralement considéré comme étant dû à la libération de NO radicalaire et à l'activation consécutive de la voie GMPc. Cependant, tous les effets des donneurs de NO ne peuvent être expliqués par la libération de NO et d'autres mécanismes participent probablement à leurs effets.

Dans les vaisseaux, des composés comme le SNP, certains RSNO et DNIC sont capables d'induire une diminution persistante de la réponse à des agonistes vasoconstricteurs sur des artères isolées dépourvues d'endothélium (Kanagy et al., 1996; Terluk et al., 2000). Très récemment, il a aussi été démontré chez des lapins soumis à une angioplastie expérimentale, qu'un RSNO (S-nitroso-N-valerylpénicillamine) induit une diminution persistante de

l'adhésion plaquettaire sélectivement au niveau du segment soumis à angioplastie, avec un effet négligeable sur la pression artérielle (Miller et al., 2003). Il est peu probable que ces effets persistants soient dus à la simple libération de NO radicalaire, activant de façon réversible la guanylyl cyclase cytosolique.

Les travaux menés récemment dans le laboratoire sur la contraction d'artères dépourvues d'endothélium ont permis de distinguer deux catégories de 'donneurs de NO'. La première comprend la trinitrine, le SIN-1, le DEA-NO, la S-nitrosocystéine (CysNO) et les complexes fer-dinitrosyls liés à la cystéine (DNIC-CYS). Ces composés exercent une effet relaxant immédiat (lié à l'activation de la guanylyl-cyclase par le NO) et réversible. La seconde catégorie comprend le SNP, le GSNO, la S-nitroso-N-acétylpénicillamine (SNAP), la S-nitroso-N-acétylcystéine (SNAC) et les complexes fer-dinitrosyls liés au glutathion (DNIC-GSH). Ces agents exercent un effet relaxant qui persiste même après élimination des composés. Cet effet est associé à une augmentation persistante du contenu vasculaire en NO et en résidus CysNO (déterminé à l'aide d'un anticorps reconnaissant ces épitopes). Il peut être amplifié de façon transitoire par ajout de chlorure de mercure (qui est capable de cliver la liaison CysNO (Saville, 1958) ou de thiols de faible poids moléculaire comme la N-Acétylcystéine. Ces derniers sont capables de déplacer NO de S-nitrosoprotéines ou de DNIC liés aux protéines. (Mulsch et al., 1991 ; Scharfstein et al., 1994 ; Vanin, 1998; Vanin and Kleschyov, 1998).



**Figure 10:** Représentation schématique des effets de thiols de faible poids moléculaire (R-SH) sur des protéines S-nitrosées et sur des complexes fer-dinitrosyls liés à des protéines (d'après Stoclet et al., *Exp. Opin. Invest. Drugs* 1998 ; 7 : 1769-1779, Muller et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002 : 962 : 131-139). sGC : guanylyl cyclase soluble

Ainsi, les effets persistants de donneurs de NO ‘S-nitrosants’ (c'est à dire ceux capables de transférer NO sur des résidus cystéines libres) sur le tonus vasculaire pourraient être dus à la formation de stocks de NO sous forme de RSNO dans les vaisseaux. La libération de NO à partir de ces stocks peut être continue, ou stimulée par l'ajout de thiols de faible poids moléculaire comme la NAC. De tels stocks de NO pourraient également contribuer à l'hyporéactivité induite par l'activité de la NOS inducible exprimé au niveau de l'adventice vasculaire (Muller et al., 1996; Muller et al., 1998; Kleschyov et al., 2000b).

## **III.2. Les antioxydants naturels et les composés polyphénoliques du vin rouge**

### III.2.1. Effets des antioxydants sur le système cardiovasculaire

Différentes interventions thérapeutiques à visée 'antioxydantes' ont été envisagées et évaluées en clinique dans le but d'améliorer la fonction endothéliale et l'évolution de certaines pathologies touchant le système vasculaire. Elles incluent des statines, des inhibiteurs d'enzyme de conversion, des antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub> à l'angiotensine II, mais aussi des antioxydants naturels comme la vitamine C, la vitamine E, des flavonoïdes provenant de jus de raisin et la supplémentation en BH<sub>4</sub> (Woodman, 2001).

Au moins deux types de traitements, largement utilisés dans la prise en charge de pathologies vasculaires et dont les effets bénéfiques en terme de morbidité/mortalité cardiovasculaires sont largement reconnus, se sont montrés capables de limiter la production de radicaux libres oxygénés au niveau vasculaire : les statines d'une part, les IEC et antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub>, d'autre part (Hornig, 2002; Ignarro et al., 2002). Les statines se sont révélées être capables d'inhiber l'activité de la petite protéine G Rac-1, composant essentiel de la NADPH oxydase, source vasculaire de radicaux libres (Wassmann et al., 2002). L'inhibition de la synthèse de l'Ang II ou de ces récepteurs AT<sub>1</sub> conduit également à une baisse importante de la production d'anions superoxydes (Rajagopalan and Harrison, 1996; Rajagopalan et al.,

1996; Hornig et al., 1998a; Goto et al., 2000; Enseleit et al., 2001). Ainsi, même si les statines, les IEC et les antagonistes des récepteurs AT1 présentent des activités antioxydantes, ces effets ne reposent pas sur une élimination directe des radicaux libres et font aussi intervenir des mécanismes additionnels indépendants de l'endothélium. Il serait alors difficile de conclure que les effets bénéfiques observés à long-terme sur la morbidité et la mortalité cardiovasculaire avec les statines ou les IEC soient dus à leurs propriétés antioxydantes ou à une amélioration directe de la fonction endothéliale.

Il a été montré que la dysfonction endothéliale pouvait être corrigée par l'administration d'antioxydants ne présentant entre eux aucune homologie de structure chimique, tels que la superoxyde dismutase (Mugge et al., 1991), le probucol (Inoue et al., 1998; Merchan Herrera et al., 1999; Jiang et al., 2002), la vitamine C (Heitzer et al., 1996; Hornig et al., 1998b; Ceriello et al., 1999; Frei, 1999; Ulker et al., 2003) et le glutathion (Prasad et al., 1999). Les résultats de nombreuses études cliniques, en particulier l'étude HOPE, *Heart outcomes Prevention Evaluation* (Yusuf et al., 2000) ont montré que la vitamine E n'exerçait aucun effet bénéfique chez des patients à haut risque cardiovasculaire. Il en est de même de l'étude GISSI (Hopper et al., 1999) qui a montré que, contrairement aux acides gras polyinsaturés n-3 (encore appelés omega-3), la vitamine E ne diminue pas de façon significative la fréquence des événements cardiovasculaires chez des patients ayant survécu à un infarctus du myocarde. Ces résultats décevants

devraient conduire à reconsidérer l'utilisation des vitamines antioxydantes, en particulier la vitamine E, dans le développement des pathologies vasculaires. Cependant d'autres études ont rapporté qu'une des limites de l'efficacité de ces composés est liée à leur faible biodisponibilité suite à une administration orale ou à des problèmes de compartimentalisation. En effet, la vitamine E, du fait de sa liposolubilité, peut se concentrer dans les lipides membranaires et les lipoprotéines et ne pas présenter d'actions antioxydantes sur des processus se déroulant dans les milieux extracellulaires et cytosoliques. Une autre limite des vitamines antioxydantes est leur capacité à produire des radicaux libres après avoir réagit avec des molécules réactives. La vitamine E est capable de produire un radical tocophéroxyle et dans le cas de la vitamine C, un radical ascorbyle peut être produit (Carr et al., 2000). Ces radicaux peuvent entraîner la peroxydation des lipides et présenter des effets cytotoxiques (Cai and Harrison, 2000). Dans la mesure où jusqu'aujourd'hui les résultats obtenus avec les différentes classes de composés antioxydants ne sont pas vraiment satisfaisants, la réalisation d'études complémentaires avec d'autres composés demeure justifiée.

### III.2.2. Les polyphénols du vin rouge

Les polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et sont particulièrement abondants au niveau des fruits et légumes. De nombreuses études sont en faveur d'un impact positif de leur consommation sur la santé. En effet, les polyphénols pourraient permettre de

prévenir de nombreuses pathologies comme les cancers (Yang and Wang, 1993; Ahmad and Mukhtar, 1999; Brown, 1999; Mukhtar and Ahmad, 2000; Lambert and Yang, 2003), les maladies dégénératives et cardio-vasculaires (German and Walzem, 2000). Un encouragement à la consommation de fruits et légumes constitue désormais une des principales recommandations en santé publique. Parmi les antioxydants végétaux, les polyphénols apparaissent parmi les plus efficaces quant à leurs effets protecteurs dans l'organisme.

### **III.2.2.1. Nature chimique**

La classe des polyphénols végétaux comprend plus de 8000 composés : des flavonoïdes ; des tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes et des lignanes ou phyto-oestrogènes. Plus de la moitié des polyphénols sont composés par les flavonoïdes, également abondants au niveau du vin rouge, dont les effets protecteurs au niveau du système cardiovasculaire, aussi bien leurs propriétés anticancéreuses, antivirales ou antiallergiques ont été rapportées au cours de nombreuses expérimentations (Middleton et al., 2000). Six grandes classes de flavonoïdes peuvent être mentionnées :

- les flavanols : Catéchine
- les flavonols : Quercétine, kaempférol, Myricétine, Fisétine, Morine
- les flavanones : Naringénine, Naringine, Hespérétine, Hespérédine

- les flavones : Apigénine, Diosmine, Lutéoline
- les chalcones : Phlorétine, Phloridzine
- Les anthocyanidines : Cyanidine, Pélargonidine

### **III.2.2.2. Effets vasculaires des polyphénols du vin rouge**

De nombreuses études épidémiologiques ont montré une corrélation inverse entre risque cardiovasculaire et consommation des composés polyphénoliques d'origine naturelle. Ainsi, il a été proposé que la faible incidence du risque coronarien observée en France pourrait être due aux propriétés bénéfiques des composés polyphénoliques présents dans le vin rouge, phénomène encore connu sous le nom de "Paradoxe français" (Renaud and Gueguen, 1998; Renaud et al., 1998; Rimm et al., 1999; Gronbaek et al., 2000; Zenebe and Pechanova, 2002).

Les mécanismes des effets protecteurs du vin rouge sur les maladies coronariennes ne sont que partiellement élucidés (Chataigneau et al., 2003). Ces effets protecteurs pourraient s'expliquer, en partie, par le fait que le vin rouge est capable de ralentir la progression du processus d'athérosclérose. Il est en effet capable de s'opposer au passage d'un stade de lésions précoces, comme on peut l'observer dans les artères coronaires à l'âge infantile, à un stade de plaques évoluées, promptes à se rompre et entraînant la formation instantanée d'un thrombus mural aboutissant à une ischémie tissulaire. La consommation de vin rouge et de composées polyphénoliques du vin s'oppose à la progression des lésions dans des

modèles expérimentaux d'athérosclérose mais semble ne pas pouvoir agir contre l'athérosclérose « installée ». Ces effets protecteurs peuvent être attribuées à la composante polyphénolique du vin rouge, puisque les produits dérivés non alcoolisés de raisin et des composés polyphénoliques du vin tels que la quercétine et la catéchine préviennent eux aussi la progression des lésions d'athérosclérose (Hayek et al., 1997; da Luz et al., 1999; Bentzon et al., 2001).

Les effets protecteurs du vin pourraient être attribués, au moins en partie, à leur capacité d'améliorer le profil lipidique, à inhiber l'activation plaquettaire (Beretz et al., 1982), et à empêcher l'expression de molécules pro-athérosclérotiques comme le *monocyte chemoattractant protein-1*, le *vascular cell adhesion molecule-1* et le *vascular endothelial growth factor* (Stoclet, 2001; Dell'Agli et al., 2004; Stoclet et al., 2004). De nombreux travaux au sein du laboratoire ont permis d'étudier les effets directs des polyphénols du vin rouge sur les vaisseaux et les cellules vasculaires [pour revue : (Stoclet et al., 2004)]. Les polyphénols du vin rouge ont des propriétés anti-angiogéniques, anti-athérosclérotiques (Oak et al., 2003; Oak et al., 2004) et vasorelaxantes. Cette dernière propriété implique la production par les cellules endothéliales de NO (Andriambeloson et al., 1997; Stoclet et al., 1999a) et d'un facteur hyperpolarisant de type EDHF (Ndiaye et al., 2003; Ndiaye et al., 2004b). Un mécanisme d'activation de la NOS 3 par les polyphénols du vin rouge a récemment été démontré. Il est indépendante du calcium et fait intervenir la voie phosphoinositide-3 kinase (PI3-Kinase)/Akt

aboutissant à la phosphorylation de la NOS sur le résidu sérine 1177. Cette voie PI3-Kinase/Akt est impliquée dans l'activation de la NOS 3 en réponse aux forces de cisaillement qu'exercent le flux sanguin sur la surface lumineuse des cellules endothéliales (Dimmeler et al., 1999) et aussi en réponse aux oestrogènes et à certains facteurs de croissance tels que le *vascular endothelial growth factor*. Récemment, il a été montré que dans les cellules endothéliales d'artère coronaire de porc, les composants polyphénoliques du vin induisent une phosphorylation rapide de Akt et de la NOS 3 (Ndiaye et al., 2004b). En plus des effets résultant de l'augmentation de l'activité de la NOS, certains polyphénols contenus dans le vin sont également capables d'augmenter la production de NO par stimulation de l'expression de l'enzyme (Leikert et al., 2002; Wallerath et al., 2002; Wallerath et al., 2003).

Les effets protecteurs du vin pourraient également être liés aux propriétés antioxydantes des polyphénols, qui seraient susceptibles d'augmenter la biodisponibilité du NO endothérial en empêchant sa dégradation par les ERO. Les vins rouges ont la plus grande capacité anti-oxydante (Lopez-Velez, Martinez-Martinez & Del Valle-Ribes, 2003) variant, *in vitro*, de 13,8 à 25,2 mmol/L et cet effet est directement proportionnel à leur concentration en polyphénols (Landrault et al., 2001). Les propriétés antioxydantes des polyphénols s'expliquent en partie par leur aptitude à réagir directement avec les anions superoxydes, les radicaux hydroxyles et les radicaux produits par la peroxydation lipidique (Robak and Gryglewski, 1988; Nijveldt et al., 2001). Les autres effets antioxydants des polyphénols incluent

l'inhibition de la xanthine oxydase et une stimulation des systèmes antioxydants endogènes [Pour revue :(Nijveldt et al., 2001)]. Une autre source enzymatique importante d'anions superoxydes est la NADPH oxydase dont l'expression et l'activité pourrait être diminuée par les polyphénols (Seo et al., 2001; Wei et al., 2004).

De par ses différents mécanismes (effet anti-oxydant, production de facteurs comme le NO et l'EDHF, augmentation ou inhibition de l'expression de certains gènes), l'administration aigüe ou chronique de polyphénols du vin est susceptible d'exercer des effets protecteurs sur la paroi vasculaire. Ces mécanismes sont mis en jeu par des composés polyphénoliques de structure bien spécifique, mais les déterminants structuraux semblent être différents d'un effet à l'autre (Stoclet et al., 2004).

## **CHAPITRE 2**

# **Objectifs et Conduite du travail**

## I. OBJECTIFS

L'objectif général de ce travail de thèse est d'évaluer l'intérêt, en vue de prévenir et/ou de limiter l'évolution de pathologie vasculaire, de la modulation de la biodisponibilité du NO par la formation de stocks mobilisables de NO, ou par la consommation modérée d'un extrait polyphénolique du vin rouge.

Une première partie du travail (mémoires 1 et 2) a porté sur l'étude des conditions de formation de stocks mobilisables de NO dans la paroi vasculaire, à partir de sources exogènes.

Nous nous sommes attachés plus particulièrement à évaluer la possibilité d'induire la formation de stocks de NO dans des vaisseaux qui présentent :

- un état de tolérance aux nitrates organiques ;
- une dysfonction endothéliale (modèle d'hypertension artérielle induite par administration chronique d'Ang II).

Dans une seconde partie du travail (mémoire 3), nous avons caractérisé les effets protecteurs des polyphénols du vin dans un modèle de pathologie vasculaire associée à une dysfonction endothéliale. Nous avons plus particulièrement cherché à mettre en évidence :

- une potentialité antihypertensive des polyphénols du vin, dans le modèle d'hypertension artérielle induite par une administration chronique d'Ang II.

- La capacité de ces polyphénols à prévenir la dysfonction endothéiale dans ce modèle, sur la base de leurs effets vasodilatateurs propres et de leur pouvoir antioxydant.
- que ces effets protecteurs pourraient être liés à leur pouvoir antioxydant direct ou indirect par l'inhibition de systèmes enzymatiques impliqués dans la production d'ERO.

## **II. APPROCHES EXPERIMENTALES**

Les effets des polyphénols et la formation de stocks de NO à partir de NO exogène ont été évalués dans un modèle d'hypertension artérielle induite par une infusion chronique d'Ang II à l'aide d'une minipompe osmotique implantée par voie sous-cutanée (mémoires 2 et 3). Dans ce modèle :

- la pression artérielle systolique et la fréquence cardiaque ont été suivies par mesures non invasives par la méthode du manchon caudal (*tail-cuff method*), proche de la méthode pléthysmographique utilisée en clinique humaine. Cette mesure est effectuée au niveau de l'artère caudale sur l'animal éveillé, légèrement constraint dans une cage de contention ;
- la mesure de l'activité rénine angiotensine plasmatique a été réalisée par dosage radioimmunologique ;
- des expérimentations ex vivo de réactivité vasculaire ont été réalisées, afin d'étudier la formation de stocks de NO (cf. ci-dessous), les effets

vasorelaxants directs des composés polyphénoliques et leur capacité à améliorer les réponses relaxantes d'agonistes endothélium-dépendants (acétylcholine) ou indépendants (donneurs de NO).

La formation de stocks de NO à partir de NO exogène a également été évaluée dans un modèle de tolérance aux nitrates organiques. La tolérance a été induite par exposition *in vitro* d'anneaux d'aorte de rat dépourvus d'endothélium à de fortes concentrations de trinitrine pendant une heure (mémoires 1).

La caractérisation du stress oxydatif associé à ces deux modèles a été faite par immunohistochimie et microscopie confocale, à l'aide de la dihydroéthidine comme sonde de fluorescence.

La formation de stocks mobilisables de NO a été évaluée sur des aortes isolées, par des études de :

- réactivité vasculaire dans des chambres à organes isolés : réponse d'une part aux agonistes vasoconstricteurs et d'autre part aux thiols de faible poids moléculaire et aux ions mercuriques (capables de libérer NO à partir de S-nitrosothiols) sur des artères exposées *in vitro* à des agents donneurs de NO ;

- immunofluorescence et microscopie confocale : analyse de la formation de S-nitrosothiols dans les vaisseaux à l'aide d'anticorps dirigés contre des résidus cystéines nitrosylés.

La caractérisation du stress oxydatif associé à ces deux modèles a été faite par immunohistochimie et microscopie confocale, à l'aide de la dihydroéthidine comme sonde de fluorescence.

## **CHAPITRE 3**

### **Résultats expérimentaux**

Les principaux résultats obtenus au cours de ce travail sont présentés sous forme de manuscrits soumis ou en préparation

# Mémoire 1

**Article soumis pour publication :** *Mamadou Sarr<sup>a</sup>, Irina Lobysheva<sup>a</sup>, Aminata S. Diallo<sup>b</sup>, Jean-Claude Stoclet<sup>a</sup>, Valérie B. Schini-Kerth<sup>a</sup>, and Bernard Muller<sup>\*c</sup>* Formation of releasable NO stores by S-nitrosoglutathione in arteries exhibiting tolerance to glyceryl-trinitrate

---

Les travaux antérieurs menés dans le laboratoire avaient permis de montrer que les donneurs de NO S-nitrosants, comme le S-nitrosoglutathion, pouvaient induire une diminution persistante de la contraction sur divers types d'artères dépourvues d'endothélium, par la formation de stocks mobilisables de NO. Dans cette étude, l'objectif était d'évaluer la formation de stocks mobilisables de NO dans des vaisseaux qui présentent une tolérance à l'effet des nitrates organiques.

La tolérance a été induite en pré-exposant des anneaux d'aorte dépourvus d'endothélium à des concentrations relativement élevées de trinitrine. Dans ce modèle, nous avons ensuite évalué :

- la production de NO à partir de la trinitrine, par résonance paramagnétique électronique (RPE) en utilisant le complexe Fer-diethyldithiocarbamate comme capteur de spin ;
- le stress oxydatif, par microscopie confocale en utilisant la dihydroéthidine comme sonde de fluorescence.
- la formation de stocks mobilisables de NO après exposition au S-nitrosoglutathion (GSNO), en étudiant l'effet de la noradrénaline et de la N-acétylcysteine (NAC).

Les résultats obtenus montrent que dans ce modèle :

- la tolérance à la trinitrine est liée non pas à une tolérance à NO lui-même, mais à une diminution de la biotransformation de la trinitrine en NO. En

effet, bien que l'effet de la trinitrine soit diminué sur des aortes préalablement exposées à la trinitrine, celui d'un donneur de NO radicalaire (DEA-NO) n'est pas affecté. D'autre part, les résultats de la quantification de la production de NO par RPE montrent une réduction significative de la quantité de NO produit par la trinitrine sur des anneaux d'aorte tolérants, en comparaison aux anneaux non tolérants ;

- la tolérance à la trinitrine est associée à une augmentation de la production d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène ;
- le S-nitrosoglutathion (GSNO) peut induire la constitution de formes de stockage de NO dans des anneaux d'aortes de rat dépourvus d'endothélium et présentant une tolérance à l'effet de la trinitrine. En effet, l'exposition au GSNO d'anneaux tolérants entraîne une inhibition de la réponse contractile à la noradrénaline, associée à une réponse relaxante après ajout de NAC.

Short communication

## **Formation of releasable NO stores by S-nitrosoglutathione in arteries exhibiting tolerance to glyceryl-trinitrate**

*Mamadou Sarr<sup>a</sup>, Irina Lobysheva<sup>a</sup>, Aminata S. Diallo<sup>b</sup>, Jean-Claude Stoclet<sup>a</sup>,*

*Valérie B. Schini-Kerth<sup>a</sup>, and Bernard Muller<sup>\*c</sup>*

<sup>a</sup> *Pharmacologie & Physico-Chimie, UMR CNRS 7034, 67401 Illkirch, France*

<sup>b</sup> *Pharmacologie et Physiologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Dakar*

<sup>c</sup> *Pharmacologie, INSERM E356, 33076 Bordeaux, France*

**\*Corresponding author :** Tel.: +33 5 57 57 12 12; fax: +33 5 57 57 12 01. E-mail:  
[bernard.muller@phcodyn.u-bordeaux2.fr](mailto:bernard.muller@phcodyn.u-bordeaux2.fr)

## **Abstract**

*S*-nitrosating NO donors like *S*-nitrosoglutathione (GSNO) induce a persistent inhibition of vascular tone, through the formation of releasable NO stores. In the present study, we investigate whether GSNO also induces NO stores-related effects in vessels exhibiting tolerance to glyceryl-trinitrate (GTN). Treatment of rat aortic rings with GTN (100 µM for 1 h, followed by washout) resulted in an increase in dihydroethidium staining of superoxide and in a decrease of NO elevation and relaxation induced by subsequent addition of GTN. In GTN-treated rings as in untreated ones, pre-exposure to GSNO (1 µM for 30 min, followed by washout) induced a persistent hyporesponsiveness to noradrenaline and a relaxant response to *N*-acetylcysteine (a low molecular weight thiol which can displace NO from NO stores). These data indicate that GSNO can promote the formation of releasable NO stores in arteries exhibiting increased level of superoxide and tolerance to GTN. Formation of releasable NO stores is of potential interest to restore the protective effect of NO in organic nitrate-tolerant blood vessels.

Keywords: *N*-acetylcysteine, nitric oxide, nitric oxide stores, organic nitrates, superoxide anions, tolerance.

## **1. Introduction**

NO delivery to blood vessels from NO donating agents is of particular interest in pathologies associated with impaired production of endogenous NO. NO donors like organic nitrates require enzymatic biotransformation, and despite acute vasodilating properties, their long-term use is limited by development of tolerance (Feelisch, 1998). Reduced biotransformation by mitochondrial aldehyde deshydrogenase (ALDH-2) plays a role in tolerance to glyceryl trinitrate (GTN), and increased mitochondrial production of reactive

oxygen species (ROS) contributes to inhibition of GTN biotransformation by vascular ALDH-2 (Chen et al., 2002 ; Sydow et al., 2004).

Low molecular weight S-nitrosothiols (RSNO), unlike GTN, do not induce tolerance, and their relaxant effect is retained in GTN-tolerant arteries (Miller et al., 2000). Moreover, unlike GTN, S-nitrosoglutathione (GSNO) and other S-nitrosating agents induce a persistent hyporesponsiveness to vasoconstrictors (Megson et al., 1997; Terluck et al., 2000) which is associated with a relaxant effect of low molecular weight thiols like *N*-acetylcysteine (Alencar et al., 2003ab). Evidence was obtained by our group that formation of releasable NO stores accounts for the persistent effect of S-nitrosating agents on arterial tone (Alencar et al., 2003ab). Formation of releasable NO stores is of potential interest not only to surrogate impaired production of endogenous NO, but also in organic nitrate-tolerant vessels. Thus, in the present study, we investigate whether GSNO also induces NO stores-related long lasting effects in arteries exhibiting tolerance to GTN.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Preparation of arteries**

Endothelium-denuded aortic rings (from 11-14 weeks old male Wistar rats) were prepared and mounted in organ chambers as previously described (Alencar et al., 2003ab). Acetylcholine (1  $\mu$ M) was applied to noradrenaline (NA, 1  $\mu$ M)-precontracted rings to assess the absence of functional endothelium. Rings were then exposed to 100  $\mu$ M GTN (or its solvent) for 1 h for tolerance induction. After washout (during at least 1 h during which time the Krebs solution was replaced four times), they were processed as described below.

### **2.2. Dihydroethidium staining**

Rings were embedded and frozen as previously described (Alencar et al., 2003b). Serial sections (30  $\mu$ m-thick) were cut on a crystat microtome and

thaw mounted onto silanated glass slides. After air drying, slides were incubated (30 min at room temperature) with 2.5  $\mu$ M dihydroethidium (DHE) in phosphate-buffered saline (PBS). DHE produces red fluorescence when oxidized to ethidium bromide (EtBr) by superoxide (Mulsch et coll, 2001). After staining, sections were rinsed, air dried, mounted in Vectashield<sup>®</sup> (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA), coverslipped and examined under a Bio-Rad MRC-1024 laser scanning confocal microscope with a 60 x epifluorescence objective. Images were obtained as previously described (Alencar et al., 2003b). Emission signal was recorded with a Zeiss 573-637 nm filter.

### **2.3. NO spin-trapping and EPR spectroscopy**

The NO content was assayed after formation of EPR-detectable  $[\text{Fe(II)}\text{NO}(\text{diethyldithiocarbamate})_2]$  ( $[\text{Fe(II)}\text{NO}(\text{DETC})_2]$ ) as described by Kleyschyov et al. (2000). Rings (6 to 8 mm length) were exposed for 30 min at 37 °C to GTN (0.5 mM or its solvent) and colloid  $[\text{Fe(II)}(\text{DETC})_2]$  (0.5 mM) and then rapidly frozen in liquid nitrogen. EPR spectra were recorded as previously described (Alencar et al., 2003ab).

### **2.4. Isometric tension recordings**

GTN or 2-(N,N-diethylamino)-diazenolate-2-oxide (DEA-NO) was added cumulatively to NA (0.1  $\mu$ M)-precontracted rings. In some experiments, rings were exposed or not to GSNO for 30 min as previously described (Alencar et al., 2003ab). After washed out (for 1 h, during which time the Krebs solution was changed every 20 min) they were contracted with increasing concentrations of NA. N-acetylcysteine (NAC) was added cumulatively to NA-precontracted rings.

### **2.5. Drugs and reagents**

Drugs were purchased from Sigma Chemical Co or Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France), except GTN (LENITRAL<sup>®</sup> from Besins International), NAC

(Fluimucil<sup>®</sup>, generous gift from Zambon laboratory, Antibes, France) and DEA-NO (from Alexis Corporation, Läufelfingen, Switzerland). GSNO was prepared as previously described (Alencar et al., 2003).

### **2.6. Statistical Analysis.**

Results are expressed as mean  $\pm$  s.e. mean of n experiments. Concentration-response curves were compared by MANOVA. Other statistical comparisons were performed with one-way ANOVA. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

## **3. Results**

An increase in dihydroethidium staining was detected in segments of rat aortic rings previously exposed to GTN (100  $\mu$ M for 1 hour) (figure 1A). Ethidium bromide red fluorescence was predominantly localized in the media. GTN induced by itself an increase in NO content in aortic rings. Pre-exposure to GTN resulted in a decrease of the amplitude of NO elevation induced by subsequent addition of GTN (figure 1B).

GTN-treated rings exhibited a decrease of the relaxant effect of subsequent addition of GTN (figure 2A) but not of DEA-NO (figure 2B). In GTN-treated or untreated rings, pre-exposure to GSNO resulted in a decrease of NA contraction (figure 2C) and in a relaxant response to NAC (figure 2D). The effect of NA and NAC after exposure to GSNO was not significantly different in GTN-treated and untreated rings.

#### **4. Discussion**

The present study shows that GSNO retains its ability to induce long lasting hyporesponsiveness to NA and relaxant effect of NAC in GTN-treated aortic rings which exhibited elevation of superoxide level and impairment of GTN-induced NO elevation and relaxation.

The increase of DHE staining in GTN-treated rings was attributed to superoxide. DHE is considered as relatively specific for superoxide (Münzel et al., 2002). Moreover in GTN-treated rings, DHE staining was decreased by the cell permeant superoxide dismutase mimetics (not shown). An increase in superoxide was also demonstrated using the same probe in rat aorta after chronic *in vivo* treatment with GTN (Mülsch et al., 2001). GTN-treated rings showed altered relaxant response to GTN, but not to DEA-NO. This lack of cross-tolerance between GTN and other NO donating agents is consistent with some previous data obtained in isolated arteries (Unger et al., 1993; Hasegawa et al., 1999; Miller et al., 2000; Chen et al., 2002). The lack of alteration of the relaxant effect of DEA-NO despite elevated superoxide level in GTN-treated rings suggests that NO fluxes coming from spontaneous decomposition of DEA-NO in the bathing solution largely exceeded those of superoxide, and thus masked the influence of NO degradation by superoxide. It also indicates that, contrary to what was observed in *in vivo* model of tolerance (Mülsch et al., 2001), the cyclic GMP pathway remained unaffected in GTN-treated rings. The lack of cross-tolerance between GTN and DEA-NO also suggests that GTN biotransformation was altered in GTN-treated aortic rings, as previously proposed (Unger et al., 1993; Hasegawa et al., 1999). The lower elevation of NO induced by GTN in GTN-treated rings compared to control ones supports this possibility. According recent reports, mitochondrial ALDH-2 plays a key role in GTN biotransformation and vasorelaxant effect (Chen et al., 2002; Sydow et al., 2004). Moreover, reduced ALDH-2 activity accounts for nitrate tolerance (Chen et al., 2002).

and increased production of ROS by mitochondria contributes to inhibition of vascular ALDH-2 activity (Sydow et al., 2004).

GSNO induced an hyporesponsiveness to NA which persisted after drug removal, and a relaxant effect of NAC. Several lines of evidence indicate that these effects of GSNO (and of other S-nitrosating agents) are due to formation of NO stores by S-nitrosation of cysteine residues in aortic tissue, and to subsequent release of NO (or NO-related species) activating the cGMP pathway (Alencar et al., 2003ab). The main finding of the present study is that GSNO fully retained its ability to induce these NO stores-related changes of contraction in GTN-tolerant arteries which exhibited increased superoxide levels. This implies that in this model, elevated superoxide impaired neither the formation of NO stores, nor the effect of NO released from stores. This might be explained by differential localisation of NO stores and superoxide production. Eventhough the localisation of S-nitrosated proteins is not elucidated, indirect evidence argues for localization in the extracellular space, or at the external side of cell membranes (Alencar et al., 2003ab). As discussed above for DEA-NO, the effect of extracellularly generated NO was not affected in GTN-tolerant arteries, despite increased superoxide levels. NAC can reverse tolerance to GTN in isolated arteries (Torresi et al., 1985). It is unlikely that this property accounts for the relaxant effect of NAC seen here, since NAC did not affect tone in arteries exhibiting tolerance to GTN which were not exposed to GSNO.

In conclusion, this study shows that GSNO can promote the formation of releasable NO stores in arteries exhibiting increased level of superoxide and tolerance to GTN. Formation of releasable NO stores is an alternative way of NO delivery to blood vessels exhibiting tolerance to organic nitrates.

## **5. Acknowledgements**

This work was partially supported by a grant from Fondation de France. IL is a visitor scientist from Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Science (Moscow) and is recipient of a fellowship from the Collège Doctoral Européen.

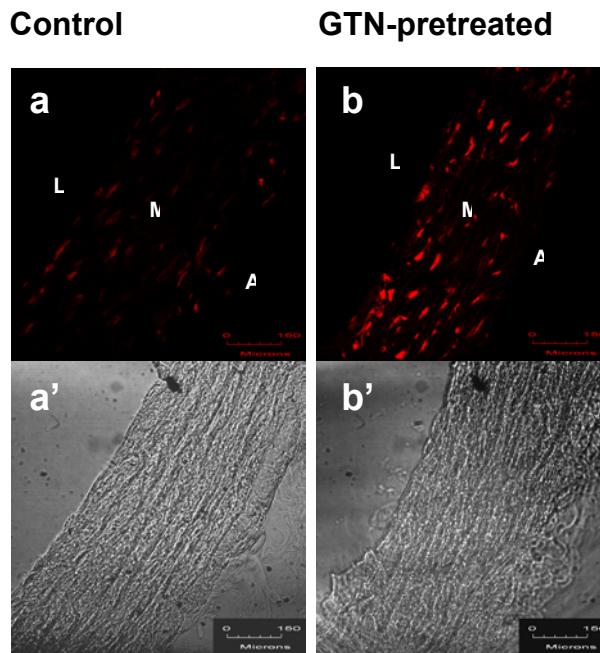
## **6. References**

- Alencar, J.L., Lobysheva, I., Chalupsky, K., Geffard, M., Nepveu, F., Stoclet, J.C., Muller, B. 2003a. S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 152-159.
- Alencar, J.L., Lobysheva, I., Geffard, M., Sarr, M., Schott, C., Schini-Kerth, V.B., Nepveu, F., Stoclet, J.C., Muller, B. 2003b. Role of S-nitrosation of cysteine residues in long-lasting inhibitory effect of nitric oxide on arterial tone. *Mol. Pharmacol.* 63, 1148-1158.
- Chen, Z., Zhang, J., Stamler, J.S. 2002. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8306-8311.
- Feelisch, M. 1998. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 358, 113-122.
- Hasegawa, K., Taniguchi, T., Takakura, K., Goto, Y., Muramatsu, I. 1999. Possible involvement of nitroglycerin converting step in nitroglycerin tolerance. *Life Sci.* 64, 2199-2206.
- Kleschyov, A.L., Mollnau, H., Oelze, M., Meinertz, T., Huang, Y., Harrison, D.G., Munzel, T. 2000. Spin trapping of vascular nitric oxide using colloid Fe(II)-diethyldithiocarbamate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 672-677.
- Megson, I.L., Greig, I.R., Gray, G.A., Webb, D.J., Butler, A.R. 1997. Prolonged effect of a novel S-nitrosated glyco-amino acid in endothelium-denuded rat femoral arteries: potential as a slow release nitric oxide donor drug. *Br. J. Pharmacol.* 122, 1617-1624.

- Miller, M.R., Roseberry, M.J., Mazzei, F.A., Butler, A.R., Webb, D.J., Megson, I.L. 2000. Novel S-nitrosothiols do not engender vascular tolerance and remain effective in glyceryltrinitrate-tolerant rat femoral arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 408, 335-343.
- Mulsch, A., Oelze, M., Kloss, S., Mollnau, H., Topfer, A., Smolenski, A., Walter, U., Stasch, J.P., Warnholtz, A., Hink, U., Meinertz, T., Munzel, T. 2001. Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation* 103, 2188-2194.
- Munzel, T., Afanas'ev, I.B., Kleschyov, A.L., Harrison, D.G. 2002. Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1761-1768.
- Sydow, K., Daiber, A., Oelze, M., Chen, Z., August, M., Wendt, M., Ullrich, V., Mulsch, A., Schulz, E., Keaney, J.F. Jr, Stamler, J.S., Munzel, T. 2004. Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *J. Clin. Invest.* 113, 482-489.
- Terluk, M.R., Da Silva-Santos, J.E., Assreuy, J. 2000. Involvement of soluble guanylate cyclase and calcium-activated potassium channels in the long-lasting hyporesponsiveness to phenylephrine induced by nitric oxide in rat aorta. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 361, 477-483.
- Torresi, J., Horowitz, J.D., Dusting, G.J. 1985. Prevention and reversal of tolerance to nitroglycerin with N-acetylcysteine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7, 777-783.
- Unger, P., Berkenboom, G., Brekine, D., Fontaine, J. 1993. Nitrate tolerance and aging in isolated rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 248, 145-149.

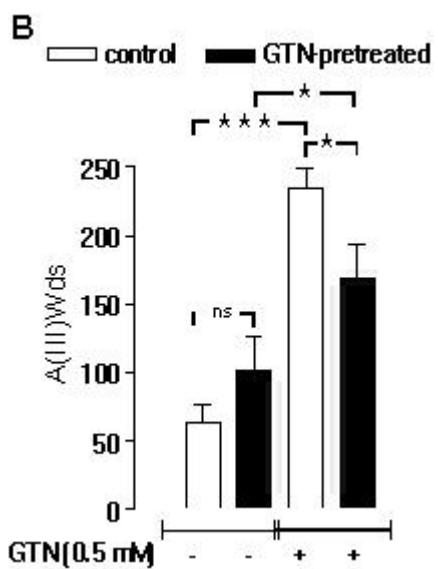
## FIGURE LEGEND

**A**



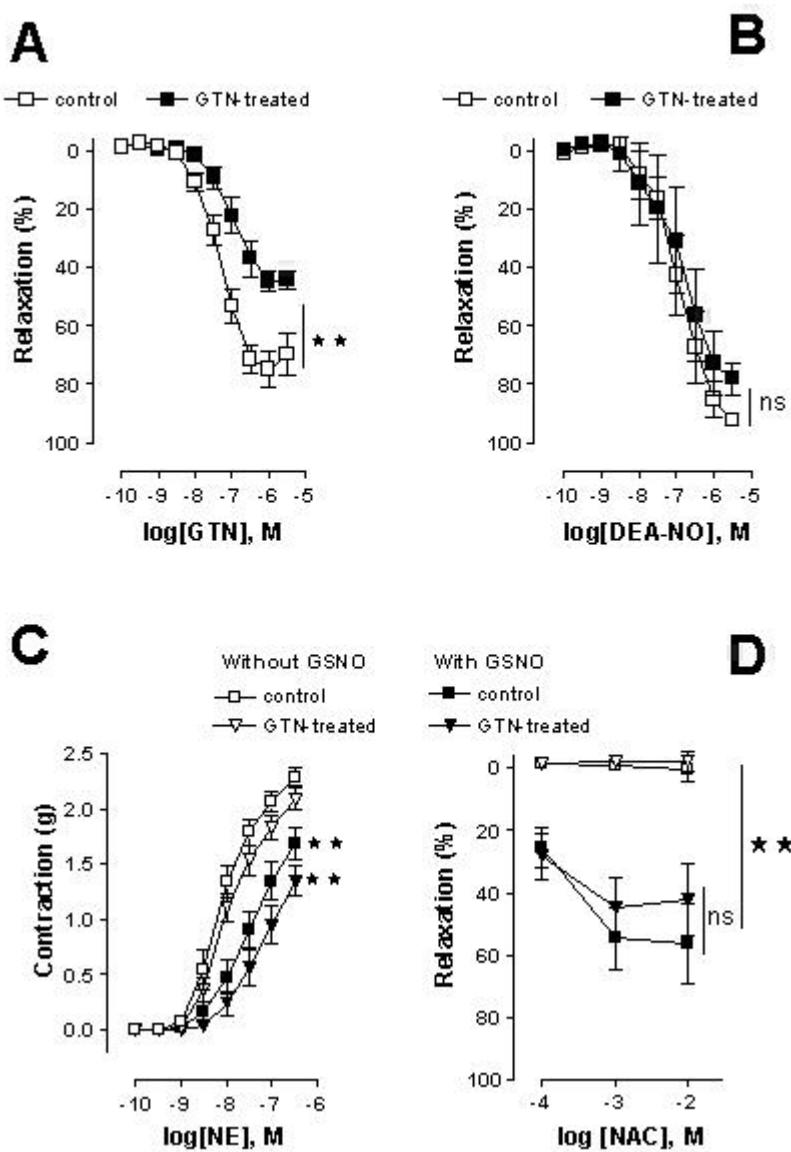
---

**Figure 1A :** Dihydroethidium staining for superoxide in (a) control and (b) GTN-treated (100  $\mu$ M for 1 hour, followed by wash-out) in endothelium denuded rat aortic segments. Respective light transmission figures are shown in a' and b'. Representative pictures from 3 independent experiments. L indicates lumen ; M, media and A, adventitia.



**Figure 1B :** Effect of GTN (0.5 mM) on NO content in endothelium-denuded rat aortic rings previously exposed or not to GTN (100  $\mu$ M for 1 hour followed by wash-out).

ns : not significant , \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  (ANOVA, n = 3-4 separate experiments).



**Figure 2 :** Relaxant effect of GTN (**A**) and DEA-NO (**B**) in endothelium-denuded rat aortic rings previously exposed or not to GTN (100  $\mu$ M for 1 hour, followed by wash-out). \*\*  $P < 0.01$  (MANOVA) compared with control ( $n = 4-5$  separate experiments). (**C**) Contractile effect of noradrenaline (NA) and (**D**) relaxant effect of N-acetylcysteine (NAC) in endothelium-denuded rat aortic rings previously exposed or not to GTN (100  $\mu$ M for 1 hour, followed by wash-out). Rings were then exposed or not to GSNO (1  $\mu$ M, 30 min, followed by wash-out) before compelling concentration-response curve to NA and NAC. \*\*  $P < 0.01$  (MANOVA) compared with the appropriate control ( $n = 6$  separate experiments).

## Mémoire 2

**Article en préparation :** Mamadou Sarr<sup>a</sup>, Marta Chataigneau<sup>a</sup>, Christa Schott<sup>a</sup>, Aminata S. Diallo<sup>b</sup>, Michel Geffard<sup>c</sup>, Jean-Claude Stoclet<sup>a</sup>, Bernard Muller \*<sup>d</sup>, Valérie B. Schini-Kerth<sup>a</sup>. Targeted and sustained effect of NO by S-nitrosation of cysteine residues in arteries exhibiting endothelial dysfunction

---

Les travaux menés dans le laboratoire ayant permis de mettre en évidence la constitution de stocks mobilisables de NO avaient été réalisés sur des artères dépourvues d'endothélium. L'objectif de ce travail était d'évaluer la formation de stocks mobilisables de NO dans des artères pourvues d'endothélium, et dans celles qui présentent une dysfonction endothéliale.

La dysfonction endothéliale a été induite par un traitement chronique *in vivo* à l'angiotensine II chez le rat, que nous avons mis en place au laboratoire. A l'issue de ce traitement, nous avons évalué sur des anneaux d'aorte pourvus ou dépourvus d'endothélium:

- l'effet relaxant endothélium-dépendant de l'acétylcholine
- l'effet relaxant endothélium-indépendant du nitroprussiate de sodium
- la formation de stocks mobilisables de NO après exposition au S-nitrosoglutathion (GSNO), en étudiant l'effet de la phénylephrine et de la N-acétylcysteine (NAC) et du chlorure de mercure ( $HgCl_2$ )
- le stress oxydatif, par microscopie confocale en utilisant la dihydroéthidine comme sonde de fluorescence.
- la formation de résidus Cys-NO, par immunofluorescence et microscopie confocale, à l'aide d'un anticorps dirigés contre ces épitopes

Les principaux résultats montrent que :

comme attendu, l'infusion chronique d'angiotensine II entraîne une hypertension systolique, une baisse importante de l'activité rénine plasmatique, une réduction de l'effet relaxant endothélium-dépendant de l'acétylcholine, mais ne modifie pas l'effet relaxant endothélium-indépendant du nitroprussiate de Na. Au niveau de l'aorte, le traitement chronique à l'angiotensine II provoque une augmentation des espèces réactives dérivées de l'oxygène dans toutes les tuniques.

sur des anneaux d'aortes de rat dépourvus d'endothélium issus soit de rats contrôles, soit de rat traités à l'angiotensine II, l'exposition ex vivo au GSNO entraîne une inhibition de la réponse contractile à la phénylephrine, associée à une réponse relaxante après ajout de NAC.

sur des anneaux d'aortes de rat pourvus d'endothélium issus de rats contrôles, l'exposition au GSNO n'entraîne pas de telles modifications.

sur des anneaux d'aortes de rat pourvus d'endothélium issus de rats traités à l'angiotensine II, le GSNO entraîne une inhibition de la réponse contractile à la phénylephrine, ainsi qu'une réponse relaxante à la NAC et au HgCl<sub>2</sub>. Sur ces anneaux, l'exposition au GSNO entraîne également une augmentation de l'immunomarquage pour les résidus Cys-NO, et celui-ci est inhibé après exposition à la NAC ou HgCl<sub>2</sub>.

**Targeted and sustained effect of NO by S-nitrosation of cysteine residues in  
arteries exhibiting endothelial dysfunction**

Mamadou Sarr<sup>a</sup>, Marta Chataigneau<sup>a</sup>, Christa Schott<sup>a</sup> Aminata S. Diallo<sup>b</sup>, Michel Geffard<sup>c</sup>, Jean-Claude Stoclet<sup>a</sup>, Bernard Muller<sup>d\*</sup>, Valérie B. Schini-Kerth<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pharmacologie & Physico-Chimie, UMR CNRS 7034, 67401 Illkirch, France

<sup>b</sup> Pharmacologie et Physiologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Dakar

<sup>c</sup> Physique des Interactions Ondes-Matières (EPHE-PIOM), 33600 Pessac, France

<sup>d</sup> Pharmacologie, INSERM E356, Université Victor Segalen, 33076 Bordeaux, France

**\*Corresponding author :** Tel.: +33 5 57 57 12 12; fax: +33 5 57 57 12 01. E-mail:  
[bernard.muller@phcodyn.u-bordeaux2.fr](mailto:bernard.muller@phcodyn.u-bordeaux2.fr)

## **Abstract**

**Objectives:** S-nitrosating nitric oxide (NO) donors like S-nitrosoglutathione (GSNO) induce a persistent inhibition of tone in endothelium-denuded arteries, through the formation of releasable NO stores on tissue thiols. The aim of the present study was to investigate whether such effects of GSNO could be obtained in arteries exhibiting endothelial dysfunction. **Methods:** Rats were sham-operated or implanted with a minipump delivering Angiotensin II (Ang II, 0.4 mg/kg/day for 14 days). Aortic rings from these rats were suspended in organ chambers for isometric tension recordings or processed for detection of reactive oxygen species (with dihydroethidium as fluorescent probe) and cysteine-NO residues (with anti-cysteine-NO antiserum). **Results:** Ang II-induced hypertension was associated with increased level of superoxide anion and with reduced relaxation to acetylcholine in the aorta. In aortic rings with endothelium from sham controls, pre-exposure to GSNO neither induced persistent inhibition of the contractile effect of phenylephrine, nor a relaxant effect upon addition of N-acetylcysteine (NAC), a low molecular weight thiol which can displace NO from NO stores. By contrast, in rings with endothelium obtained from Ang II-infused rats, GSNO induced persistent hyporeactivity to phenylephrine, and a relaxant effect of both NAC and HgCl<sub>2</sub> (which cleaves cysteine-NO bond). In these rings, GSNO induced a persistent increase in cysteine-NO residues, which was blunted both by NAC and HgCl<sub>2</sub>. **Conclusion:** Arteries presenting endothelial dysfunction and increased superoxide level, unlike control ones, exhibit after exposure to GSNO a long lasting inhibition of tone which was mediated by persistent S-nitrosation of tissue thiols. Thus, S-nitrosating NO donating agents offer the

possibility of targeted protective effects at sites of endothelial dysfunction, through the formation of releasable NO stores.

**Keywords** : angiotensin II; endothelial dysfunction; hypertension; nitric oxide; nitric oxide stores; oxygen radicals; S-nitrosoglutathione.

## 1. Introduction

Endothelium-derived nitric oxide (NO) is a major regulator of vascular homeostasis. It prevents platelet adhesion and aggregation, leucocyte adhesion, and smooth muscle proliferation and contraction [1-4]. All major risks factors predisposing to atherosclerosis, i.e. hypercholesterolemia, diabetes, smoking and hypertension, are associated with a decrease of endothelium-derived NO bioactivity. Endothelial dysfunction plays a major role in both formation and progression of atherosclerotic lesions [5-6]. Multiple evidence supports a role of oxidative stress in various models of endothelial dysfunction, in which increased vascular level of superoxide led to a decrease of endothelial NO bioavailability [6-9].

NO supplementation is a potential interesting approach for restoration of vasculoprotective effects in pathological situations in which endothelial NO bioavailability is decreased [10]. Among NO donors, organic nitrates like glyceryl trinitrate, despite acute vasodilatory effect, have the major drawback of inducing tolerance during long-term use. Increased oxidative stress likely contributes to development of nitrate tolerance and cross tolerance to endothelium-derived NO [19]. S-nitrosating agents like sodium nitroprusside or some S-nitrosothiols like S-nitrosoglutathione (GSNO) induce a relaxant effect which persisted several hours after washing out the drug in endothelium-denuded arteries [11-14,17]. Evidence was

recently obtained by our group that S-nitrosation of cysteine residues accounts for long-lasting inhibitory effect of S-nitrosating agents on the contraction of endothelium-denuded arteries, and represents a mechanism of formation of local NO stores from which biologically active NO can subsequently be released [15,17, 20].

In the present study, we investigate the formation of NO stores in arteries exhibiting endothelial dysfunction. For this purpose, rat were chronically-treated or not with Angiotensin II (Ang II). The Ang II-mediated hypertension is well known to be associated with endothelial dysfunction and increase of superoxide production in the aorta [8,21]. Aortic rings from these rats were exposed or not to GSNO and, after careful washout, were processed for immunostaining of cysteine-NO residues and for assessment of contractility. The low molecular weight thiol *N*-acetylcysteine (NAC) was used to displace NO from cysteine-NO bonds [15,17,20, 22] as well as mercuric chloride ( $HgCl_2$ , which is known to cleave the cysteine-NO bond, Saville, 1958 [23]).

## **2. Materials and Methods**

The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Agreement (number B 67900) was obtained by French authorities.

### *2.1. In vivo experiments*

Male wistar rats (12-14 weeks old) were implanted subcutaneously for 14 days with osmotic minipumps (Alzet, purchased from Charles Rivers Laboratories) after 1 cm incision and filled with either Ang II (0.4 mg/kg per day) or NaCl (0.9 %) for sham-treated rats, as previously described [24]. Systolic blood pressure and heart rate

were determined in conscious animals, at the same time every 28 consecutive days using tail cuff plethysmography connected to a computerized system (LE 5002®, BIOSEB). Fourteen days after minipumps implantation, rats were euthanized, and their thoracic aorta was removed, cleaned of connective tissue and cut in rings (3 mm length) for organ chambers experiments. In some rings, the endothelium was removed by rubbing the intimal surface of the rings with forceps. Rapidly after death, blood was taken from the abdominal aorta for the latter determination of the plasma renin activity.

### *2.2. Determination of plasma renin activity*

Plasma renin activity was measured as previously described [25] by determining the level of Ang I produced during a 30 min incubation of plasma at 37°C in the presence of 5 mM 8-hydroxyquinoline. Ang I was measured by radioimmunoassay (Perkin Elmer NEN Life Sciences) and plasma renin activity is expressed as nanograms of Ang I per milliliter of plasma per hour.

### *2.3. In situ detection of superoxide*

Detection of superoxide was performed using the oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE) [26] which is freely permeable to cells and is oxidized into ethidium bromide in the presence of superoxide. Ethidium bromide intercalates with DNA and produces a red fluorescence. Rings were embedded in OCT compound and snap-frozen on dry ice in isopentane at -50° C. Serial sections (30 µm-thick) were cut on a cryostat microtome, air-dried for 1 hour and stored at – 80 until use. They were then thawed and mounted onto silanated glass slides. Slides were incubated with 2.5 µM DHE in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min in a light

protected humidified chambre at 37°C. Slides were rinsed with PBS, air dried, mounted in Vectashield® (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA), coverslipped and examined under a Bio-Rad MRC-1024 laser scanning confocal microscope equipped with a krypton/argon laser. Ethidium bromide was excited at 488 nm with an emission wavelenght at 610 nm. Tissues from sham-operated or Ang II-infused rats were processed and imaged in parallel.

#### *2.4. Detection of cysteine-NO residues*

Cysteine-NO residues were detected as previously described [15]. Aortic rings were exposed or not to 100 µM GSNO for 30 min (at 37°C in 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>-aerated Krebs solution, in the dark) and then extensively washed out (over a 60 min period, during which time the Krebs solution was changed every 20 min). Some preparations were subsequently treated with NAC (1 mM) or HgCl<sub>2</sub> (0.1 mM) for 5 min, followed by washout. Preparations were then fixed, embedded and frozen as previously described [15]. Cross sections (about 14 µm thick) were thaw-mounted on gelatin coated slides. Slices were incubated overnight at room temperature with rabbit polyclonal antibodies (1:100 dilution in PBS-Triton 0.5% (v/w)) directed against conjugated NO-cysteine [27-28]. The secondary antibody was goat anti-rabbit IgG (Alexa Fluor 488, 1/200 dilution in PBS-Triton). The sections were mounted and examined under laser scanning confocal microscope as described below (section 2.3.). After excitation using an Argon laser 488 nm beam, emission signal was recorded with a Zeiss 515-565 nm filter. Nonspecific fluorescence was assessed after incubating slices with the secondary antibody and measuring the average intensity value of fluorescence. All images were corrected for nonspecific fluorescence.

Tissues from sham-operated or Ang II-infused rats were processed and imaged in parallel.

### *2.5. Organ chamber experiments*

Rat aortic rings (with or without endothelium) from sham control and Ang II-infused rats were mounted in organ chambers as previously described [15]. Following 90 min equilibration, rings were preconstricted with phenylephrine (PHE) to 80% of the contraction elicited by 80 mmol/l KCl. The relaxant effects of acetylcholine (Ach) and sodium nitroprusside (SNP) were determined in rings with and without endothelium, respectively. Some rings were exposed to 1 µM GSNO for 30 min in the dark. All subsequent experimental procedures were also performed in the dark. After a 60 min washout period (during which time the Krebs solution was changed every 20 min) for drug removal, rings were submaximally contracted with increasing concentrations of PHE. Once contraction reached a steady state level, NAC or HgCl<sub>2</sub> was added in a cumulative manner.

### *2.6. Reagents and drugs*

Unless otherwise indicated, drugs were purchased from Sigma Chemical Co or Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France). Rabbit polyclonal antibodies directed against conjugated NO-cysteine were obtained as previously described [27-28]. Alexa Fluor 488® was purchased from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands). NAC (Fluimucil®) was a generous gift from Zambon laboratory (Antibes, France). GSNO was prepared as previously described [15]. Angiotensin I was purchased from Perkin Elmer NEN Life Sciences.

## 2.7. Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  s.e. mean of  $n$  experiments. Concentration-response curves were compared by the multi-analysis of variance (MANOVA). Other statistical comparisons were performed with one-way ANOVA.  $P$  values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Model of Ang II-induced hypertension

As expected, infusion of Ang II resulted in a progressive increase of systolic blood pressure (Figure 1A), from  $121 \pm 4$  mmHg before infusion of Ang II to  $205 \pm 8$  mmHg after 2 weeks of Ang II infusion ( $n = 5$ ). Ang II-increase in systolic blood pressure was not associated with significant changes of heart rate (Figure 1B). No significant variation of systolic blood pressure or HR was observed in sham controls (Figure 1B). As expected, infusion of Ang II also led to a marked decrease of plasma renin activity from  $51.62 \pm 5.38$  in sham controls to  $4.7 \pm 1.05$  after 2 weeks of Ang II infusion ( $n = 5$ ).

In comparison to aortic sections obtained from sham controls; a marked increase in ethidium fluorescence (about 4 fold) was observed in those obtained from Ang II-infused rats, in the endothelial, medial, and the adventitial layers (Figure 2). Aortic rings with endothelium removed from Ang II-infused rats exhibited a significant decrease of the amplitude of the relaxant effect of acetylcholine, when compared to sham controls (Figure 3A). By contrast, the relaxant effect of the endothelium-independent NO donating agent sodium nitroprusside was unaffected in rings obtained from Ang II-infused rats, in comparison to those from sham controls (Figure 3B).

### *3.2. Effects of GSNO in aortic rings from sham control and Ang-II infused rats*

In endothelium-denuded aortic rings from both sham controls or Ang II-infused rats, pre-exposure to GSNO (1  $\mu$ M for 30 min, followed by a 60 min washout period for GSNO removal) resulted in a marked decrease of the contractile effect of phenylephrine and in a relaxant response to NAC (Figure 4AB). In rings with endothelium obtained from sham controls, the contractile effect of phenylephrine was not diminished after pre-exposure to GSNO, and NAC failed to elicit a significant relaxant effect (Figure 4C). However in rings with endothelium obtained from Ang II-infused rats, pre-exposure to GSNO induced a decrease of phenylephrine-induced contraction (Figure 4C) and a relaxant effect of both NAC (Figure 4D) and HgCl<sub>2</sub> (Figure 4E). The relaxant effect of NAC was not significantly different in rings with or without endothelium prepared from Ang II-infused rats. Furthermore, HgCl<sub>2</sub> completely abrogated the effect of subsequent addition of NAC in GSNO-exposed aortic rings (data not shown), indicating the existence of a common pool of S-nitrosothiols in tissues, with which NAC and HgCl<sub>2</sub> can interact and thus promote the release of vasoactive NO.

Immunostaining using an antiserum that recognizes cysteine-NO residues was applied to aortic segments with endothelium obtained from Ang II-infused rats. DHE fluorescence was also evaluated in the same segments for simultaneous detection of superoxide (figure 5a ,d, g and j). Pre-exposure to GSNO resulted in a persistent increase in cysteine-NO residues in aorta with endothelium (Figure 5e). GSNO-induced increase in cysteine-NO content was diminished both by HgCl<sub>2</sub> (Figure 5h) and NAC (Figure 5k). NAC also diminished DHE fluorescence in aortic segments from Ang II-infused rats (figure 5j).

#### **4. Discussion**

The present study shows that after exposure to GSNO, arteries with endothelium from sham controls (unlike endothelium-denuded ones) exhibited neither persistent hyporeactivity to vasoconstrictors, nor a relaxant effect of the low molecular weight thiol, NAC. However, in arteries removed from rats chronically infused with Ang II which displayed endothelial dysfunction and increased level of superoxide, GSNO induced a persistent attenuation of contraction and a relaxant effect of both NAC and HgCl<sub>2</sub>. In these arteries, GSNO induced also a persistent increase in S-nitrosated cysteine residues, which was blunted both by NAC and HgCl<sub>2</sub>.

In accordance with previous studies [21,24], infusion of rats for several days with Ang II induced a marked increase in systolic blood pressure and in superoxide level in all aortic layers (as detected by ethidium fluorescence) and a reduction of the relaxant effect of the endothelium-dependent agonist acetylcholine in the isolated aorta. The Ang II-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation is dependent, at least partially, on increased production of superoxide by all vascular cells, thus promoting inactivation of endothelium-derived NO [21,24,29]. Both NADPH oxidase [21,29] and uncoupled eNOS (Mollnau et al., 2002) were identified as sources of superoxide in Ang II-induced models of hypertension. Consistent with a role of NADPH oxidase, an increased level of expression of p22<sup>phox</sup> and gp91-phox were found in aortic sections of Ang II-infused rats (not shown). It is shown in the present study that the relaxation elicited by the endothelium-independent NO-donating agent sodium nitroprusside remained unaffected in aorta from Ang II-infused rats. This contrasts with some previous studies showing that chronic treatment with Ang II

diminishes the relaxant effect of NO donors like glyceryl trinitrate (although to a lesser extent than the relaxant effect of acetylcholine) and downregulates soluble guanylyl cyclase in the aorta [21,24]. The use of a relatively low dose of Ang II over more prolonged period in the present investigation might explain such apparent discrepancy. Moreover, unlike sodium nitroprusside, the relaxant effect of organic nitrate is dependent on mitochondrial aldehyde deshydrogenase activity [18], the activity of which being altered by increased vascular level of reactive oxygen species [19].

The present study shows that after exposure to GSNO, endothelium-denuded aortic rings from both sham-operated or Ang-II rats exhibited a persistent inhibition of the contractile effect of phenylephrine, which was associated with a relaxant response to the low molecular weight thiol, NAC. As previously shown by our group [15,17,20,33,34] an others [30], NAC is able to release NO from preformed vascular stores. GSNO also induced a sustained increase in contents of NO and S-nitrosated cysteine residues in endothelium-denuded arteries [15,17]. Several lines of evidence were brought in these studies to support the idea that S-nitrosation of tissue thiols is a mechanism of formation of local NO stores in endothelium-denuded arteries, from which biologically active NO can be subsequently released, activating the cyclic GMP pathway [15,17]. The present study shows that formation of NO stores and bioactivity of NO subsequently released from stores were not markedly affected in endothelium-denuded rings from rats treated with Ang II, eventhough these arteries exhibited higher levels of superoxide than those from sham-controls. By transnitrosation mechanisms, NO biological activity may be released from stores in the form of a S-nitrosothiol, being protected from superoxide-induced inactivation. This deserves further investigations. The effect of the endothelium-independent NO-donating agent

sodium nitroprusside was also unaffected by Ang II-treatment. The absence of alteration of the relaxant effect of sodium nitroprusside- or NO stores-derived NO despite elevated superoxide level suggests that NO fluxes largely exceeded those of superoxide, and thus masked the influence of NO degradation by superoxide.

In the present study, an important observation is that, unlike endothelium-denuded aortic rings, rings with endothelium from sham-operated rats did not exhibit persistent hyporesponsiveness to phenylephrine after exposure to GSNO. This is consistent with data showing that the presence of the endothelial layer markedly reduces the long-lasting hyporesponsiveness to vasoconstrictors induced by some S-nitrosothiols in isolated arteries [11,14]. The mechanisms underlying this inhibitory effect of endothelium are not elucidated. An increased release of vasoconstrictors (superoxide anion, cyclooxygenase-, lipoxygenase-, and cytochrome P450-derived products, endothelin or Ang II) that would counteract NO-mediated vasorelaxation appears unlikely [14]. A major finding of the present study is that, in contrast to rings with endothelium removed from sham-operated rats, those removed from rats infused with Ang exhibited persistent hyporeactivity to phenylephrine and relaxant effect of both NAC and HgCl<sub>2</sub> (which cleaves the S-NO bond, Saville, 1958 [23]) after exposure to GSNO. Moreover, a persistent S-nitrosation of cysteine residues in rings with endothelium from Ang II-infused rats is directly demonstrated here with an anti-cysteine-NO antiserum [15,17]. The high selectivity of this antiserum for cysteine-NO residues from proteins compared to low molecular weight species [15,32] suggests that the immunolabeling originated from S-nitrosated proteins and not from low molecular weight S-nitrosothiols. Specificity of cysteine-NO labeling in aortic tissue has been verified previously by inhibition of immunolabeling after blockade of thiol groups prior to nitrosation [17] and with mercuric chloride or dithiothreitol to cleave

the SNO linkage following nitrosation [15,32]). It is shown here that in aortic rings with endothelium pre-exposed to GSNO obtained from Ang II-infused rats, NAC and HgCl<sub>2</sub> not only elicited vasorelaxant responses, but also both blunted persistent increase in cysteine-NO residues. Taken together, these data indicate that persistent S-nitrosation of cysteine residues not only accounts for the long-lasting effects of GSNO in arteries with endothelium removed from Ang II-infused rats, but also remains an effective mechanism of formation of releasable NO stores in these arteries, despite increased level of superoxide. Moreover, the present data also indicate that the influence of releasable NO stores is unmasked by endothelial dysfunction. Elucidation of the mechanisms underlying this phenomenon requires further investigations. Since the influence of releasable NO stores on arterial tone is unmasked by both endothelium removal and dysfunction, it is unlikely that endothelium represent a barrier preventing formation of NO stores.

In conclusion, the present study shows that, unlike endothelium-denuded arteries, arteries with endothelium did not exhibit persistent inhibition of contraction after exposure to GSNO. By contrast, arteries presenting endothelial dysfunction and increased superoxide exhibited a sustained inhibition of tone, which was due to S-nitrosation of tissue thiols. Endothelial dysfunction is characterized by a loss of endothelial NO bioactivity, and is a common feature of various vascular diseases and risks factors predisposing to atherosclerosis. In these situations, formation of releasable NO stores from exogenous NO donating agents represents a novel approach for NO supplementation. It offers the possibility of targeted effects of NO at sites of endothelial dysfunction, thus allowing restoration of the vasculoprotective effects of NO.

## **5. References**

- [1] Schini-Kerth VB. Vascular biosynthesis of nitric oxide: effect on hemostasis and fibrinolysis. *Transfus Clin Biol.* 1999; 6: 355-63.
- [2] Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide : mechanisms and therapeutic potentials. *Cardiovasc Res*, 55, 250-260, 2002.
- [3] Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol*, 199, 8-17, 2003.
- [4] Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*, 190, 244-254, 2000.
- [5] Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(6):998-1005.
- [6] Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation.* 2004;109(21 Suppl 1):II27-33.
- [7] Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87(10):840-4.
- [8] Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation.* 2003;108(17):2034-40.
- [9] Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature : molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 2003;42(6):1075-81.
- [10] Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. *Circ Res.* 2002;90(1):21-8.
- [11] Megson IL, Greig IR, Gray GA, Webb DJ and Butler AR (1997) Prolonged effect of a novel S-nitrosated glyco-amino acid in endothelium-denuded rat femoral arteries: potential as a slow release nitric oxide donor drug. *Br J Pharmacol* 122: 1617-1624.
- [12] Megson IL, Morton S, Greig IR, Mazzei FA, Field RA, Butler AR, Caron G, Gasco A, Fruttero R and Webb DJ (1999) N-Substituted analogues of S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine : chemical stability and prolonged nitric oxide mediated vasodilatation in isolated rat femoral arteries. *Br J Pharmacol* 126: 639-648.

- [13] Sogo N, Campanella C, Webb DJ and Megson IL (2000) S-nitrosothiols cause prolonged, nitric oxide-mediated relaxation in human saphenous vein and internal mammary artery : therapeutic potential in bypass surgery. Br J Pharmacol 131: 1236-1244.
- [14] Terluk MR, Da Silva-Santos, JE and Assreuy J (2000) Involvement of soluble guanylate cyclase and calcium-activated potassium channels in the long-lasting hyporesponsiveness to phenylephrine induced by nitric oxide in rat aorta. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 361: 477-483.
- [15] Alencar JL, Lobysheva I, Geffard M, Sarr M, Schott C, Schini-Kerth V, Nepveu F, Stoclet JC, and Muller B (2003) Role of S-Nitrosation of cysteine residues in long-lasting inhibitory effect of NO on arterial tone. Mol Pharmacol 63: 1148-1158.
- [16] Kanagy NL, Charpie JR, Dananberg J, and Webb RC (1996) Decreased sensitivity to vasoconstrictors in aortic rings after acute exposure to nitric oxide. Am J Physiol 271: H253-260.
- [17] Alencar, J.L., Lobysheva, I., Chalupsky, K., Geffard, M., Nepveu, F., Stoclet, J.C., Muller, B. 2003a. S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. J. Pharmacol. Exp. Ther. 307, 152-159.
- [18] Chen, Z., Zhang, J., Stamler, J.S. 2002. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 8306-8311.
- [19] Sydow, K., Daiber, A., Oelze, M., Chen, Z., August, M., Wendt, M., Ullrich, V., Mulsch, A., Schulz, E., Keaney, J.F. Jr, Stamler, J.S., Munzel, T. 2004. Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. J. Clin. Invest. 113, 482-489.
- [20] Alencar JL, Chalupsky K, Sarr M, Schini-Kerth V, Vanin AF, Stoclet JC, Muller B. Inhibition of arterial contraction by dinitrosyl-iron complexes: critical role of the thiol ligand in determining rate of nitric oxide (NO) release and formation of releasable NO stores by S-nitrosation. Biochem Pharmacol. 2003;66(12):2365-74.
- [21] Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. J Clin Invest. 1996;97(8):1916-23.

- [22] Scharfstein JS, Keaney JF, Slivka A, Welch GN, Vita JA, Stamler JS and Loscalzo J (1994) In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols. *J Clin Invest* 94: 1432-1439.
- [23] Saville B (1958) A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* 83: 670-672.
- [24] Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyo AL, Tsilimingas N, Walter U, Forstermann U, Meinertz T, Griendling K, Munzel T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res*. 2002;90(4):E58-65.
- [25] Grima, M., Anjuere, J., Ingert, C., Coquard, C., Steger, J., Barthelmebs, M., and Imbs, J. L. [Effect of a non-antihypertensive dose of ramipril on the plasma and tissue renin-angiotensin system in 27 TGR (mRen2) rats.]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 94: 805-812, 2001.
- [26] Miller FJ Jr, Guterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res*. 1998;82(12):1298-305.
- [27] Mnaimneh S, Geffard M, Veyret B and Vincendeau P (1997) Albumin nitrosylated by activated macrophages possesses antiparasitic effects neutralized by anti-NO-acetylated-cysteine antibodies. *J Immunol* 158: 308-314.
- [28] Lorch SA, Foust R 3rd, Gow A, Arkovitz M, Salzman AL, Szabo C, Veyret B, Geffard M and Ischiropoulos H (2000) Immunohistochemical localization of protein 3-nitrotyrosine and S-nitrosocysteine in a murine model of inhaled nitric oxide therapy. *Pediatr Res* 47: 798-805.
- [29] Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(26):14483-8.
- [30] Hernanz R, Alonso MJ, Zibrandtsen H, Alvarez Y, Salaices M, Simonsen U. Measurements of nitric oxide concentration and hyporeactivity in rat superior mesenteric artery exposed to endotoxin. *Cardiovasc Res*. 2004;62(1):202-11.

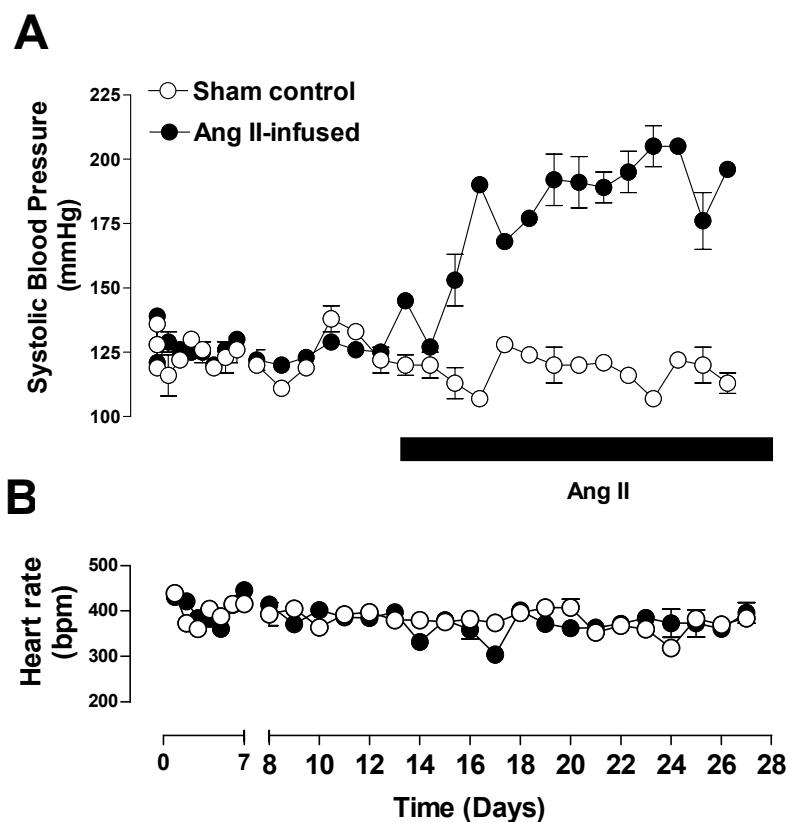
[31] Terluk M, Cunha Da Silva E, Antunes T, Assreuy JThe presence of the endothelial layer reduces nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in rat aorta. *Endothelium* 2004;11(3-4):181-7.

[32] Gow AJ, Chen Q, Hess DT, Day BJ, Ischiropoulos H and Stamler JS (2002) Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. *J Biol Chem* 277: 9637-9640.

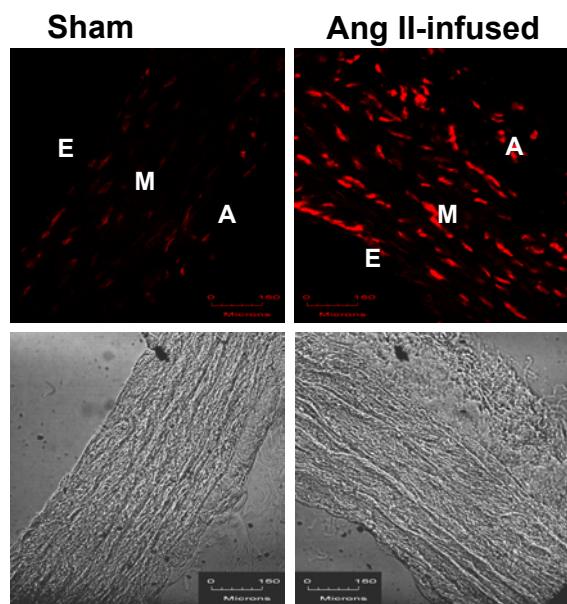
[33] Muller B, Kleschyov AL, Malblanc S and Stoclet JC (1998) Nitric oxide-related cyclic GMP-independent relaxing effect of N-acetylcysteine in lipopolysaccharide-treated rat aorta. *Br J Pharmacol* 123:1221-1229.

[34] Muller B, Kleschyov AL and Stoclet JC (1996) Evidence for N-acetylcysteine-sensitive nitric oxide storage as dinitrosyl-iron complexes in lipopolysaccharide-treated rat aorta. *Br J Pharmacol* 119:1281-1285.

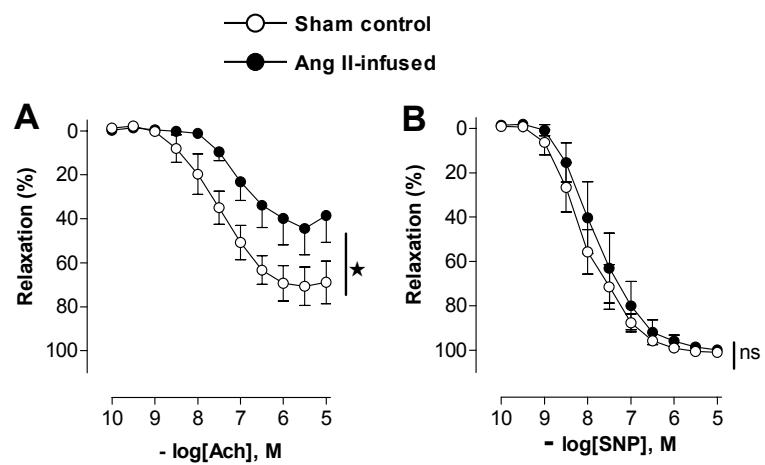
## Figures legends



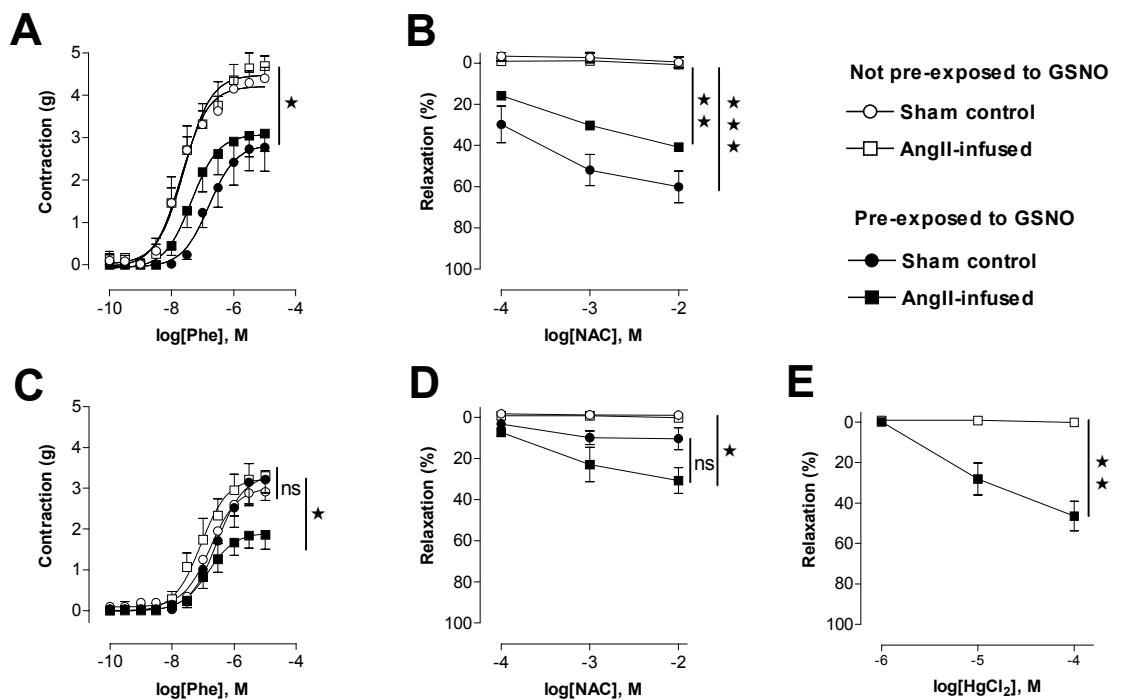
**Figure 1 :** Systolic blood pressure (panel A) and heart rate (panel B) from sham controls and AngII (0.4 mg/kg/day for 14 days)-infused rats. Values are means  $\pm$  S.E.M. of n = 4-5 experiments.



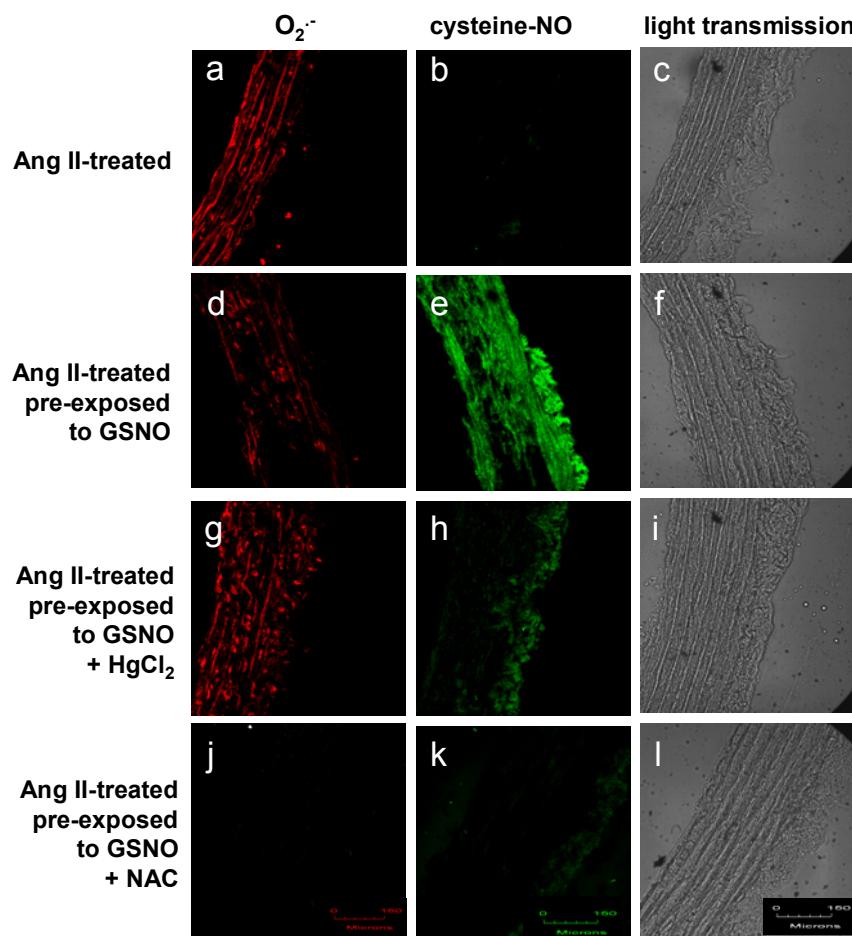
**Figure 2** : Dihydroethidium staining for superoxide in aortic segments with endothelium from sham controls and AngII (0.4 mg/kg/day for 14 days)-infused rats. Ethidium bromide fluorescence was visualized using confocal microscopy. Respective light transmission figures are shown at the bottom. *E* indicates endothelium ; *M*, media and *A*, adventitia. Representative pictures from 3 experiments.



**Figure 3 :** Relaxant effect of acetylcholine (Ach; panel A) and sodium nitroprusside (SNP; panel B) in aortic rings from sham controls ( $n = 4$ ) and AngII (0.4 mg/kg/day for 14 days;  $n = 5$ )-infused rats. \*  $P < 0.05$ ; ns: not significant.



**Figure 4 :** Effect of phenylephrine (Phe; panels A and C), N-acetylcysteine (NAC; panels B and D) and HgCl<sub>2</sub> (panel E) in rings with (panels C,D and E) or without endothelium (panels A and B) from sham controls ( $n = 4$ ) and AngII (0.4 mg/kg/day for 14 days;  $n = 5$ )-infused rats. Aortic rings were pre-exposed or not to GSNO (1  $\mu$ M for 30 min, followed by washout) before compelling concentration-response curves to Phe, NAC and HgCl<sub>2</sub>. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; ns: not significant.



**Figure 5 :** Staining for dihydroethidium (panels a, d, g and j) and cysteine-NO residues (panels b, e, h and k) in aortic segments with endothelium from AngII (0.4 mg/kg/day for 14 days)-infused rats. Aortic rings were pre-exposed (panels d-k) or not (panels a and b) to GSNO (100  $\mu\text{M}$  for 30 min, followed by washout) before being processed for staining. Some rings were exposed to  $\text{HgCl}_2$  (0.1 mM; panels g and h) or NAC (1 mM; panels j and k) after GSNO washout. Staining was visualized using confocal microscopy. Respective light transmission figures are shown in panels c-j. Representative pictures from 2 experiments.

## Mémoire 3

*Article en préparation : SARR M, CHATAIGNEAU M, MARTINS S, OAK MH, SCHOTT C, EL BEDOUI J, MULLER B, CHATAIGNEAU T, SCHINI-KERTH VB (2004). Red wine polyphenols prevent the angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction by inhibiting the vascular expression of NADPH oxidase.*

---

De nombreuses études épidémiologiques indiquent que la consommation modérée de vin rouge a des effets protecteurs sur le système cardiovasculaire. Les travaux menés dans le laboratoire avaient permis de mettre en évidence la capacité des composés polyphénoliques du vin à stimuler la production par l'endothélium d'un facteur protecteur, le NO. Compte tenu du rôle du stress oxydant vasculaire dans le développement de diverses pathologies touchant le système cardiovasculaire, les effets bénéfiques des polyphénols pourraient aussi découler de leurs propriétés antioxydantes. L'objectif de cette étude était d'analyser l'influence d'un extrait polyphénolique de vin l'hypertension artérielle et sur les altérations vasculaires induites par un traitement chronique par l'angiotensine II chez le rat.

Dans ce modèle pathologique, l'influence des extraits polyphénoliques de vin a été étudié sur :

- l'élévation de la pression artérielle systolique et l'activité rénine plasmatique ;

- l'effet relaxant endothélium-dépendant de l'acétylcholine et l'effet relaxant endothélium-indépendant du nitroprussiate de sodium, sur des anneaux d'aortes isolés ;
- le stress oxydatif au niveau de segments d'aorte, par microscopie confocale en utilisant la dihydroéthidine comme sonde de fluorescence ;
- l'expression de différentes sous-unités de NADPH oxydase au niveau de segments d'aorte, par microscopie confocale en utilisant des anticorps dirigés contre ces différentes sous-unités.

Les principaux résultats montrent que l'administration par voie orale d'un extrait polyphénolique de vin est capable de :

- prévenir l'élévation de la pression artérielle systolique et la diminution de l'activité rénine plasmatique induites par administration chronique d'angiotensine II ;
- prévenir la diminution de l'effet relaxant de l'acétylcholine au niveau de l'aorte induite par administration chronique d'angiotensine II ;
- prévenir l'augmentation de la production d'anions superoxydes et l'augmentation de l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase gp91phox-like et p22phox au niveau de l'aorte par administration chronique d'angiotensine II.

**Red wine polyphenols prevent the angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction by inhibiting the vascular expression of NADPH oxidase**

Mamadou Sarr, PhD<sup>1</sup>; Marta Chataigneau, PhD<sup>1</sup>; Sandrine Martins; Christa Schott; Jasser El Bedoui; Min-Ho Oak, PhD, Bernard Muller, PhD; Thierry Chataigneau, PhD; Valérie B. Schini-Kerth, PhD

**Short title:** Red wine prevents Ang II-induced hypertension

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work

From Pharmacologie et Physico-Chimie des Interactions Cellulaires et Moléculaires, UMR CNRS 7034 (MS, MC, SM, M-HO, CS, TC, JB, VBS-K), Université Louis Pasteur de Strasbourg, France ; Pharmacologie, INSERM E356 (BM), Université Victor Segalen, 33076 Bordeaux, France and Research and Development Center, Yangji Chemicals (M-HO), An-San, South Korea

Address for correspondence:

Valérie B. Schini-Kerth, PhD  
UMR CNRS 7034, Université Louis Pasteur de Strasbourg  
Faculté de Pharmacie  
74, route du Rhin, B.P. 60024  
F-67401 Illkirch, France  
Tel. +33 3 90 24 41 27  
Fax. +33 3 90 24 43 13  
E-mail: schini@aspirine.u-strasbg.fr

## **Abstract**

*Background* Chronic administration of moderate amounts of red wine has been associated with a protective effect on the cardiovascular system. This study examined whether red wine polyphenols prevent the angiotensin II-induced endothelial dysfunction in rats, and, if so, to elucidate the underlying mechanism. *Methods and Results* Hypertensive rats were obtained by a 14-day infusion of angiotensin II (Ang II). Red wine polyphenols were administered in the drinking water one week before the Ang II infusion. Arterial pressure was measured in conscious rats. In vitro vascular relaxation was assessed in organ chambers, vascular superoxide anions production by dihydroethidine, and NADPH oxidase subunit expression by immunohistochemistry. Ang II-induced hypertension was associated with decreased relaxations to acetylcholine, and increased vascular superoxide anion production and expression of p22phox and gp91phox-like proteins. Red wine polyphenol treatment prevented the Ang II-induced hypertension and endothelial dysfunction and normalized vascular superoxide anions production and NADPH oxidase expression. Red wine polyphenol treatment alone did not affect blood pressure. *Conclusions* Intake of red wine polyphenols prevents the Ang II-induced hypertension and endothelial dysfunction by inhibiting the vascular expression of NADPH oxidase and formation of superoxide anions. The ability of red wine polyphenols to prevent excessive vascular oxidative stress may contribute to explain their protective effect on the cardiovascular system.

**Key Words:** Red wine – hypertension – angiotensin II – reactive oxygen species – NADPH oxidase

## **Introduction**

Epidemiological studies have indicated that regular intake of moderate amounts of wine, in particular red wine, is associated with a reduced risk in overall mortality (St Leger et al., 1979; Renaud and de Lorgeril, 1992; Renaud et al., 1998; Gronbaek, 2000). This effect has been attributable to a reduction in death from cardiovascular disease and cancer (Renaud et al., 1998; Gronbaek, 2000). Although the alcohol component may contribute to the protective effect by increasing the concentration of high density lipoproteins, and by decreasing fibrinogen level and platelet reactivity (Pellegrini et al., 1996; Rimm, 1996; Rimm et al., 1999), several recent lines of evidence indicate a key role of polyphenolic compounds, which are found at high level in some red wine. Indeed, intake of red wine polyphenols reduced the development of atherosclerosis in several experimental models of atherosclerosis but was without effect on mature atherosclerosis (Bentzon et al., 2001; Vinson et al., 2001; Auger et al., 2002; Stocker and O'Halloran, 2004; Waddington et al., 2004). Red wine polyphenols and a grape skin extract also reduced blood pressure in N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester- and desoxycorticosterone acetate salt-induced experimental models of hypertension (Bernatova et al., 2002; Soares de Moura et al., 2002). In humans and in experimental models of atherosclerosis and hypertension, endothelium-dependent relaxations are impaired (Mombouli and Vanhoutte, 1999; Rudic and Sessa, 1999; Schiffrin, 2001; Taddei et al., 2001; Schiffrin, 2002). The endothelial dysfunction is observed early in the development of the pathology and is due, at least in part, to an excessive vascular formation of reactive oxygen species in particular superoxide anions, with the subsequent degradation of nitric oxide.(Rajagopalan et al., 1996; Miller et al., 1998; Taddei et al., 2001; Spiekermann et al., 2003). Although red wine polyphenols have antihypertensive properties, the possibility that they prevent the oxidative stress-induced endothelial dysfunction remains to be determined. Amongst experimental models of hypertension, that induced by angiotensin II has been well

characterized and is of potential clinical importance. Indeed, a variety of pathologic states, including certain forms of hypertension, congestive heart failure, and nitrate tolerance, are associated with elevated plasma renin activity and circulating levels of angiotensin II (Kurz et al., 1999; Shinozaki et al., 2004). The hypertensive response to chronic administration of angiotensin II in rats is mediated by an upregulation of vascular NADPH oxidase resulting in an increased production of superoxide anions, which in turn degrades endothelium-derived nitric oxide (Rajagopalan et al., 1996; Laursen et al., 2001). Therefore, the aim of the present study was to examine whether red wine polyphenols prevent the angiotensin II-induced hypertension and if so, to determine whether the protective effect is related to the restoration of the endothelial protective function by preventing NADPH oxidase expression and the formation of superoxide anions.

## Methods

### Materials

All chemicals were from Sigma Chemical Co unless specified. Alzet osmotic minipumps were from Charles Rivers Laboratories. Antibodies directed against either gp91phox-like proteins and p22phox were from Santa Cruz.

### Preparation of Red Wine Polyphenols

Red wine polyphenols dry powder was obtained from French red wine (Corbières A.O.C.) and provided by Dr. M. Moutounet (Institut National de la Recherche Agronomique, Montpellier, France) and analyzed by Dr. P.-L. Teissedre (Département d’Oenologie, Université de Montpellier, France). The procedures used to prepare and analyze red wine polyphenols have been described previously.<sup>18,19</sup> One liter of red wine produced 2.7 g of red wine polyphenols, which contained 471 mg/g of total phenolic compounds expressed as gallic acid.

### **In vivo Treatment of Rats**

Male Wistar rats (12 to 15 weeks-old) were anesthetized with intraperitoneal ketamine (80 mg/kg) and xylamine (10 mg/kg). A 1-cm incision was made in the midscapular region, and an osmotic minipump (Alzet model 200X) was implanted. Pumps contained angiotensin II dissolved in 0.15 mol/L NaCl containing 0.01 N acetic acid, and the infusion rate was 0.4 mg/kg per day. Sham-operated rats underwent an identical surgical procedure but no pump was implanted. On day 14 of angiotensin II infusion, the rats were euthanized, and their aortas were harvested for study. Rapidly after death, blood was taken from the abdominal aorta for the latter determination of the plasma renin activity. As indicated, red wine polyphenols (50 or 150 mg/kg/day, 10% ethanol, pH 3.3) or solvent (10% ethanol, pH 3.3) was given in the drinking water beginning 7 days before pump implantation.

### **Blood Pressure Measurement**

Systolic blood pressures and heart rates were measured in conscious rats by tail-cuff plethysmography connected to a computerized system (LE 5002<sup>®</sup>, BIOSEB). Before the administration of red wine polyphenols, the rats were trained in the blood pressure device to accustom them to the procedure for 1 week. On each day of blood pressure determination, 10 measurements were obtained and averaged for each rat.

### **Vascular Reactivity Studies**

Aortas were cleaned of connective tissue and cut into rings (3-4 mm in length). As indicated the endothelium was removed by rubbing the intimal surface of rings with a pair of forceps. Rings were suspended in organ baths containing oxygenated (95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>) Krebs

bicarbonate solution (mmol/L: NaCl 119, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, MgSO<sub>4</sub> 1.18, CaCl<sub>2</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 25 and D-glucose 11, pH 7.4, 37°C) and the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (10 µmol/L), for the determination of changes in isometric tension. Following equilibration for 90 minutes under a resting tension of 2 g, rings were contracted with phenylephrine (1 µmol/L). Thereafter, the rings were preconstricted with phenylephrine (1 µmol/L) to about 80% of the maximal constriction and the relaxation to acetylcholine (1 µM) was determined. After washout and a 30-minute equilibration period, rings were again constricted with phenylephrine before a concentration-relaxation curve to either red wine polyphenols, acetylcholine or sodium nitroprusside was constructed.

### **Determination of Plasma Renin Activity**

Plasma renin activity was measured by determining the level of angiotensin I generated during a 30-min incubation of plasma at 37°C in the presence of 1-hydroxyquinoline (5 mM). Angiotensin I was measured by radioimmunoassay.

### **Determination of the Vascular Formation of Reactive Oxygen species**

The oxidative fluorescent dye dihydroethidium was used to evaluate in situ formation of reactive oxygen species by use of a method described by Miller et al (Miller et al., 1998). Aortic rings (3 to 4 mm length) from the control group, the angiotensin II group, the red wine polyphenols group and the red wine polyphenols plus angiotensin II group were embedded in OCT compound (Tissue-Tek) and frozen in a pentane/liquid nitrogen bath for cryostat sections. In addition, rings from the angiotensin II group were also incubated in MEM containing 0.1% of bovine serum albumin in the absence or presence of an inhibitor for 60

min at 37°C before being embedded. These unfixed frozen aortic rings were cut into sections 30 µm thick and placed on polylysine-coated-plus glass slides. Dihydroethidine (2.5 µmol/L) was applied to all tissue sections on the slide, which were then incubated in a light-protected humidified chamber at 37°C for 30 min before being sealed with coverslips. Images were obtained with a Bio-Rad MRC-1024 laser scanning confocal microscope equipped with a krypton/argon laser. Fluorescence was detected with a 605-nm pass filter. Laser settings for image acquisition were identical for all specimens.

### **Immunohistochemical Determination of NADPH oxidase subunit Expression**

Aortas were removed, embedded in OCT compound, and snap-frozen. Frozen aortas were crysectionned at 14 µm. The sections were air-dried for 1 h and stored at -80°C untill use. The slides were first treated with 10% normal serum in PBS containing 0.1% BSA and 0.05% Tween-20 for 45 min to block any nonspecific binding. After rinsing, the sections were then incubated overnight at 4°C with control nonimmune serum or with the previously characterized antibodies (Archer et al., 1999; Meyer et al., 1999; Suh et al., 1999). The antibodies used were a rabbit polyclonal gp91phox (*sc-20782* ; directed against a recombinant protein corresponding to amino acids 231-290 of gp91phox ; this region presents 43% of identity with nox-1 and 49% of identity with nox3, 1:100 dilution) and a goat polyclonal p22phox (*sc-11712*, 1:100 dilution). Sections were washed with PBS, incubated with the secondary antibodies (goat anti-rabbit alexia fluor 488-conjugated, donkey anti-goat alexia fluor 567-conjugated, 1:200) diluted in the same buffer for 2 h at room temperature in the dark, and washed before being mounted and coverslipped. Negative controls included omission of primary antibodies.

## **Statistical Analysis**

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical evaluation was performed with Student's *t* test for paired data or ANOVA followed by Fischer's protected least significant difference test where appropriate. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## **Results**

Red wine polyphenols prevent the angiotensin II-induced hypertension

Infusion of angiotensin II at a rate of 0.4 mg/kg/day to rats caused a significant increase in systolic blood pressure, which reached a plateau after 3 days and thereafter remained elevated throughout the study (Figure 1A). In contrast to systolic blood pressure, heart rate was unaffected by the angiotensin II treatment (Figure 1A). The increased systolic blood pressure was associated with a pronounced reduction of the plasma renin activity (Figure 1B). Administration of 150 mg/kg/day red wine polyphenols in the drinking water to rats 7 days before the infusion of angiotensin II prevented the increase in systolic blood pressure and the decrease in plasma renin activity elicited by angiotensin II (Figure 1A and 1B). In contrast, administration of 50 mg/kg/day of red wine polyphenols to rats did not affect the angiotensin II-induced hypertension (data not shown). The red wine polyphenols treatment alone affected neither systolic blood pressure nor heart rate, and also not the plasma renin activity (Figure 1A and B).

Red wine polyphenols prevent the angiotensin II-induced endothelial dysfunction

Acetylcholine caused concentration-dependent relaxations in aortic rings with endothelium, which were markedly reduced in the angiotensin II-treated group compared to the control

group (Figure 2A). In contrast, the direct red wine polyphenols-induced endothelium-dependent relaxations were only slightly but not significantly shifted to the right and the maximal response was unaffected by the angiotensin II treatment (Figure 2B). The inhibitory effect of the angiotensin II treatment on acetylcholine-induced relaxations was completely prevented by administration of red wine polyphenols to rats before the infusion of angiotensin II (Figure 2A). The red wine polyphenols treatment alone did not affect relaxations to acetylcholine (Figure 2A). Relaxations to sodium nitroprusside in aortic rings without endothelium were affected neither by the angiotensin II treatment nor the red wine polyphenols treatment (Figure 2C).

Red wine polyphenols prevent the angiotensin II-induced vascular formation of reactive oxygen species and expression of NADPH oxidase

Previous studies have indicated that the angiotensin II-induced endothelial dysfunction is associated with an excessive NADPH oxidase-dependent vascular formation of reactive oxygen species, which scavenge nitric oxide (Rajagopalan et al., 1996; Laursen et al., 2001). Therefore, experiments were planned to test whether the protective effect of red wine polyphenols on the angiotensin II-induced endothelial dysfunction is associated with a reduced vascular pro-oxidant response as assessed using the redox-sensitive fluorescent probe dihydroethidine. The angiotensin II treatment caused a marked increase of the low basal fluorescence signal throughout the entire aortic wall (Figure 3). The stimulatory effect was markedly reduced by the membrane permeant mimetic of superoxide dismutase MnTMPyP and the inhibitor of NADPH oxidase, diphenylene iodonium whereas it was not affected by the membrane permeant analogue of catalase, polyethyleneglycol catalase (Figure 4). In contrast to the angiotensin II treatment, no such increase in fluorescence was observed in rats, which have received red wine polyphenols before the infusion of angiotensin II (Figure 3).

Administration of red wine polyphenols alone did not affect the low basal fluorescence signal (Figure 3).

The *in vivo* angiotensin II-induced vascular formation of reactive oxygen species has been associated with the vascular upregulation of the NADPH oxidase subunits gp91phox, p22phox, nox1 and nox4 in rats (Ushio-Fukai et al., 1996; Fukui et al., 1997; Mollnau et al., 2002). Moreover, angiotensin II increased the expression of p22phox, nox1, p40phox, p47phox and p67phox in vascular smooth muscle cells (Fukui et al., 1997; Lassegue et al., 2001; Mollnau et al., 2002; Touyz et al., 2002). Therefore, the possibility that red wine polyphenols prevent the angiotensin II-induced vascular expression of NADPH oxidase subunits was assessed by immunohistochemistry. In the control group, a low signal for p22phox and gp91phox-like proteins was detected throughout the aortic wall (Figure 5). These signals were markedly increased in the aortas of angiotensin II-treated rats (Figure 5). The stimulatory effect was prevented by the administration of red wine polyphenols prior to the infusion of angiotensin II to rats (Figure 5). The red wine polyphenols treatment alone did not affect the low basal expression level of gp91phox-like proteins but it decreased that of p22phox (Figure 5).

## Discussion

The present findings demonstrate that chronic administration of red wine polyphenols in the drinking water effectively prevented the angiotensin II-induced hypertension in rats. Previous studies have also shown that oral intake of a grape skin extract prevented  $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension (Soares de Moura et al., 2002). Moreover, the grape skin extract and a grape-derived polyphenol extract were also able to rapidly decrease established hypertension in desoxycorticosterone acetate-salt- and  $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension, respectively (Bernatova et al., 2002; Soares de Moura et al., 2002).

Antihypertensive actions of grape-derived polyphenols have also been observed in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (Negishi et al., 2004) and in hypertensive insulin-resistant fructose-fed rats (Al-Awwadi et al., 2004). In addition, polyphenols from cocoa reduced blood pressure in elderly individuals with mild isolated hypertension (Taubert et al., 2003) and a similar effect was observed with black and green tea polyphenols in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (Negishi et al., 2004). Altogether, these studies indicate that a variety of polyphenolic extracts are able not only to retard effectively the development of several types of experimental hypertension but also to normalize blood pressure once hypertension is established in humans and in experimental animals.

The antihypertensive effect of the grape-derived polyphenols and the grape skin extract in experimental models of hypertension was observed following administration of 40 and 100 mg/kg/day, respectively (Bernatova et al., 2002; Soares de Moura et al., 2002). In the present study, no such protective effect was observed with 50 mg/kg/day of red wine polyphenols whereas a three times higher dose (150 mg/kg/day) completely prevented the angiotensin II-induced hypertension. Since polyphenols were provided in the drinking water, the difference in potency is most likely due to the different composition of the polyphenolic extracts studied (red wine versus grape skin versus grape-derived polyphenols) and possibly also to the different experimental models of hypertension studied.

The angiotensin II-induced hypertension has been shown to be associated with an endothelial dysfunction as indicated by an impairment of endothelium-dependent relaxations to agonists such as acetylcholine, and an increased vascular formation of reactive oxygen species (Rajagopalan et al., 1996; Wang et al., 2003). Similarly, patients with essential hypertension also present a decreased endothelium-dependent relaxation and a diminished effect of NO synthase inhibitors (Taddei et al., 2001). Moreover several lines of evidence support the

concept that the vascular pro-oxidant response is responsible the endothelial dysfunction by rapidly inactivating endothelium-derived nitric oxide. Indeed, administration of exogenous antioxidants, such as the superoxide dismutase mimetic tempol improves endothelium-dependent relaxation, oxidative markers and hypertension in angiotensin II- and DOCA-salt-induced hypertension (Kawada et al., 2002; Zheng et al., 2003). Dietary antioxidant vitamins C and E also improved the endothelial formation of NO and blood pressure in experimental models of hypertension (Chen et al., 2001; Maffei et al., 2002). The present studies indicates that chronic administration of red wine polyphenols prevented the angiotensin II-induced endothelial dysfunction to acetylcholine and that is effect is associated with a marked reduction of the vascular pro-oxidant response. The protective effect may be explained by their direct antioxidant properties through their interaction with superoxide anions and other reactive oxygen species such as hydroxy and peroxy radicals (Torel and Cillard, 1986; Frankel et al., 1993; Hu et al., 1995). In addition, changes in the expression pattern of endogenous pro-oxidant and antioxidant enzymes may also be involved. Indeed, tea polyphenols have been shown to up-regulate the expression of catalase and to down-regulate the NADPH oxidase subunits p22phox and p67phox in endothelial cells and the vasculature (Ying et al., 2003; Negishi et al., 2004). The present findings also indicate that although the angiotensin II treatment caused an impairment of endothelium-dependent relaxations to acetylcholine those induced by the direct application of red wine polyphenols were unaffected. Since these relaxations to red wine polyphenols are abolished by inhibitors of NO synthase, they can be attributed solely to endothelium-derived nitric oxide (data not shown). Thus, the ability of red wine polyphenols to stimulate the endothelial formation of NO appears to be maintained in pathologic arteries presenting an excessive oxidative stress. Such a unique property may be due to the fact that red wine polyphenols have direct antioxidant properties and also that they can activate endothelial cells to cause the redox-sensitive

activation of the phosphatidylinositol3-kinase/akt pathway with subsequent phosphorylation of endothelial NO synthase resulting in an increased formation of NO (Ndiaye et al., 2004a). Several studies have indicated a key role of NADPH oxidase-derived superoxide anions in the vascular oxidant stress-induced endothelial dysfunction and development of hypertension to angiotensin II in vivo. Indeed, the angiotensin II treatment-induced vascular formation of reactive oxygen species and endothelium-dependent relaxation were normalized by analogues of superoxide dismutase (Rajagopalan et al., 1996; Laursen et al., 1997) (present findings). The angiotensin II treatment also increased membrane-bound NADH/NADPH oxidase activity and up-regulated the expression of several NADPH oxidase subunits including nox1, nox4 and p22phox in the arterial wall (Rajagopalan et al., 1996; Fukui et al., 1997; Mollnau et al., 2002). Moreover, the hypertensive response to angiotensin II was markedly blunted in mice deficient in p47phox, a cytosolic subunit of the NADPH oxidase (Landmesser et al., 2002a). Consistent with these previous findings are the present ones indicating that the angiotensin II-treatment caused an upregulation of both p22phox and gp91phox-like proteins in the arterial wall, which was associated with an increased NADPH oxidase-dependent vascular formation of superoxide anions. Moreover, these stimulatory effects were markedly reduced by the administration of red wine polyphenols to rats prior to the infusion of angiotensin II. Thus, the beneficial effect of red wine polyphenols on angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction appears to be due to the prevention of the excessive vascular formation of superoxide anions by inhibiting the expression of several NADPH oxidase subunits.

In conclusion, the present findings indicate that administration of red wine polyphenols effectively blunts hypertension and endothelial dysfunction induced by the infusion of angiotensin II in vivo. The protective effect is due to the dual ability of red wine polyphenols

to prevent vascular oxidant stress by inhibiting NADPH oxidase expression and to induce an unaltered endothelial formation of NO in pathologic arteries.

#### Acknowledgments

This study was supported in part by ONIVINS (Ministry of Agriculture, France).

## References

1. St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*. 1979;1:1017-20.
2. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992;339:1523-6.
3. Gronbaek M. Wine and mortality. Evidence for causal inference? *Dan Med Bull*. 2000;47:271-82.
4. Renaud SC, Gueguen R, Schenker J, d'Houtaud A. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology*. 1998;9:184-8.
5. Rimm EB. Alcohol consumption and coronary heart disease: good habits may be more important than just good wine. *Am J Epidemiol*. 1996;143:1094-8; discussion 1099.
6. Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer MJ. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *Bmj*. 1999;319:1523-8.
7. Pellegrini N, Pareti FI, Stabile F, Brusamolino A, Simonett P. Effects of moderate consumption of red wine on platelet aggregation and haemostatic variables in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr*. 1996;50:209-13.
8. Vinson JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis*. 2001;156:67-72.
9. Bentzon JF, Skovborg E, Hansen C, Moller J, de Gaulejac NS, Proch J, Falk E. Red wine does not reduce mature atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2001;103:1681-7.
10. Stocker R, O'Halloran RA. Dealcoholized red wine decreases atherosclerosis in apolipoprotein E gene-deficient mice independently of inhibition of lipid peroxidation in the artery wall. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:123-30.
11. Waddington E, Puddey IB, Croft KD. Red wine polyphenolic compounds inhibit atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice independently of effects on lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:54-61.
12. Auger C, Caporiccio B, Landrault N, Teissedre PL, Laurent C, Cros G, Besancon P, Rouanet JM. Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein

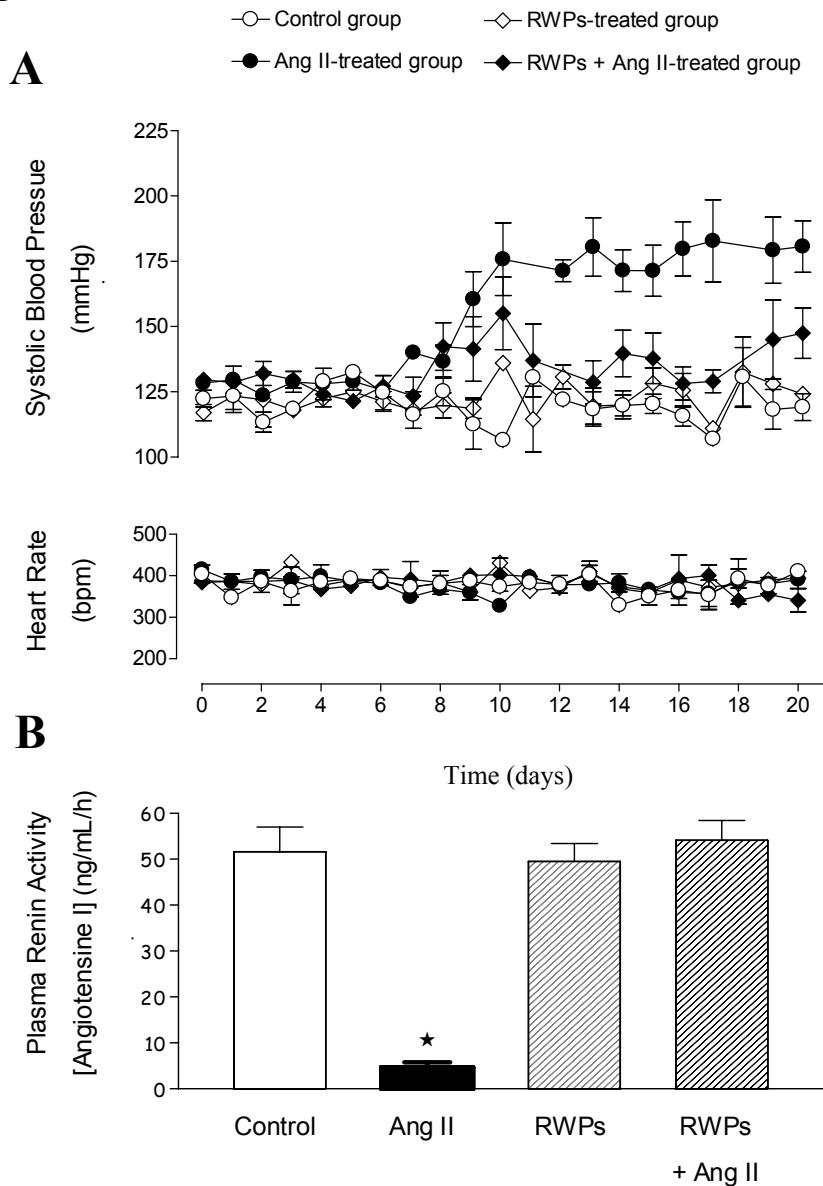
- B and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Nutr.* 2002;132:1207-13.
13. Soares de Moura R, Costa Vieira FS, Souza MAV, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EPB, Rubenich LMS, Carvalho LCRM, Tano T, Gusmao Correia ML. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of vinifera grape-skin extract. *J Pharm Pharmacol.* 2002;54:1515-20.
  14. Bernatova I, Pechanova O, Babal P, Kysela S, Stvrtina S, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H942-8.
  15. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Pasini AF, Garbin U, Cominacini L, Salvetti A. Effect of calcium antagonist or beta blockade treatment on nitric oxide-dependent vasodilation and oxidative stress in essential hypertensive patients. *J Hypertens.* 2001;19:1379-86.
  16. Rudic RD, Sessa WC. Nitric oxide in endothelial dysfunction and vascular remodeling: clinical correlates and experimental links. *Am J Hum Genet.* 1999;64:673-7.
  17. Schiffrin EL. Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. *Am J Hypertens.* 2002;15:115S-122S.
  18. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:61-74.
  19. Schiffrin EL. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens.* 2001;14:83S-89S.
  20. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996;97:1916-23.
  21. Miller FJ, Jr., Guterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res.* 1998;82:1298-305.
  22. Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, Bredt M, Gamez G, Tatge H, Reepschlager N, Hornig B, Drexler H, Harrison DG. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery

- disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*. 2003;107:1383-9.
23. Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, Sugaya T, Kashiwagi A, Okamura T. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. *Hypertension*. 2004;43:255-62.
24. Kurz S, Hink U, Nickenig G, Borthayre AB, Harrison DG, Munzel T. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in nitrate tolerance. *Circulation*. 1999;99:3181-7.
25. Laursen JB, Boesgaard S, Trautner S, Rubin I, Poulsen HE, Aldershvile J. Endothelium-dependent vasorelaxation is inhibited by in vivo depletion of vascular thiol levels: role of endothelial nitric oxide synthase. *Free Radic Res*. 2001;35:387-94.
26. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. 1999;401:79-82.
27. Archer SL, Reeve HL, Michelakis E, Puttagunta L, Waite R, Nelson DP, Dinauer MC, Weir EK. O<sub>2</sub> sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:7944-9.
28. Meyer JW, Holland JA, Ziegler LM, Chang MM, Beebe G, Schmitt ME. Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in human endothelial cells :a potential atherogenic source of reactive oxygen species. *Endothelium*. 1999;7:11-22.
29. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1996;271:23317-21.
30. Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Qt, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN, Griendling KK. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res*. 1997;80:45-51.
31. Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyn AL, Tsilimingas N, Walter U, Forstermann U, Meinertz T, Griendling K, Munzel T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res*. 2002;90:E58-65.

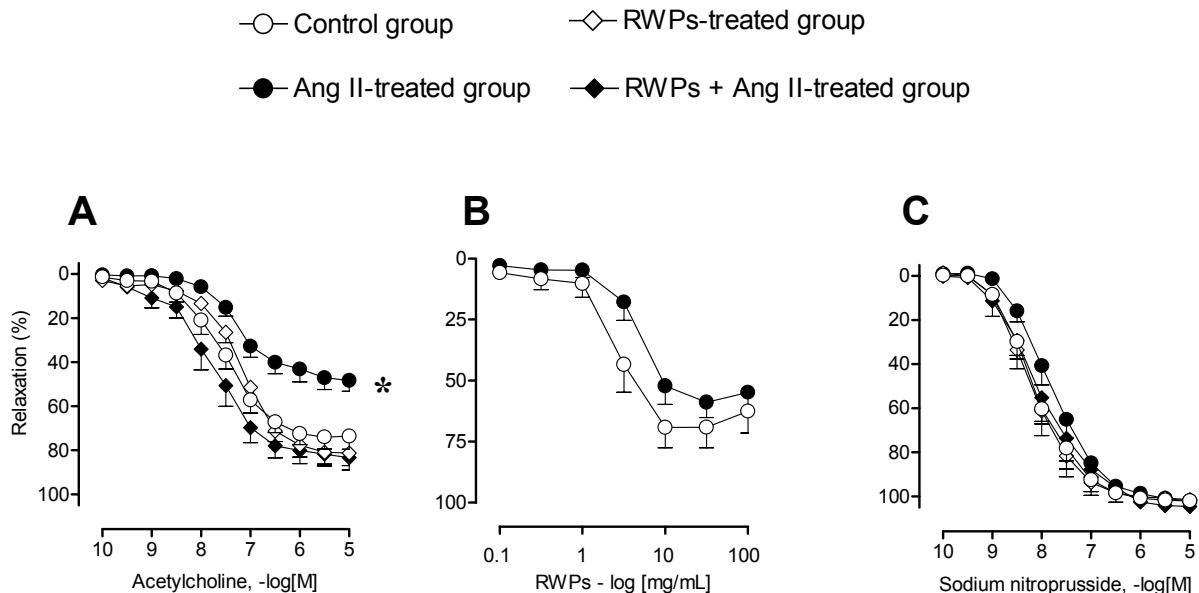
32. Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res.* 2001;88:888-94.
33. Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res.* 2002;90:1205-13.
34. Negishi H, Xu JW, Ikeda K, Njelekela M, Nara Y, Yamori Y. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr.* 2004;134:38-42.
35. Al-Awwadi NA, Bornet A, Azay J, Araiz C, Delbosc S, Cristol JP, Linck N, Cros G, Teissedre PL. Red wine polyphenols alone or in association with ethanol prevent hypertension, cardiac hypertrophy, and production of reactive oxygen species in the insulin-resistant fructose-fed rat. *J Agric Food Chem.* 2004;52:5593-7.
36. Taubert D, Berkels R, Roesen R, Klaus W. Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension. *Jama.* 2003;290:1029-30.
37. Wang D, Chen Y, Chabashvili T, Aslam S, Borrego Conde LJ, Umans JG, Wilcox CS. Role of oxidative stress in endothelial dysfunction and enhanced responses to angiotensin II of afferent arterioles from rabbits infused with angiotensin II. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:2783-9.
38. Kawada N, Imai E, Karber A, Welch WJ, Wilcox CS. A mouse model of angiotensin II slow pressor response: role of oxidative stress. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:2860-8.
39. Zheng JS, Yang XQ, Lookingland KJ, Fink GD, Hesslinger C, Kapatos G, Kovacs I, Chen AF. Gene transfer of human guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I restores vascular tetrahydrobiopterin level and endothelial function in low renin hypertension. *Circulation.* 2003;108:1238-45.
40. Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension.* 2001;38:606-11.
41. Maffei A, Poulet R, Vecchione C, Colella S, Fratta L, Frati G, Trimarco V, Trimarco B, Lembo G. Increased basal nitric oxide release despite enhanced free radical production in hypertension. *J Hypertens.* 2002;20:1135-42.

42. Hu S, Sheng WS, Peterson PK, Chao CC. Cytokine modulation of murine microglial cell superoxide production. *Glia*. 1995;13:45-50.
43. Torel J, Cillard P. Antioxydant activity of flavonoids and reactivity with proxy radical. *Phytochemistry*. 1986;25:383-387.
44. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*. 1993;341:454-7.
45. Ying CJ, Xu JW, Ikeda K, Takahashi K, Nara Y, Yamori Y. Tea polyphenols regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunit expression and ameliorate angiotensin II-induced hyperpermeability in endothelial cells. *Hypertens Res*. 2003;26:823-8.
46. Ndiaye M, Chataigneau M, Lobyscheva I, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols-induced endothelium-dependant NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependant phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *FASEB*. 2004;in press.
47. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*. 1997;95:588-93.
48. Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, Harrison DG. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension*. 2002;40:511-5.

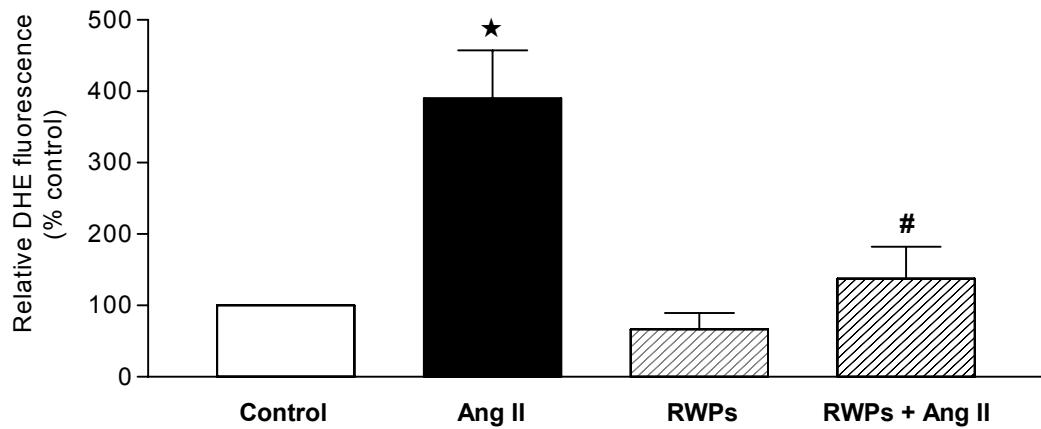
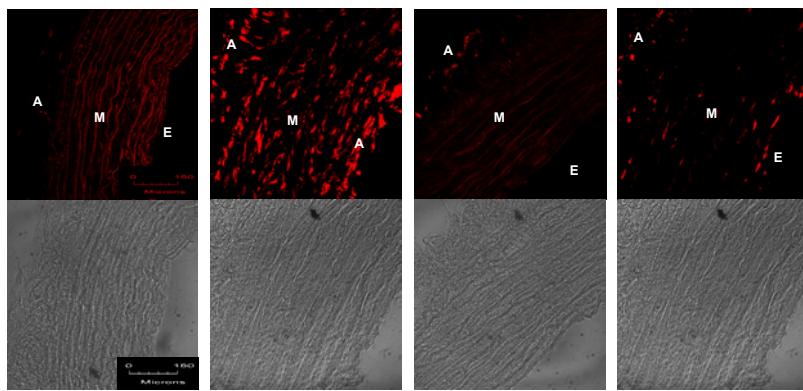
## Figures Legends



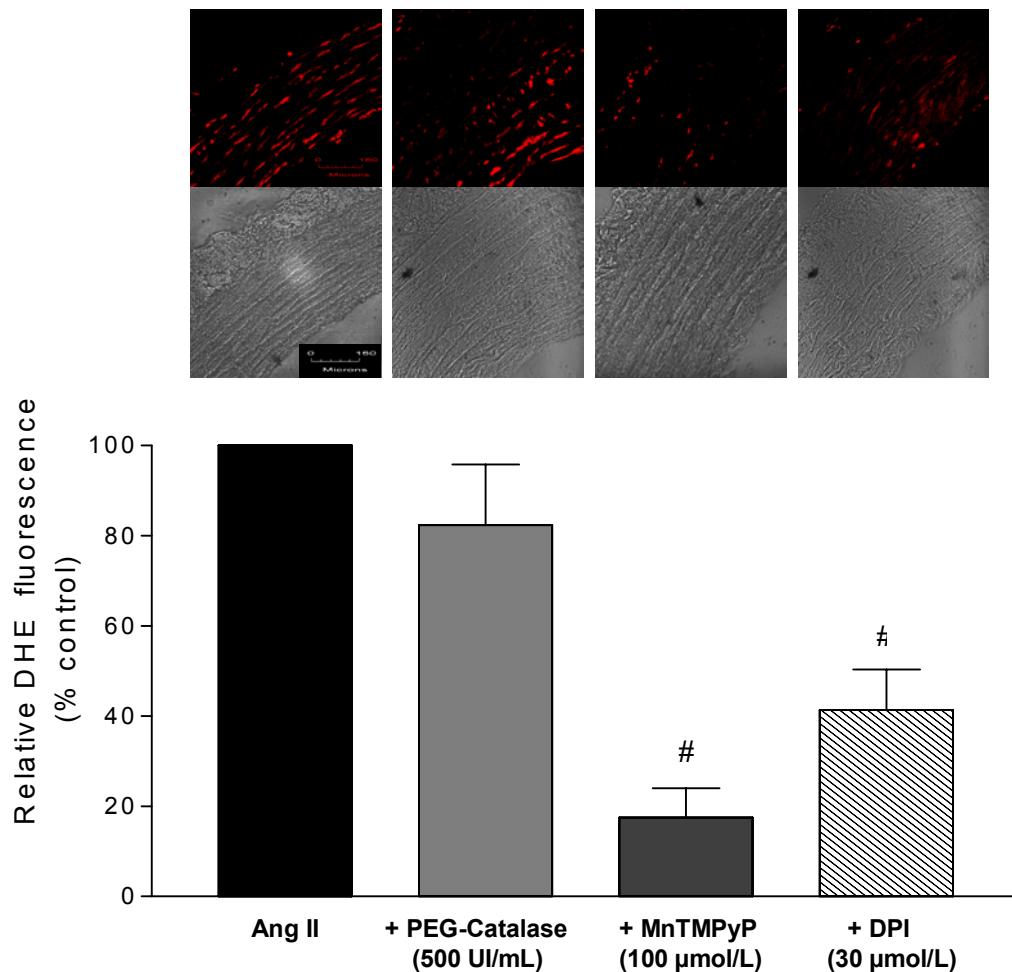
**Figure 1.** Red wine polyphenols prevent the angiotensin II-induced hypertension. The control group of rats received the solvent (10% ethanol, pH 3.3) for 21 days in the drinking water; the red wine polyphenols (RWPs) group received 150 mg/kg/day RWPs in the drinking water for 21 days; the Ang II group received the solvent in the drinking water and the sub-cutaneous administration of angiotensin II (0.4 mg/kg/day) using osmotic minipumps from day 7 until day 21; the RWPs and Ang II group received RWPs in the drinking water for 21 days and the subcutaneous administration of angiotensin II from days 7 until day 21. Changes in hemodynamic parameters are shown in A) and those of the plasma renin activity determined at day 21 in B). Results are shown as mean  $\pm$  SEM of 8 to 10 different rats. \* indicates a significant inhibitory effect.



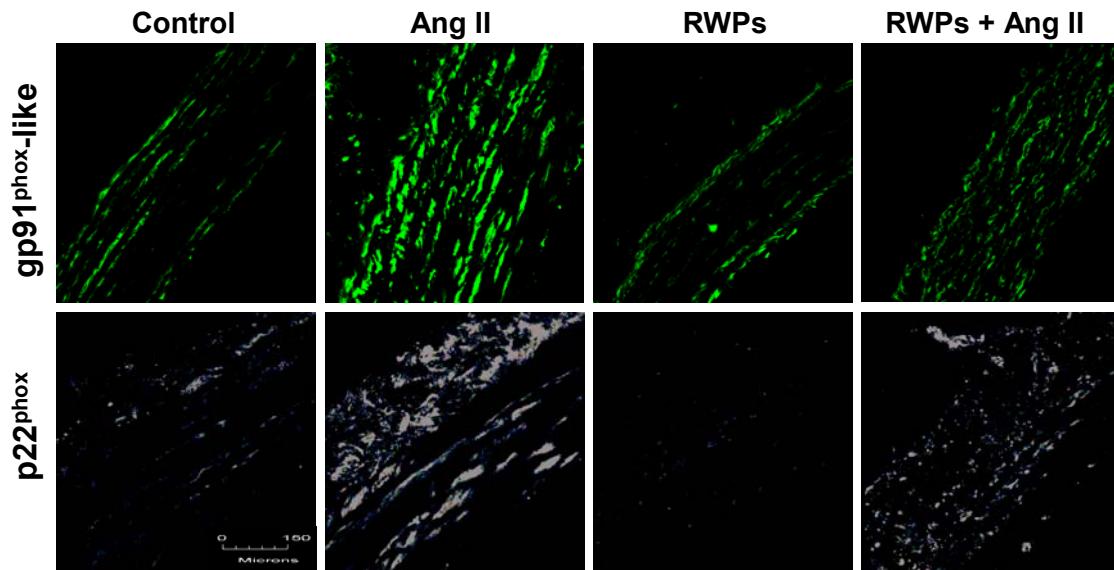
**Figure 2.** Red wine polyphenols prevent the angiotensin II-induced endothelial dysfunction. Concentration-relaxation curves to acetylcholine (A) and to red wine polyphenols (B) in aortic rings with endothelium and those to sodium nitroprusside (C) in aortic rings without endothelium from either the control group, the RWPs group, the Ang II group and the RWPs plus Ang II group obtained at day 21. Results are shown as mean  $\pm$  SEM of 8 to 10 different experiments. \* indicates a significant inhibitory effect.



**Figure 3 :** Red wine polyphenols prevent the angiotensin II-induced vascular formation of reactive oxygen species. Aortic sections of 30  $\mu$ m were exposed to the redox-sensitive fluorescent dye dihydroethidine (2.5  $\mu$ M) for 30 min at 37°C. Thereafter, ethidium fluorescence was determined by confocal microscopy. Upper panel represents ethidium bromide staining and corresponding phase contrast; lower panel represents corresponding cumulative data. Results are shown as mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments. \* indicates a significant stimulatory effect and # a significant inhibitory effect. A: adventitia; M: media; E: endothelium.



**Figure 4 :** Characterization of the pro-oxidant response induced by the angiotensin II-treatment in the rat aorta. Aortic sections of 30  $\mu\text{m}$  were exposed to the redox-sensitive fluorescent dye dihydroethidium (DHE, 2.5  $\mu\text{M}$ ) for 30 min at 37°C. Thereafter, ethidium fluorescence was determined by confocal microscopy. Sections were exposed to an inhibitor for 30 min prior to the addition of dihydroethidium. Upper panel represents ethidium bromide staining and corresponding phase contrast; lower panel represents corresponding cumulative data. Results are shown as mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments. # indicates a significant inhibitory effect. A: adventitia; M: media; E: endothelium.



**Figure 5 :** Red wine polyphenols prevent the angiotensin II-induced expression of NADPH oxidase subunits in the rat aorta. The expression level of NADPH oxidase subunits in aortic sections (14  $\mu$ m) was determined using respective polyclonal antibodies and fluorescence-tagged secondary antibodies by confocal microscopy. Representative immunofluorescent photos are shown. Similar observations were made in two additional experiments.

**Autres publications  
non présentées dans cette thèse**

# **Chapitre 4**

## **Discussion**

## **I. Modèles expérimentaux**

### **I.1. Modèle de tolérance induite par exposition prolongée *in vitro* à la trinitrine (mémoire 1)**

Nous avons utilisé comme modèle de tolérance aux dérivés nitrés celui d'anneaux d'aortes de rats dépourvus d'endothélium, pré-exposées *in vitro* pendant 1 heure à de fortes concentrations de trinitrine. Ce modèle relativement simple permet de s'affranchir de l'influence de facteurs neuro-humoraux et endothéliaux qui sont impliqués dans la tolérance aux nitrates organiques. *In vivo*, de nombreux arguments indiquent l'implication de l'activation du système rénine/angiotensine dans le développement de la tolérance. La capacité de l'Ang II à augmenter la production endothéliale d'ERO (suite à l'activation de la NADPH oxydase ou au découplage de la NOS 3) est bien connue, et ceci pourrait être en grande partie responsable de l'augmentation d'anions superoxydes retrouvée dans des artères d'animaux traités de façon chronique par la trinitrine. Une telle augmentation d'anions superoxydes induit une diminution de l'effet d'agents relaxants endothélium-dépendant (tolérance croisée). Les mécanismes de tolérance impliqués dans le modèle utilisé dans ce travail ne représentent donc que très partiellement ceux impliqués dans la tolérance induite *in vivo*. Néanmoins, un certain nombre de points communs existe entre les deux modèles. Dans les deux modèles, il a été récemment montré que l'ALDH-2 intervient non seulement dans la biotransformation et l'effet relaxant de la trinitrine (Chen

et al., 2002; Zhang et al., 2004), mais également dans le phénomène de tolérance (Chen et al., 2002; Sydow et al., 2004). La tolérance est attribuée à une diminution de la biotransformation de la trinitrine par l'ALDH-2 des cellules musculaires lisses (Chen et al., 2002; Sydow et al., 2004). Dans les deux types de modèles de tolérance (*in vivo* et *in vitro*), une augmentation de la quantité d'ERO a également été montrée dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Dikalov et al., 1998a; Dikalov et al., 1998b; Mulsch et al., 2001).

Nous avons effectivement montré une augmentation d'ERO dans les anneaux d'aortes de rats dépourvus d'endothélium tolérants à la trinitrine, principalement au niveau de la média. La quantité d'ERO a été évaluée par fluorescence, à l'aide de la dihydroéthidine. Sur des coupes de tissus, cette technique présente l'avantage de pouvoir détecter les ERO *in situ*, et d'évaluer leur répartition dans les différentes tuniques vasculaires. Cette sonde est décrite comme relativement sélective pour les anions superoxydes, mais elle peut également réagir avec OH· et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Munzel et al., 2000b). Dans le présent travail, nous n'avons pas spécifiquement évalué le rôle de l'ALDH-2 dans l'effet relaxant de la trinitrine, dans la production d'ERO et dans le phénomène de tolérance. Dans le modèle d'aorte de rat isolée, il a été rapporté dans la littérature que des inhibiteurs ou des substrats d'ALDH mitochondriale inhibent l'effet relaxant de la trinitrine sur des vaisseaux 'contrôles', mais pas sur des vaisseaux 'tolérants'

(Chen et al., 2002 ; Sydow et al., 2004). Ceci suggère l'implication de l'ALDH2 dans les effets de la trinitrine (effet relaxant et tolérance) sur l'aorte isolée de rat. Néanmoins, ces données n'ont pas été confirmées dans d'autres études réalisées sur le même modèle et la sélectivité d'outils pharmacologiques utilisés pour impliquer l'ALDH-2 a été remise en question (DiFabio et al., 2003). Un autre aspect que nous n'avons pas étudié pour caractériser ce modèle est celui du rôle des anions superoxydes dans la diminution de la réponse à la trinitrine sur vaisseaux tolérants.

Sur les aortes de rats rendues tolérantes à la trinitrine, nous avons montré que l'effet relaxant du DEA-NO n'est pas affecté. Cette absence de tolérance croisée entre le trinitrine et d'autres donneurs de NO est en accord avec certaines données de la littérature, obtenues sur des modèles d'artères exposées *in vitro* à la trinitrine (Unger et al., 1993; Hasegawa et al., 1999; Miller et al., 2000; Chen et al., 2002; Chalupsky et al., 2004). Ceci indique que la voie NO/GMPc impliquée dans l'effet relaxant n'est pas altérée dans l'aorte de rat tolérante à la trinitrine. En ce sens, le modèle *in vitro* de tolérance semble différer du modèle *in vivo* dans lequel le traitement chronique à la trinitrine induit par exemple une diminution de l'activité des protéines kinases G de type 1 (Mulsch et al., 2001). Dans les aortes de rat tolérantes à la trinitrine, l'absence d'altération de l'effet relaxant du DEA-NO malgré l'augmentation d'ERO (donc probablement des anions superoxydes) suggère que le flux de NO

provenant de la décomposition spontanée du NO dans le bain d'organe excède le flux d'anions superoxydes, masquant ainsi l'influence de la dégradation de NO. Une autre hypothèse est que la production d'anions superoxydes est initialement localisée dans un compartiment cellulaire (les mitochondries par exemple, si l'on admet le rôle de l'ALDH2 mitochondriale dans la métabolisation de la trinitrine et comme source d'anions superoxydes dans des vaisseaux tolérants) où elle n'affecte pas l'activation de la guanylyl cyclase cytosolique par le NO d'origine extracellulaire. Enfin, l'absence de tolérance croisée entre trinitrine et DEA-NO suggère que c'est l'étape de biotransformation de la trinitrine qui est altérée dans les aortes de rats rendues tolérantes. En accord avec cette hypothèse, les résultats que nous avons obtenus montrent que l'élévation de la teneur en NO induite par la trinitrine est plus faible sur des vaisseaux tolérants, comparée aux vaisseaux non tolérants. Dans notre étude, la production de NO a été évaluée par résonance paramagnétique électronique à l'aide du complexe Fe-(DETC)<sub>2</sub> sous forme colloïde, comme initialement décrit par Kleschyov (Kleschyov et al., 2000a). Cette méthode permet de détecter de faibles quantités de NO dans les vaisseaux, et notamment le NO produit par l'endothélium en l'absence de stimulation par un agoniste (Kleschyov et al., 2000a). Néanmoins, dans notre étude, des concentrations élevées de trinitrine ont été utilisées pour observer une élévation détectable de NO dans l'aorte isolée de rat. Ces données sont en accord avec celles rapportées récemment (Kleschyov et al., 2003),

montrant qu'une élévation en NO ne peut être observée dans le tissu vasculaire qu'en présence de concentrations de trinitrine qui excèdent largement celles produisant en effet relaxant. Une hypothèse envisagée pour expliquer ces résultats est que l'effet relaxant de la trinitrine n'implique pas la formation intermédiaire de NO libre (Kleschyov et al., 2003). Une autre hypothèse que l'on peut avancer compte tenu des données récentes suggérant le rôle de l'ALDH2 mitochondriale est que la formation de NO à partir de la trinitrine prend place dans un compartiment cellulaire peu accessible au Fe-(DETC)<sub>2</sub> sous forme colloïde. Quoiqu'il en soit, l'hypothèse d'une altération de la biotransformation de la trinitrine en composé(s) relaxant(s) dans les aortes de rats tolérantes est supportée par les données récentes montrant une réduction de l'activité ALDH-2 au cours de la tolérance (Chen et al., 2002; Sydow et al., 2004). De plus, l'inhibition de l'activité de ALDH-2 au cours de la tolérance semble être liée à l'augmentation de la production d'ERO par les mitochondries (Sydow et al., 2004).

L'ensemble des données concernant le modèle de tolérance utilisé dans notre étude (aorte de rat dépourvue d'endothélium exposées *in vitro* à la trinitrine) indique que (1)- la tolérance à la trinitrine est associée à une augmentation d'ERO dans les cellules musculaires lisses ; (2)- il n'existe pas de tolérance croisée avec NO lui-même ; (3)- la tolérance à la trinitrine n'est pas liée à une altération de la voie de relaxation dépendante du

GMPc ; (4)- la tolérance est probablement due à une altération de la biotransformation de la trinitrine.

## **I.2. Modèle de dysfonction endothéliale induite par le traitement chronique *in vivo* à l'angiotensine II (mémoires 2 et 3)**

Pour ce travail, nous avons choisi comme modèle de dysfonction endothéliale celle induite chez le Rat, par infusion chronique *in vivo* d'Ang II. Il s'agit à l'origine d'un modèle d'hypertension artérielle systémique. Compte tenu de l'implication de l'activation du système rénine-angiotensine dans diverses situations physiopathologiques comme l'insuffisance cardiaque, l'athérosclérose, la résistance à l'insuline (Shinozaki et al., 2004) ou encore la tolérance aux dérivés nitrés (Kurz et al., 1999), les altérations vasculaires observées dans ce modèle pourraient être représentatives de nombreuses pathologies affectant le système vasculaire. Nous avons mis en place dans le laboratoire ce modèle, par ailleurs relativement bien décrit dans la littérature.

En accord avec les données apportées dans la littérature (Rajagopalan et al., 1996; Mollnau et al., 2002), les rats implantés avec une minipompe délivrant sur plusieurs jours de l'Ang II présentent une augmentation marquée de la pression artérielle systolique, mais une fréquence cardiaque inchangée. Ceci indique que l'effet hypertenseur résulte d'une augmentation des résistances périphériques. Cet effet

hypertenseur peut être prévenu par le losartan, ce qui indique l'implication de la stimulation des récepteurs AT<sub>1</sub> (Rajagopalan et al., 1996). Nous avons par ailleurs montré que le traitement chronique de 14 jours par l'Ang II induit une diminution très marquée de l'activité rénine plasmatique, ce qui est compatible avec le rétro-contrôle négatif exercé par l'Ang II sur la sécrétion de rénine par l'appareil juxtaglomérulaire, et avec l'effet inhibiteur sur la sécrétion de rénine exercé par la vasoconstriction de l'artériole afférente et la rétention sodée induites par l'Ang II.

En utilisant la dihydroéthidine comme sonde fluorescente, nous avons montré une augmentation de la quantité d'ERO dans l'aorte issue d'animaux traités de façon chronique par l'Ang II. Ceci est également en accord avec les données de la littérature, utilisant la même sonde fluorescente (Landmesser et al., 2002b), ou d'autre méthodes comme la chimioluminescence à la lucigénine (Rajagopalan et al., 1996). Le marquage *in situ* au bromure d'éthidium est observé au niveau de l'intima, de la media et de l'adventice. Le marquage peut être inhibé par le MnTMPyP (un composé SOD-mimétique perméant) mais non par la polyéthylèneglycol-catalase, ce qui indique qu'il provient de l'élévation tissulaire en anions superoxydes, et non en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le rôle de la NADPH oxydase comme source d'anions superoxydes a été mise en évidence dans ce modèle (Rajagopalan et al., 1996; Fukui et al., 1997; Oskarsson and Heistad, 1997; Pagano et al., 1997; Fukai et al., 2002; Landmesser et al., 2002b; Mollnau et al., 2002; Cai et

al., 2003). La production accrue d'ERO par la NADPH oxydase pourrait initier le phénomène de découplage de la NOS 3 (Mollnau et al., 2002; Griendling and FitzGerald, 2003). Une augmentation de l'expression de diverses sous-unités de la NADPH-oxydase ( $p22^{\text{phox}}$ ,  $gp91^{\text{phox}}$ , nox1) a été rapporté dans les artères issues d'animaux traités chroniquement par l'Ang II (Fukui et al., 1997; Mollnau et al., 2002). Dans les segments d'aortes issus de rats traités à l'Ang II, nous avons effectivement mis en évidence par immunofluorescence une augmentation du niveau d'expression de protéines  $gp91^{\text{phox}}$ -like et de la  $p22^{\text{phox}}$  (2 sous-unités transmembranaires de la NADPH oxydase porteuse des sites FAD et NADPH). D'autre part, nous avons montré que le diphenylène iodinium (un inhibiteur d'enzymes à flavines comme la NADPH oxydase) diminue le marquage au bromure d'éthidium sur les segments d'aortes provenant d'animaux traités à l'Ang II. Ces données indiquent l'implication de la NADPH oxydase comme source d'anions superoxydes dans les aortes de rats d'animaux infusés par l'Ang II, mais n'excluent pas la contribution d'autres sources.

En accord avec les données rapportées dans la littérature, une diminution de l'effet relaxant de l'acétylcholine est observée sur des anneaux d'aorte issus de rats infusés par l'Ang II. Les mécanismes responsables de cette diminution de réponse à l'acétylcholine n'ont pas été caractérisés ici, mais ils impliquent, au moins en partie, une inactivation du NO endothérial par les anions superoxydes produits en plus grande quantité par les cellules

vasculaires (Rajagopalan et al., 1996; Pagano et al., 1997; Heitzer et al., 1999; Mollnau et al., 2002; Wang et al., 2003). En effet, il a été montré que divers antioxydants, et notamment une SOD perméante (Rajagopalan et al., 1996) rétabli l'effet relaxant d'agonistes endothélium-dépendants. La présente étude montre que, contrairement à l'effet relaxant de l'acétylcholine, celui du nitroprussiate de sodium (un donneur de NO endothélium-indépendant) n'est pas modifié dans l'aorte de rats préalablement infusés à l'Ang II. Ceci contraste avec les résultats d'études précédentes montrant que le traitement chronique à l'Ang II diminue l'effet relaxant d'un autre donneur de NO, la trinitrine (mais de manière moins marquée que dans le cas de l'acétylcholine) et diminue l'expression de la guanylyl cyclase cytosolique dans l'aorte (Rajagopalan et al., 1996; Mollnau et al., 2002). Dans notre étude, l'utilisation d'une dose relativement faible d'Ang II sur une période de temps plus longue pourrait expliquer pourquoi l'effet relaxant d'un donneur de NO n'est pas affecté. D'autre part, contrairement au nitroprussiate de sodium, l'effet relaxant de la trinitrine semble impliquer l'ALDH2 dans l'aorte isolée de rat (Chen et al., 2002), l'activité de cette dernière étant inhibée par les ERO (Sydow et al., 2004). Il est possible que, dans les études rapportées par Rajagopalan et al. (1996) et Mollnau et al. (2002), l'augmentation d'ERO dans les cellules musculaires ait inhibé la biotransformation de la trinitrine, entraînant ainsi une diminution de son effet relaxant dans les artères issues d'animaux traités de manière chronique par l'Ang II. Dans notre étude, il est à noter que malgré l'augmentation d'ERO dans les cellules musculaires lisses

des aortes de rats traités par l'Ang II, l'effet relaxant du nitroprussiate de sodium n'est pas altéré. Comme évoqué précédemment, le flux de NO provenant du nitroprussiate de sodium pourrait excéder le flux d'anions superoxyde, masquant ainsi l'influence de la dégradation de NO. Une autre hypothèse est que la production d'anions superoxydes et celle de NO se situent dans des compartiments cellulaires différents, limitant ainsi l'inactivation de NO par les anions superoxydes.

L'ensemble des données concernant ce modèle indique que le traitement chronique par l' Ang II provoque (1)- une hypertension artérielle systémique ; (2)- une dysfonction endothéliale au niveau de l'aorte, sans altération de la voie de relaxation dépendante du GMPc dans le muscle lisse; (3)- une production accrue d'anions superoxydes dans toutes les tuniques vasculaires et une augmentation de l'expression des protéines gp91phox-like et de la p22<sup>phox</sup>.

## **II. Constitution de stocks mobilisables de NO par le S-nitrosoglutathion**

### **II.1. Aortes de rats dépourvues d'endothélium, tolérantes à la trinitrine (mémoire 1)**

L'existence de formes de stockage de NO peut être mise en évidence de manière fonctionnelle et étudiant, sur des vaisseaux préalablement

exposés à des donneurs de NO, l'effet d'agonistes vasoconstricteurs et l'effet de thiols de faible poids moléculaire. Les travaux réalisés dans le laboratoire, et auxquels nous avons participé pour une part, ont montré que divers vaisseaux exposés à des donneurs de NO 'S-nitrosant' présentent une hyporéactivité persistante à l'effet d'agonistes vasoconstricteurs (Alencar et al., 2003abc). De plus, l'addition de thiols de faible poids moléculaire comme la NAC (mais également la *L* ou *D*-cystéine et le glutathion) induit un effet relaxant sur ces artères, en raison de leur propriété de déplacer NO de sites de stockage. L'implication de la voie NO/GMPc dans la diminution de la réponse aux agents vasoconstricteurs et dans l'effet relaxant de la NAC a été caractérisée à l'aide de divers inhibiteurs (Alencar et al., 2003ac). D'autre part, le fait que l'effet de la NAC soit inhibé par exposition préalable du vaisseau à HgCl<sub>2</sub> suggère fortement que ces deux composés agissent par mobilisation du même stock de NO. Comme HgCl<sub>2</sub> est capable de déplacer NO des RSNO mais non des DNIC (Alencar et al., 2003c), il est probable que les stocks caractérisés à l'aide de la NAC soient sous forme de RSNO tissulaires et non de DNIC. Ceci est conforté par la démonstration que les agents S-nitrosants qui induisent une inhibition persistante du tonus vasculaire augmentent le contenu tissulaire en Cys-NO (Alencar et al., 2003ab). De plus, tout comme l'effet relaxant de la NAC, l'élévation en Cys-NO tissulaire est abolie par le HgCl<sub>2</sub> (Alencar et al., 2003a).

L'effet relaxant 'immédiat' de S-nitrosothiols est conservé sur des artères tolérantes à la trinitrine (Miller et al., 2000). Dans le présent travail, nous avons mis en évidence que la capacité du GSNO à induire une diminution persistante de la réponse contractile à la noradrénaline et un effet relaxant de la NAC sont également conservés sur des aortes de rats qui présentent une tolérance à l'effet de la trinitrine. Ces artères montrent une élévation en ERO dans les cellules musculaires lisse, mais comme discuté auparavant, les voies GMPC dépendantes conduisant à la relaxation ne sont pas affectées. Les nouvelles informations obtenues dans ce travail indiquent que, dans ce modèle, l'élévation en ERO ne semble pas affecter ni le processus de transnitrosation (transfert de NO du GSNO vers les groupements thiols tissulaires), ni les processus conduisant à la libération de NO par la NAC à partir des résidus CysNO tissulaires. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les protéines assurant le stockage de NO et la production d'ERO prennent place dans des compartiments différents. La nature et la localisation des protéines permettant le stockage de NO sont des aspects qui n'ont pas été abordés dans ce travail. Néanmoins, il est intéressant de noter que glutathion, qui s'est avéré capable de libérer NO des RSNO tissulaires tout comme la NAC dans les travaux réalisés précédemment au laboratoire, ne pénètre pas dans les cellule (Hiraishi et al., 1994; Deneke et al., 1995). Il semble donc que NO ne soit pas stocké dans les cellules, mais plutôt à leur surface (accessible au glutathion) ou sur des structures extracellulaires. Les effets obtenus dans les études précédentes menées au laboratoire avec des modificateurs des thiols

qui ne pénètrent pas dans les cellules supportent aussi cette idée (Alencar et al., 2003ab).

En résumé, l'information principale que nous avons obtenue dans cette partie du travail est que les agents S-nitrosants comme le GSNO conservent leur capacité à induire des effets inhibiteurs persistants sur la tonus vasculaire (liés à la formation de stocks mobilisables de NO) sur des artères présentant une tolérance à l'effet de la trinitrine et une augmentation du contenu en ERO.

## **II.2. Aortes de rats pourvues d'endothélium (mémoire 2)**

Les expériences menées en vue de caractériser les formes de stockage de NO et leur condition de formation avaient été toutes réalisées au laboratoire sur des artères dépourvues d'endothélium (Alencar et al, 2003abc). Les résultats que nous avons obtenus montrent que, contrairement aux aortes sans endothélium, l'exposition au GSNO n'induit pas de diminution persistante de la réponse aux agonistes vasoconstricteurs sur des aortes pourvues d'endothélium, ni d'effet relaxant de la NAC. Ces données sont comparables avec celles obtenues sur d'autre types d'artères, montrant que l'hyporéactivité persistante induite par certains S-nitrosothiols est considérablement réduite en durée , voire abolie, si l'endothélium est présent (Megson et al., 1997; Megson et al., 1999; Terluk et al., 2000). Les mécanismes

responsables de cet effet de l'endothélium ne sont pas élucidés. La production par l'endothélium d'anions superoxydes, ou la libération de facteurs endothéliaux vasoconstricteurs comme l'endothéline ou l'angiotensine II, ou dérivés des cyclooxygénases, des lipoxygénases, des cytochrome P450 paraît peu probable (Terluk et al., 2000). Dans des expériences non incluses dans ce mémoire (Sarr et al., 2003), nous avons montré que, sur des artères pourvues d'endothélium, l'inhibition de NOS, soit pendant la période d'exposition au GSNO, soit après, permet de révéler l'effet persistant du GSNO sur le tonus. Ceci suggère que la production 'basale' de NO par l'endothélium n'affecte pas la formation des stocks mobilisables de NO, mais masque l'influence du NO libéré des stocks sur le tonus vasculaire.

### **II.3. Aortes de rats présentant une dysfonction endothéliale (mémoire 2)**

Après exposition au GSNO, une diminution de l'effet constricteur de la phénylephrine et un effet relaxant de la NAC sont observés sur les anneaux d'aortes dépourvus d'endothélium provenant aussi bien de rat 'contrôles' que de rats traités à l'Ang II. Dans ce modèle également, tout comme dans celui de tolérance à la trinitrine discuté précédemment, la production accrue d'ERO ne semble donc pas affecter la formation de stocks de NO, la libération de NO à partir de ce stocks, et l'effet relaxant de celui-ci.

Un des résultats les plus importants que nous avons obtenu au cours de travail est que, contrairement aux aortes avec endothélium issues de rats 'contrôles', celles issues de rats traités à l'Ang II présentent une diminution de l'effet constricteur de la phénylephrine et un effet relaxant de la NAC et du HgCl<sub>2</sub> après exposition au GSNO. La S-nitrosation de résidus cysteine a été caractérisée plus directement dans des segments d'artères avec endothélium provenant de rats traités à l'Ang II, par immunomarquage à l'aide d'un anticorps reconnaissant des restes CysNO. Ce marquage a été aboli par HgCl<sub>2</sub>, comme attendu, et également par la NAC. Le fait que ces deux composés à la fois diminuent l'élévation en Cys-NO tissulaire et provoquent un effet relaxant dans les artères exposées au GSNO supporte bien l'idée que les Cys-NO tissulaires constituent une forme mobilisable de stockage de NO dans ces artères. L'anticorps utilisé ne reconnaît pas le GSNO jusqu'à une concentration de 1 mM (Alencar et al., 2003a). Ce même anticorps a été utilisé par le groupe de Stamler pour caractériser la formation de protéines S-nitrosées dans divers vaisseaux, sous l'influence d'une stimulation par l'acétylcholine (Gow et al., 2002). Comme nous l'avons fait ici, ces auteurs ont montré que l'immunomarquage des protéines vasculaires par cet anticorps est inhibé par le HgCl<sub>2</sub>. Egalement en accord avec les données de la littérature (Gow et al., 2002), il a été montré au laboratoire que dans l'aorte de rats, le blocage préalable des groupements thiols abolit totalement l'immunomarquage attribué aux groupements CysNO (Alencar et

al., 2003b). Ces données apportent des arguments importants quant à la sélectivité de l'anticorps utilisé pour les S-nitrosoprotéines de l'anticorps utilisé.

L'ensemble de ces données confirme la possibilité de former des stocks mobilisables de NO dans des vaisseaux présentant un niveau élevé d'ERO. Plus important encore, ils suggèrent que la dysfonction endothéliale permet de révéler l'influence de ces stocks sur les fonctions vasculaires. Les mécanismes responsables de ce démasquage n'ont pas été analysés plus avant. Néanmoins, le fait qu'à la fois la dénudation endothéliale et l'inhibition de NOS permette un tel démasquage suggère que la production de NO par l'endothélium masque l'influence du NO libéré des stocks sur la contraction vasculaire. Une observation potentiellement très importante qu'il reste également à approfondir est la diminution apparente du niveau d'anions superoxydes dans les artères pré-exposées au GSNO. Il est possible que le NO, libéré de façon continue des stocks, soit responsable de cette diminution.

### **III. Effets protecteurs des polyphénols du vin**

Les travaux réalisés montrent que l'administration par voie orale de composés polyphénoliques du vin rouge exerce chez le rat un effet protecteur contre diverses altérations vasculaires induites par infusion chronique d'Ang II. Dans cette étude, les effets des polyphénols sont observés à 150 mg/kg/jour mais non à 50 mg/kg/jour. Le fait que ces effets soient mis en évidence après administration orale (dans l'eau de boisson)

indique qu'une fraction significative des polyphénols du vin rouge atteint la circulation générale pour prévenir les effets systémiques de l'Ang II. Du fait que la concentration plasmatique en polyphénols augmente dès les 2-3 heures après leur ingestion directe, des doses relativement faibles semblent être nécessaires pour obtenir une biodisponibilité significative (Bernatova et al., 2002; Manach et al., 2003).

De nombreuses études ont porté sur l'effet antihypertenseur potentiel des composés polyphénoliques. Dans les modèles d'hypertension artérielle systémique induite par un régime 'DOCA-salt' ou par traitement chronique avec un inhibiteur de NOS (L-NAME), Soares de Moura et al. (2002) ont montré que l'administration orale d'un extrait sans alcool obtenu à partir de peaux de raisin diminue de manière significative la pression artérielle. Des travaux réalisés par d'autres groupes ont également montré que les polyphénols végétaux (Provinols) préviennent, tout au moins partiellement, l'hypertension systémique induite par le L-NAME (Pechanova et al., 2004). Des effets antihypertenseurs des polyphénols végétaux (thés noirs ou verts, chocolat) ont été rapportés dans le modèle de rats 'SHR-SP' (Negishi et al., 2004) et chez l'Homme lors d'hypertension artérielle modérée (Taubert et al., 2003). Il a récemment été rapporté que les polyphénols du vin rouge sont capables de prévenir l'hypertension chez des rats nourris au fructose, résistants à l'insuline (Al-Awwadi et al., 2004). Il est intéressant de noter que les altérations vasculaires observées dans ce dernier modèle semblent résulter

pour une grande part de l'activation du système rénine-angiotensine (Shinozaki et al., 2004).

Dans notre étude, l'effet des polyphénols du vin rouge a été évalué sur la fonction endothéliale. Les résultats obtenus montrent que l'effet vasorelaxant 'immédiat' de ces composés sur l'aorte de rat isolée, caractérisé précédemment dans ce modèle comme étant endothélium et NO-dépendants (Andriambeloson et al., 1997), n'est que faiblement diminué par le traitement à l'Ang II. Ils montrent également que la diminution de l'effet relaxant de l'acétylcholine sur des aortes de rats infusés à l'Ang II peut être complètement rétabli par les polyphénols du vin administrés par voie orale avant l'infusion d'Ang II. Cet effet des polyphénols est spécifique, dans la mesure où leur administration ne modifie ni l'effet relaxant de l'acétylcholine sur des aortes 'contrôles', ni l'effet relaxant du nitroprussiate de sodium (SNP) sur des aortes 'contrôles' ou celles issues de rats prétraités à l'Ang II. Les mécanismes qui sous-tendent l'effet bénéfique de l'administration des polyphénols du vin sur la dysfonction endothéliale et l'hypertension systémiques induites par l'Ang II pourraient impliquer divers mécanismes, comme par exemple l'inhibition de la production de facteurs vasoconstricteurs par les cellules vasculaires, ou l'augmentation de la production ou de la biodisponibilité de facteurs vasodilatateurs (Stoclet et al., 2004).

Cette étude montre que le traitement chronique par l'Ang II est associé à une augmentation de l'expression des composants gp91phox-like et p22phox dans l'aorte, concomitante à l'élévation d'anions superoxydes dans ce tissu. Différentes études ont montré le rôle des isoformes de nox comme source d'ERO dans la dysfonction endothéliale induite par l'Ang II (Wingler et al., 2001). Il a aussi été montré dans différents modèles d'hypertension systémique que des inhibiteurs de NADPH oxydases (diphényle iodinium, apocynine) diminuent la production d'anions superoxydes (Ulker et al., 2003), de même que la superoxyde dismutase (SOD) encapsulée dans des liposomes (Rajagopalan et al., 1996), la vitamine C et la vitamine E (Ulker et al., 2003) et divers autres agents antioxydants de synthèse (Cuzzocrea et al., 2004). La présente étude apporte l'information nouvelle que les polyphénols du vin sont capables, après administration orale, de prévenir l'augmentation de l'expression vasculaire des composants gp91phox-like et p22phox dans un modèle d'hypertension associée à une dysfonction endothéliale. De plus, cet effet est associé à une diminution de la production vasculaire d'ERO et à une amélioration de la fonction endothéliale. L'ensemble de ces données indiquent que l'effet 'antioxydant' des composés polyphénoliques du vin peut découler non seulement d'un effet direct (du fait de la capacité des polyphénols à capter les ERO), mais également d'une diminution de l'expression d'enzymes qui produisent ces ERO dans la paroi vasculaire. L'effet des polyphénols du vin sur l'expression des composants de la NADPH oxydase est similaire de celui des polyphénols du thé vert et du thé noir, qui

diminuent l'expression des sous-unités p22phox et p67phox dans les cellules endothéliales (Ying et al., 2003). Ils sont également à rapprocher des résultats rapportés chez le rat 'SP-SHR', qui montrent que les effets bénéfiques de la vitamine C et de la vitamine E sont associés à une diminution de l'activation de la NADPH oxydase vasculaire (Chen et al., 2001). La contribution de l'augmentation de la biodisponibilité vasculaire en NO (consécutive à la diminution du stress oxydant) dans ces effets des polyphénols reste à déterminer.

## **CHAPITRE 5**

# **Conclusion générale - Perspectives**

L'objectif général de ce travail de thèse était d'évaluer l'intérêt, en vue de prévenir et/ou de limiter l'évolution de certains désordres touchant le système vasculaire, d'augmenter la biodisponibilité en NO. Sur la base des travaux antérieurs menés dans le laboratoire, deux voies ont été explorées au niveau expérimental : celles de la formation de stocks mobilisables de NO dans la paroi vasculaire, et celle des mécanismes des effets potentiellement protecteurs des polyphénols du vin rouge sur le système vasculaire.

Les principales informations que nous avons obtenues indiquent que la capacité de certains donneurs de NO à induire une diminution persistante du tonus vasculaire (liée à la formation de stocks mobilisables de NO dans la paroi vasculaire) est conservée sur des artères qui présentent une tolérance à l'effet de la trinitrine, et sur celles présentant une dysfonction endothéliale. Ces artères montrent une élévation en ERO, mais celle-ci ne semble affecter ni le processus de transnitrosation, ni les processus conduisant à la libération de NO à partir des résidus CysNO tissulaires. Une des observations majeures de ce travail est que la dysfonction endothéliale permet de révéler l'influence des stocks de NO sur le tonus vasculaire. Ceci laisse envisager la possibilité d'obtenir des effets du NO, ciblés et longue durée, aux endroits affectés par la dysfonction endothéliale, et ainsi rétablir l'effet protecteur du NO à ce niveau. De nombreux points restent encore à explorer plus en détail, comme les conditions et les conséquences de la formation de stocks de NO *in vivo*. Une observation potentiellement importante qu'il reste à confirmer et

à approfondir est l'association entre la formation de stocks de NO et la diminution du niveau d'anions superoxydes dans les artères. Ceci pourrait être lié à l'effet 'antioxydant' du NO libéré des stocks et avoir des conséquences très importantes pour l'homéostasie vasculaire, comme cela a été rapporté avec le NO d'origine endothéliale. L'analyse du rôle des stocks de NO sur d'autres fonctions que la régulation du tonus est également un sujet important à aborder, de même que l'identification de la nature et du rôle des protéines S-nitrosées servant au stockage de NO dans les vaisseaux.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont également permis d'apporter des informations nouvelles sur les effets vasculaires des polyphénols du vin rouge. L'amélioration de la fonction endothéliale, associée à une diminution en ERO et à une diminution de l'expression de certaines sous-unités de la NADPH oxydase dans la paroi vasculaire sont des nouveaux mécanismes mis en évidence dans ce travail, par lesquels les polyphénols du vin rouge pourraient exercer des effets protecteurs sur le système cardiovasculaire. Un des atouts du modèle utilisé pour mettre en évidence ces effets des polyphénols réside dans le fait qu'il s'agit d'un modèle dans lequel non seulement l'induction de la dysfonction endothéliale, mais aussi l'administration de polyphénols sont réalisées *in vivo*. Les cibles et les mécanismes par lesquels les polyphénols du vin rouge exercent ces effets protecteurs dans ce modèle restent à explorer, de même que la nature des polyphénols responsables de ces effets. Les effets vasculo-

protecteurs des polyphénols pourraient être également liés à leur capacité de prévenir l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Frankel et al., 1993; Miyagi et al., 1997), l'adhésion et l'agrégation plaquettaires (Wollny et al., 1999; Wang et al., 2002b), la migration et la prolifération cellulaire (Iijima et al., 2000; Iijima et al., 2002). Les polyphénols du vin peuvent aussi prévenir l'expression de facteurs pro-athérosclérotiques et pro-thrombotiques tels que le *monocyte chemoattractant protein-1*, le facteur de croissance vasculaire d'origine endothéliale et le facteur tissulaire (Feng et al., 1999; Pendurthi et al., 1999; Carluccio et al., 2003; Oak et al., 2003). Enfin, les polyphénols du vin sont de puissants stimulateurs de formation endothéliale de NO et du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF), qui jouent un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie vasculaire (Mombouli and Vanhoutte, 1999; Busse et al., 2002).

## REFERENCES

- Abeywardena MY and Head RJ (2001) Dietary polyunsaturated fatty acid and antioxidant modulation of vascular dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **65**:91-97.
- Adamopoulos S, Parissis JT and Kremastinos DT (2002) Endothelial dysfunction in chronic heart failure: clinical and therapeutic implications. *Eur J Intern Med* **13**:233-239.
- Ahern GP, Klyachko VA and Jackson MB (2002) cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci* **25**:510-517.
- Ahlers BA, Parnell MM, Chin-Dusting JP and Kaye DM (2004) An age-related decline in endothelial function is not associated with alterations in L-arginine transport in humans. *J Hypertens* **22**:321-327.
- Ahlner J, Andersson RG, Torfgard K and Axelsson KL (1991) Organic nitrate esters: clinical use and mechanisms of actions. *Pharmacol Rev* **43**:351-423.
- Ahmad N and Mukhtar H (1999) Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. *Nutr Rev* **57**:78-83.
- Al-Awwadi NA, Bornet A, Azay J, Araiz C, Delbosc S, Cristol JP, Linck N, Cros G and Teissedre PL (2004) Red wine polyphenols alone or in association with ethanol prevent hypertension, cardiac hypertrophy, and production of reactive oxygen species in the insulin-resistant fructose-fed rat. *J Agric Food Chem* **52**:5593-5597.
- Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH and van Goor H (2003) Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* **199**:8-17.
- Alencar JL, Chalupsky K, Sarr M, Schini-Kerth V, Vanin AF, Stoclet JC and Muller B (2003a) Inhibition of arterial contraction by dinitrosyl-iron complexes: critical role of the thiol ligand in determining rate of nitric oxide (NO) release and formation of releasable NO stores by S-nitrosation. *Biochem Pharmacol* **66**:2365-2374.
- Alencar JL, Lobysheva I, Chalupsky K, Geffard M, Nepveu F, Stoclet JC and Muller B (2003b) S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. *J Pharmacol Exp Ther* **307**:152-159.
- Alencar JL, Lobysheva I, Geffard M, Sarr M, Schott C, Schini-Kerth VB, Nepveu F, Stoclet JC and Muller B (2003c) Role of S-nitrosation of cysteine residues in long-lasting inhibitory effect of nitric oxide on arterial tone. *Mol Pharmacol* **63**:1148-1158.
- Al-Sa'doni HH, Megson IL, Bisland S, Butler AR and Flitney FW (1997) Neocuproine, a selective Cu(I) chelator, and the relaxation of rat vascular smooth muscle by S-nitrosothiols. *Br J Pharmacol* **121**:1047-1050.
- Andrasi TB, Soos P, Bakos G, Stumpf N, Blazovics A, Hagl S and Szabo G (2003) L-arginine protects the mesenteric vascular circulation against cardiopulmonary bypass-induced vascular dysfunction. *Surgery* **134**:72-79.
- Andrawis N, Jones DS and Abernethy DR (2000) Aging is associated with endothelial dysfunction in the human forearm vasculature. *J Am Geriatr Soc* **48**:193-198.
- Andrew PJ and Mayer B (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* **43**:521-531.
- Andrews NP, Prasad A and Quyyumi AA (2001) N-acetylcysteine improves coronary and peripheral vascular function. *J Am Coll Cardiol* **37**:117-123.
- Andriambeloson E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC and Andriantsitohaina R (1997) Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br J Pharmacol* **120**:1053-1058.

- Angulo J, Cuevas P, Fernandez A, Gabancho S, Allona A, Martin-Morales A, Moncada I, Videla S and Saenz de Tejada I (2003) Diabetes impairs endothelium-dependent relaxation of human penile vascular tissues mediated by NO and EDHF. *Biochem Biophys Res Commun* **312**:1202-1208.
- Archer SL, Reeve HL, Michelakis E, Puttagunta L, Waite R, Nelson DP, Dinauer MC and Weir EK (1999) O<sub>2</sub> sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:7944-7949.
- Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B and Rami J (1999) Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci* **55**:1078-1087.
- Arnelle DR and Stamler JS (1995) NO+, NO, and NO- donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch Biochem Biophys* **318**:279-285.
- Auger C, Caporiccio B, Landrault N, Teissedre PL, Laurent C, Cros G, Besancon P and Rouanet JM (2002) Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein B and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Nutr* **132**:1207-1213.
- Badimon L, Badimon JJ, Penny W, Webster MW, Chesebro JH and Fuster V (1992) Endothelium and atherosclerosis. *J Hypertens Suppl* **10**:S43-50.
- Barton M (2000) Endothelial dysfunction and atherosclerosis: endothelin receptor antagonists as novel therapeutics. *Curr Hypertens Rep* **2**:84-91.
- Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M, Rohrbach S, Katz SE, Douglas PS and Lorell BH (2000) Chronic N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension : novel molecular adaptation to systolic load in absence of hypertrophy. *Circulation* **101**:423-429.
- Bassenge E, Fink N, Skatchkov M and Fink B (1998) Dietary supplement with vitamin C prevents nitrate tolerance. *J Clin Invest* **102**:67-71.
- Basso N and Terragno NA (2001) History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension* **38**:1246-1249.
- Bell DM, Johns TE and Lopez LM (1998) Endothelial dysfunction: implications for therapy of cardiovascular diseases. *Ann Pharmacother* **32**:459-470.
- Bennett BM, McDonald BJ, Nigam R and Simon WC (1994) Biotransformation of organic nitrates and vascular smooth muscle cell function. *Trends Pharmacol Sci* **15**:245-249.
- Bentzon JF, Skovengborg E, Hansen C, Moller J, de Gaulejac NS, Proch J and Falk E (2001) Red wine does not reduce mature atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **103**:1681-1687.
- Beretz A, Cazenave JP and Anton R (1982) Inhibition of aggregation and secretion of human platelets by quercetin and other flavonoids: structure-activity relationships. *Agents Actions* **12**:382-387.
- Bernatova I, Pechanova O, Babal P, Kysela S, Stvrtina S and Andriantsitohaina R (2002) Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO- deficient hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**:H942-948.
- Beswick RA, Dorrance AM, Leite R and Webb RC (2001) NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension* **38**:1107-1111.
- Bilgen I, Oner G and Eren E (2003) Dietary L-arginine restores aspirin-induced endothelial dysfunction in rat aorta. *Arch Physiol Biochem* **111**:232-238.
- Boesgaard S, Aldershvile J, Poulsen HE, Loft S, Anderson ME and Meister A (1994) Nitrate tolerance in vivo is not associated with depletion of arterial or venous thiol levels. *Circ Res* **74**:115-120.

- Boger RH (2003) The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* **59**:824-833.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ and Cohen RA (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* **368**:850-853.
- Boucher JL, Genet A, Vadon S, Delafurge M, Henry Y and Mansuy D (1992a) Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N omega-hydroxy-L-arginine by NADPH and O<sub>2</sub> to nitric oxide and citrulline. *Biochem Biophys Res Commun* **187**:880-886.
- Boucher JL, Genet A, Vadon S, Delafurge M and Mansuy D (1992b) Formation of nitrogen oxides and citrulline upon oxidation of N omega-hydroxy-L-arginine by heme proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **184**:1158-1164.
- Boulanger C, Schini VB, Moncada S and Vanhoutte PM (1990) Stimulation of cyclic GMP production in cultured endothelial cells of the pig by bradykinin, adenosine diphosphate, calcium ionophore A23187 and nitric oxide. *Br J Pharmacol* **101**:152-156.
- Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Levy BI and Vanhoutte PM (1998) Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res* **83**:1271-1278.
- Bouloumié A, Schini-Kerth VB and Busse R (1999) Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc Res* **41**:773-780.
- Bousette N and Giard A (2003) Endothelin-1 in atherosclerosis and other vasculopathies. *Can J Physiol Pharmacol* **81**:578-587.
- Braun M, Grosser T and Schror K (1995) Bioactivation of nitroglycerin in vascular smooth muscle cells is different from that in non-vascular tissue. *Eur J Pharmacol* **276**:239-245.
- Brennan LA, Steinhorn RH, Wedgwood S, Mata-Greenwood E, Roark EA, Russell JA and Black SM (2003) Increased superoxide generation is associated with pulmonary hypertension in fetal lambs: a role for NADPH oxidase. *Circ Res* **92**:683-691.
- Brown MD (1999) Green tea (*Camellia sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer. *Altern Med Rev* **4**:360-370.
- Bunting S, Gryglewski R, Moncada S and Vane JR (1976) Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins* **12**:897-913.
- Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM and Weston AH (2002) EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* **23**:374-380.
- Busse R and Fleming I (1996) Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res* **33**:181-194.
- Butler AR, Flitney FW and Williams DL (1995) NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci* **16**:18-22.
- Cai H, Griendling KK and Harrison DG (2003) The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* **24**:471-478.
- Cai H and Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* **87**:840-844.
- Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distante A and De Caterina R (2003) Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit

- endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**:622-629.
- Carr AC, Zhu BZ and Frei B (2000) Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res* **87**:349-354.
- Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP and Weiner CP (2000) Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* **184**:409-420.
- Castro AF, Amorena C, Muller A, Ottaviano G, Tellez-Inon MT and Taquini AC (1998) Extracellular ATP and bradykinin increase cGMP in vascular endothelial cells via activation of PKC. *Am J Physiol* **275**:C113-119.
- Ceriello A, Keaney JF, Jr. and Vita JA (1999) Vitamin C and endothelial dysfunction: what is new? *Circulation* **99**:1273-1274.
- Chalupsky K, Lobysheva I, Nepveu F, Gadea I, Beranova P, Entlicher G, Stoclet JC and Muller B (2004) Relaxant effect of oxime derivatives in isolated rat aorta: role of nitric oxide (NO) formation in smooth muscle. *Biochem Pharmacol* **67**:1203-1214.
- Chataigneau T, Ndiaye M and Schini-Kerth VB (2003) Effets vasodilatateurs des composés polyphénoliques du vin : rôle du NO et EDHF. *Sang Thrombose Vaisseaux* **15**:433-441.
- Chen AF, O'Brien T and Katusic ZS (1998) Transfer and expression of recombinant nitric oxide synthase genes in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci* **19**:276-286.
- Chen X, Touyz RM, Park JB and Schiffri EL (2001) Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* **38**:606-611.
- Chen Z, Zhang J and Stamler JS (2002) Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:8306-8311.
- Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR and Kemp BE (1999) AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* **443**:285-289.
- Ciani E, Baldinotti I and Contestabile A (2001) Sustained, long-lasting inhibition of nitric oxide synthase aggravates the neural damage in some models of excitotoxic brain injury. *Brain Res Bull* **56**:29-35.
- Cosentino F, Barker JE, Brand MP, Heales SJ, Werner ER, Tippins JR, West N, Channon KM, Volpe M and Luscher TF (2001) Reactive oxygen species mediate endothelium-dependent relaxations in tetrahydrobiopterin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**:496-502.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Di Paola R, Caputi AP and Salvemini D (2004) Superoxide: a key player in hypertension. *Faseb J* **18**:94-101.
- da Luz PL, Serrano Junior CV, Chacra AP, Monteiro HP, Yoshida VM, Furtado M, Ferreira S, Gutierrez P and Pileggi F (1999) The effect of red wine on experimental atherosclerosis: lipid-independent protection. *Exp Mol Pathol* **65**:150-159.
- Daiber A, Oelze M, Coldewey M, Bachschmid M, Wenzel P, Sydow K, Wendt M, Kleschyov AL, Stalleicken D, Ullrich V, Mulsch A and Munzel T (2004) Oxidative Stress and Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase Activity: A Comparison of Pentaerythrityl Tetranitrate (PETN) with Other Organic Nitrates. *Mol Pharmacol*.
- Davignon J and Ganz P (2004) Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* **109**:III27-32.
- De Garavilla L, Pagani ED, Buchholz RA, Dundore R, Bode DC, Volberg ML, Jackson KN, Pratt P and Silver PJ (1996) Zaprinast, but not dipyridamole, reverses hemodynamic tolerance to nitroglycerin in vivo. *Eur J Pharmacol* **313**:89-96.

- Dell'Agli M, Busciale A and Bosisio E (2004) Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Res* **63**:593-602.
- Deneke SM, Susanto I, Vogel KA, Williams CE and Lawrence RA (1995) Mechanisms of use of extracellular glutathione by lung epithelial cells and pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **12**:662-668.
- DiFabio J, Ji Y, Vasilious V, Thatcher GR and Bennett BM (2003) Role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitrate tolerance. *Mol Pharmacol* **64**:1109-1116.
- Dikalov S, Fink B, Skatchkov M and Bassenge E (1999) Comparison of glyceryl trinitrate-induced with pentaerythrityl tetranitrate-induced in vivo formation of superoxide radicals: effect of vitamin C. *Free Radic Biol Med* **27**:170-176.
- Dikalov S, Fink B, Skatchkov M, Sommer O and Bassenge E (1998a) Formation of Reactive Oxygen Species in Various Vascular Cells During Glyceryltrinitrate Metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **3**:51-62.
- Dikalov S, Fink B, Skatchkov M, Stalleicken D and Bassenge E (1998b) Formation of reactive oxygen species by pentaerithryltetranitrate and glyceryl trinitrate in vitro and development of nitrate tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* **286**:938-944.
- Dikalov S, Grigor'ev IA, Voinov M and Bassenge E (1998c) Detection of superoxide radicals and peroxynitrite by 1-hydroxy-4-phosphonoxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine: quantification of extracellular superoxide radicals formation. *Biochem Biophys Res Commun* **248**:211-215.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R and Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**:601-605.
- Dobrian AD, Schriver SD and Prewitt RL (2001) Role of angiotensin II and free radicals in blood pressure regulation in a rat model of renal hypertension. *Hypertension* **38**:361-366.
- Ducrocq C, Servy C, Cudic M and Blanchard EB (2001) [Intervention by nitric oxide, NO, and its oxide derivatives particularly in mammals]. *Can J Physiol Pharmacol* **79**:95-102.
- Ellis A and Triggle CR (2003) Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol* **81**:1013-1028.
- Enseleit F, Hurlmann D and Luscher TF (2001) Vascular protective effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and their relation to clinical events. *J Cardiovasc Pharmacol* **37 Suppl 1**:S21-30.
- Fang JC, Kinlay S, Beltrame J, Hikiti H, Wainstein M, Behrendt D, Suh J, Frei B, Mudge GH, Selwyn AP and Ganz P (2002) Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomised trial. *Lancet* **359**:1108-1113.
- Fayers KE, Cummings MH, Shaw KM and Laight DW (2003) Nitrate tolerance and the links with endothelial dysfunction and oxidative stress. *Br J Clin Pharmacol* **56**:620-628.
- Feelisch M (1998) The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **358**:113-122.
- Feelisch M, Ostrowski J and Noack E (1989) On the mechanism of NO release from sydnonimines. *J Cardiovasc Pharmacol* **14 Suppl 11**:S13-22.
- Feng AN, Chen YL, Chen YT, Ding YZ and Lin SJ (1999) Red wine inhibits monocyte chemotactic protein-1 expression and modestly reduces neointimal hyperplasia after balloon injury in cholesterol-Fed rabbits. *Circulation* **100**:2254-2259.
- Fleming I and Busse R (1999) Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* **43**:532-541.

- Fleming I, Schulz C, Fichtlscherer B, Kemp BE, Fisslthaler B and Busse R (2003) AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates the insulin-induced activation of the nitric oxide synthase in human platelets. *Thromb Haemost* **90**:863-871.
- Forstermann U, Boissel JP and Kleinert H (1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *Faseb J* **12**:773-790.
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E and Kinsella JE (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* **341**:454-457.
- Frei B (1999) On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. *Proc Soc Exp Biol Med* **222**:196-204.
- Fukai T, Folz RJ, Landmesser U and Harrison DG (2002) Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* **55**:239-249.
- Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Qt, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN and Griendlung KK (1997) p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res* **80**:45-51.
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A and Sessa WC (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**:597-601.
- Fung HL and Bauer JA (1994) Mechanisms of nitrate tolerance. *Cardiovasc Drugs Ther* **8**:489-499.
- Fung HL, Chong S, Kowaluk E, Hough K and Kakemi M (1988) Mechanisms for the pharmacologic interaction of organic nitrates with thiols. Existence of an extracellular pathway for the reversal of nitrate vascular tolerance by N-acetylcysteine. *J Pharmacol Exp Ther* **245**:524-530.
- Furchtgott RF and Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**:373-376.
- Gallis B, Corthals GL, Goodlett DR, Ueba H, Kim F, Presnell SR, Figeys D, Harrison DG, Berk BC, Aebersold R and Corson MA (1999) Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *J Biol Chem* **274**:30101-30108.
- Gaston B, Reilly J, Drazen JM, Fackler J, Ramdev P, Arnelle D, Mullins ME, Sugarbaker DJ, Chee C, Singel DJ and et al. (1993) Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:10957-10961.
- German JB and Walzem RL (2000) The health benefits of wine. *Annu Rev Nutr* **20**:561-593.
- Goligorsky MS, Li H, Brodsky S and Chen J (2002) Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**:F1-10.
- Gordge MP, Hothersall JS, Neild GH and Dutra AA (1996) Role of a copper (I)-dependent enzyme in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione. *Br J Pharmacol* **119**:533-538.
- Gori T and Parker JD (2002) The puzzle of nitrate tolerance: pieces smaller than we thought? *Circulation* **106**:2404-2408.
- Goto K, Fujii K, Onaka U, Abe I and Fujishima M (2000) Renin-angiotensin system blockade improves endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertension* **36**:575-580.
- Govers R and Rabelink TJ (2001) Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**:F193-206.

- Gow AJ, Chen Q, Hess DT, Day BJ, Ischiropoulos H and Stamler JS (2002) Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. *J Biol Chem* **277**:9637-9640.
- Griendling KK and FitzGerald GA (2003) Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* **108**:2034-2040.
- Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B and Ushio-Fukai M (2000a) Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**:2175-2183.
- Griendling KK, Sorescu D and Ushio-Fukai M (2000b) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* **86**:494-501.
- Gronbaek M (2000) Wine and mortality. Evidence for causal inference? *Dan Med Bull* **47**:271-282.
- Gronbaek M, Becker U, Johansen D, Gottschau A, Schnohr P, Hein HO, Jensen G and Sorensen TI (2000) Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer. *Ann Intern Med* **133**:411-419.
- Gruetter CA and Lemke SM (1985) Dissociation of cysteine and glutathione levels from nitroglycerin-induced relaxation. *Eur J Pharmacol* **111**:85-95.
- Gutterman DD (1999) Adventitia-dependent influences on vascular function. *Am J Physiol* **277**:H1265-1272.
- Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R and Channon KM (2002) Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **105**:1656-1662.
- Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R and Channon KM (2000) Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* **86**:E85-90.
- Hacker A, Muller S, Meyer W and Kojda G (2001) The nitric oxide donor pentaerythritol tetranitrate can preserve endothelial function in established atherosclerosis. *Br J Pharmacol* **132**:1707-1714.
- Haj-Yehia AI and Benet LZ (1996) In vivo depletion of free thiols does not account for nitroglycerin-induced tolerance: a thiol-nitrate interaction hypothesis as an alternative explanation for nitroglycerin activity and tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* **278**:1296-1305.
- Hasegawa K, Taniguchi T, Takakura K, Goto Y and Muramatsu I (1999) Possible involvement of nitroglycerin converting step in nitroglycerin tolerance. *Life Sci* **64**:2199-2206.
- Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A and Aviram M (1997) Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**:2744-2752.
- Heitzer T, Just H and Munzel T (1996) Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* **94**:6-9.
- Heitzer T, Wenzel U, Hink U, Krollner D, Skatchkov M, Stahl RA, MacHarzina R, Brasen JH, Meinertz T and Munzel T (1999) Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int* **55**:252-260.

- Henrion D, Dowell FJ, Levy BI and Michel JB (1996) In vitro alteration of aortic vascular reactivity in hypertension induced by chronic NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Hypertension* **28**:361-366.
- Hermann M, Kapiotis S, Hofbauer R, Exner M, Seelos C, Held I and Gmeiner B (1999) Salicylate inhibits LDL oxidation initiated by superoxide/nitric oxide radicals. *FEBS Lett* **445**:212-214.
- Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U and Munzel T (2001) Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* **88**:E14-22.
- Hiraishi H, Terano A, Ota S, Mutoh H, Sugimoto T, Harada T, Razandi M and Ivey KJ (1994) Protection of cultured rat gastric cells against oxidant-induced damage by exogenous glutathione. *Gastroenterology* **106**:1199-1207.
- Hirata K, Kuroda R, Sakoda T, Katayama M, Inoue N, Suematsu M, Kawashima S and Yokoyama M (1995) Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C. *Hypertension* **25**:180-185.
- Hofmann F, Ammendola A and Schlossmann J (2000) Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* **113 ( Pt 10)**:1671-1676.
- Hogg N (2000) Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Radic Biol Med* **28**:1478-1486.
- Hogg N, Darley-Usmar VM, Wilson MT and Moncada S (1992) Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J* **281 ( Pt 2)**:419-424.
- Holtz J, Munzel T, Stewart DJ and Bassenge E (1989) Nitrate action on epicardial coronary arteries and tolerance: new aspects based on longterm glyceryl trinitrate infusions in dogs. *Eur Heart J* **10 Suppl F**:127-133.
- Hopper L, Ness A, Higgins JP, Moore T and Ebrahim S (1999) GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* **354**:1557.
- Hornig B (2002) Vitamins, antioxidants and endothelial function in coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther* **16**:401-409.
- Hornig B, Arakawa N and Drexler H (1998a) Effect of ACE inhibition on endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* **19 Suppl G**:G48-53.
- Hornig B, Arakawa N, Kohler C and Drexler H (1998b) Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* **97**:363-368.
- Horowitz JD, Antman EM, Lorell BH, Barry WH and Smith TW (1983) Potentiation of the cardiovascular effects of nitroglycerin by N-acetylcysteine. *Circulation* **68**:1247-1253.
- Hu S, Sheng WS, Peterson PK and Chao CC (1995) Cytokine modulation of murine microglial cell superoxide production. *Glia* **13**:45-50.
- Hughes MN (1999) Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta* **1411**:263-272.
- Hutchison S (1998) Smoking as a risk factor for endothelial dysfunction. *Can J Cardiol* **14 Suppl D**:20D-22D.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE and Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:9265-9269.
- Ignarro LJ, Napoli C and Loscalzo J (2002) Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. *Circ Res* **90**:21-28.

- Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Akishita M, Kozaki K, Ako J, Watanabe T, Ohike Y, Son B, Yu J, Nakahara K and Ouchi Y (2002) Red wine polyphenols inhibit vascular smooth muscle cell migration through two distinct signaling pathways. *Circulation* **105**:2404-2410.
- Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Kim S, Eto M, Ako J, Liang YQ, Sudoh N, Hosoda K, Nakahara K, Toba K and Ouchi Y (2000) Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation* **101**:805-811.
- Inoue N, Ohara Y, Fukai T, Harrison DG and Nishida K (1998) Probucol improves endothelial-dependent relaxation and decreases vascular superoxide production in cholesterol-fed rabbits. *Am J Med Sci* **315**:242-247.
- Jensen DE, Belka GK and Du Bois GC (1998) S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochem J* **331 ( Pt 2)**:659-668.
- Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J and Stamler JS (1996) S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* **380**:221-226.
- Jiang JL, Li Ns NS, Li YJ and Deng HW (2002) Probucol preserves endothelial function by reduction of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor level. *Br J Pharmacol* **135**:1175-1182.
- John S and Schmieder RE (2000) Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and differences. *J Hypertens* **18**:363-374.
- Jourd'heuil D, Hallen K, Feelisch M and Grisham MB (2000) Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood. *Free Radic Biol Med* **28**:409-417.
- Kanagy NL, Charpie JR, Dananberg J and Webb RC (1996) Decreased sensitivity to vasoconstrictors in aortic rings after acute exposure to nitric oxide. *Am J Physiol* **271**:H253-260.
- Katsuki S, Arnold W, Mittal C and Murad F (1977) Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res* **3**:23-35.
- Kawada N, Imai E, Karber A, Welch WJ and Wilcox CS (2002) A mouse model of angiotensin II slow pressor response: role of oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* **13**:2860-2868.
- Kawashima S and Yokoyama M (2004) Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**:998-1005.
- Keefer LK, Flippen-Anderson JL, George C, Shanklin AP, Dunams TM, Christodoulou D, Saavedra JE, Sagan ES and Bohle DS (2001) Chemistry of the diazeniumdiolates. I. Structural and spectral characteristics of the [N(O)NO]- functional group. *Nitric Oxide* **5**:377-394.
- Kim D, Rybalkin SD, Pi X, Wang Y, Zhang C, Munzel T, Beavo JA, Berk BC and Yan C (2001) Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance. *Circulation* **104**:2338-2343.
- Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Ito K, Shimokawa H and Takeshita A (2004) Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation* **109**:2357-2362.
- Kitamoto S, Egashira K, Kataoka C, Usui M, Koyanagi M, Takemoto M and Takeshita A (2000) Chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats increases aortic superoxide anion production via the action of angiotensin II. *J Hypertens* **18**:1795-1800.

- Klatt P, Schmidt K, Uray G and Mayer B (1993) Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterization, cofactor-requirement, and the role of N omega-hydroxy-L-arginine as an intermediate. *J Biol Chem* **268**:14781-14787.
- Kleschyov AL, Mollnau H, Oelze M, Meinertz T, Huang Y, Harrison DG and Munzel T (2000a) Spin trapping of vascular nitric oxide using colloid Fe(II)-diethyldithiocarbamate. *Biochem Biophys Res Commun* **275**:672-677.
- Kleschyov AL, Muller B, Keravis T, Stoeckel ME and Stoclet JC (2000b) Adventitia-derived nitric oxide in rat aortas exposed to endotoxin: cell origin and functional consequences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**:H2743-2751.
- Kleschyov AL, Muller B, Schott C and Stoclet JC (1998) Role of adventitial nitric oxide in vascular hyporeactivity induced by lipopolysaccharide in rat aorta. *Br J Pharmacol* **124**:623-626.
- Kleschyov AL, Oelze M, Daiber A, Huang Y, Mollnau H, Schulz E, Sydow K, Fichtlscherer B, Mulsch A and Munzel T (2003) Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin? *Circ Res* **93**:e104-112.
- Kloss S, Bouloumié A and Mulsch A (2000) Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* **35**:43-47.
- Kroll J and Waltenberger J (1998) VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun* **252**:743-746.
- Kurz S, Hink U, Nickenig G, Borthayre AB, Harrison DG and Munzel T (1999) Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in nitrate tolerance. *Circulation* **99**:3181-3187.
- Lambert JD and Yang CS (2003) Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutat Res* **523-524**:201-208.
- Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD and Marnett LJ (1996) Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:15069-15074.
- Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM and Harrison DG (2002a) Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* **40**:511-515.
- Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE and Harrison DG (2003) Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* **111**:1201-1209.
- Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B and Drexler H (2002b) Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* **106**:3073-3078.
- Landrault N, Poucheret P, Ravel P, Gasc F, Cros G and Teissedre PL (2001) Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J Agric Food Chem* **49**:3341-3348.
- Lassegue B and Clempus RE (2003) Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**:R277-297.
- Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD and Griendling KK (2001) Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* **88**:888-894.

- Laursen JB, Boesgaard S, Trautner S, Rubin I, Poulsen HE and Aldershvile J (2001) Endothelium-dependent vasorelaxation is inhibited by in vivo depletion of vascular thiol levels: role of endothelial nitric oxide synthase. *Free Radic Res* **35**:387-394.
- Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA and Harrison DG (1997) Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* **95**:588-593.
- Lee MC, Shoji H, Miyazaki H, Yoshino F, Hori N, Toyoda M, Ikeda Y, Anzai K, Ikota N and Ozawa T (2004) Assessment of Oxidative Stress in the Spontaneously Hypertensive Rat Brain Using Electron Spin Resonance (ESR) Imaging and in Vivo L-Band ESR. *Hypertens Res* **27**:485-492.
- Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM and Dirsch VM (2002) Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* **106**:1614-1617.
- Leopold JA and Loscalzo J (2003) Organic nitrate tolerance and endothelial dysfunction: role of folate therapy. *Minerva Cardioangiologica* **51**:349-359.
- Levy WS, Katz RJ, Ruffalo RL, Leiboff RH and Wasserman AG (1988) Potentiation of the hemodynamic effects of acutely administered nitroglycerin by methionine. *Circulation* **78**:640-645.
- Li H, Wallerath T and Forstermann U (2002a) Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* **7**:132-147.
- Li H, Wallerath T, Munzel T and Forstermann U (2002b) Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs. *Nitric Oxide* **7**:149-164.
- Li JM and Shah AM (2002) Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* **277**:19952-19960.
- Lincoln TM and Cornwell TL (1993) Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *Faseb J* **7**:328-338.
- Lincoln TM, Dey N and Sellak H (2001) Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* **91**:1421-1430.
- Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J and Stamler JS (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**:490-494.
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP and Waldman SA (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* **52**:375-414.
- Maffei A, Poulet R, Vecchione C, Colella S, Fratta L, Frati G, Trimarco V, Trimarco B and Lembo G (2002) Increased basal nitric oxide release despite enhanced free radical production in hypertension. *J Hypertens* **20**:1135-1142.
- Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C and Remesy C (2003) Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur J Clin Nutr* **57**:235-242.
- Mansuy D and Boucher JL (2002) Oxidation of N-hydroxyguanidines by cytochromes P450 and NO-synthases and formation of nitric oxide. *Drug Metab Rev* **34**:593-606.
- Marnett LJ, Wright TL, Crews BC, Tannenbaum SR and Morrow JD (2000) Regulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide is revealed by targeted deletion of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **275**:13427-13430.
- Mathews WR and Kerr SW (1993) Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* **267**:1529-1537.

- Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa Y and Takeshita A (2002) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun* **290**:909-913.
- Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H and Takeshita A (2000) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* **106**:1521-1530.
- Maxwell AJ (2002) Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases. *Nitric Oxide* **6**:101-124.
- Mayer B (2003) Bioactivation of nitroglycerin--a new piece in the puzzle. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**:388-391.
- Megson IL, Greig IR, Gray GA, Webb DJ and Butler AR (1997) Prolonged effect of a novel S-nitrosated glyco-amino acid in endothelium-denuded rat femoral arteries: potential as a slow release nitric oxide donor drug. *Br J Pharmacol* **122**:1617-1624.
- Megson IL, Morton S, Greig IR, Mazzei FA, Field RA, Butler AR, Caron G, Gasco A, Fruttero R and Webb DJ (1999) N-Substituted analogues of S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine: chemical stability and prolonged nitric oxide mediated vasodilatation in isolated rat femoral arteries. *Br J Pharmacol* **126**:639-648.
- Megson IL and Webb DJ (2002) Nitric oxide donor drugs: current status and future trends. *Expert Opin Investig Drugs* **11**:587-601.
- Merchan Herrera A, Lopez Minguez JR, Alonso Ruiz F, Escola JM, Cimbora Ortega A, Poblador Curto MA, Redondo Mendez A, Romero Santisteban R, Geniz Gallardo I, Gonzalez Fernandez R and Millan Nunez V (1999) [Reduction in the rates of restenosis after coronary angioplasty with simvastatin and probucol]. *Rev Esp Cardiol* **52**:778-784.
- Meyer JW, Holland JA, Ziegler LM, Chang MM, Beebe G and Schmitt ME (1999) Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in human endothelial cells :a potential atherogenic source of reactive oxygen species. *Endothelium* **7**:11-22.
- Michel JB (1998) [Role of endothelial nitric oxide in the regulation of the vasomotor system]. *Pathol Biol (Paris)* **46**:181-189.
- Michel T and Feron O (1997) Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* **100**:2146-2152.
- Middleton E, Jr., Kandaswami C and Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* **52**:673-751.
- Miller FJ, Jr., Guterman DD, Rios CD, Heistad DD and Davidson BL (1998) Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* **82**:1298-1305.
- Miller MR, Hanspal IS, Hadoke PW, Newby DE, Rossi AG, Webb DJ and Megson IL (2003) A novel S-nitrosothiol causes prolonged and selective inhibition of platelet adhesion at sites of vascular injury. *Cardiovasc Res* **57**:853-860.
- Miller MR, Roseberry MJ, Mazzei FA, Butler AR, Webb DJ and Megson IL (2000) Novel S-nitrosothiols do not engender vascular tolerance and remain effective in glyceryltrinitrate-tolerant rat femoral arteries. *Eur J Pharmacol* **408**:335-343.
- Mistry DK and Garland CJ (1998a) Characteristics of single, large-conductance calcium-dependent potassium channels (BKCa) from smooth muscle cells isolated from the rabbit mesenteric artery. *J Membr Biol* **164**:125-138.

- Mistry DK and Garland CJ (1998b) Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* **124**:1131-1140.
- Miyagi Y, Miwa K and Inoue H (1997) Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *Am J Cardiol* **80**:1627-1631.
- Mizutani K, Ikeda K, Nishikata T and Yamori Y (2000) Phytoestrogens attenuate oxidative DNA damage in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* **18**:1833-1840.
- Mohazzab HK, Kaminski PM, Agarwal R and Wolin MS (1999) Potential role of a membrane-bound NADH oxidoreductase in nitric oxide release and arterial relaxation to nitroprusside. *Circ Res* **84**:220-228.
- Molina CR, Andresen JW, Rapoport RM, Waldman S and Murad F (1987) Effect of in vivo nitroglycerin therapy on endothelium-dependent and independent vascular relaxation and cyclic GMP accumulation in rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* **10**:371-378.
- Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Forstermann U, Meinertz T, Griendlung K and Munzel T (2002) Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* **90**:E58-65.
- Mombouli JV and Vanhoutte PM (1999) Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* **31**:61-74.
- Mori T, Nagata K, Town T, Tan J, Matsui T and Asano T (2001) Intracisternal increase of superoxide anion production in a canine subarachnoid hemorrhage model. *Stroke* **32**:636-642.
- Morikawa K, Shimokawa H, Matoba T, Kubota H, Akaike T, Talukder MA, Hatanaka M, Fujiki T, Maeda H, Takahashi S and Takeshita A (2003) Pivotal role of Cu,Zn-superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. *J Clin Invest* **112**:1871-1879.
- Morley D and Keefer LK (1993) Nitric oxide/nucleophile complexes: a unique class of nitric oxide-based vasodilators. *J Cardiovasc Pharmacol* **22 Suppl 7**:S3-9.
- Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Heistad DD and Harrison DG (1991) Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* **69**:1293-1300.
- Mukhtar H and Ahmad N (2000) Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr* **71**:1698S-1702S; discussion 1703S-1694S.
- Muller B, Kleschyov AL, Alencar JL, Vanin A and Stoclet JC (2002) Nitric oxide transport and storage in the cardiovascular system. *Ann N Y Acad Sci* **962**:131-139.
- Muller B, Kleschyov AL, Gyorgy K and Stoclet JC (2000) Inducible NO synthase activity in blood vessels and heart: new insight into cell origin and consequences. *Physiol Rev* **49**:19-26.
- Muller B, Kleschyov AL, Malblanc S and Stoclet JC (1998) Nitric oxide-related cyclic GMP-independent relaxing effect of N-acetylcysteine in lipopolysaccharide-treated rat aorta. *Br J Pharmacol* **123**:1221-1229.
- Muller B, Kleschyov AL and Stoclet JC (1996) Evidence for N-acetylcysteine-sensitive nitric oxide storage as dinitrosyl-iron complexes in lipopolysaccharide-treated rat aorta. *Br J Pharmacol* **119**:1281-1285.

- Mulsch A, Mordvintcev P, Vanin AF and Busse R (1991) The potent vasodilating and guanylyl cyclase activating dinitrosyl-iron(II) complex is stored in a protein-bound form in vascular tissue and is released by thiols. *FEBS Lett* **294**:252-256.
- Mulsch A, Oelze M, Kloss S, Mollnau H, Topfer A, Smolenski A, Walter U, Stasch JP, Warnholtz A, Hink U, Meinertz T and Munzel T (2001) Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation* **103**:2188-2194.
- Munzel T, Afanas'ev IB, Kleschyov AL and Harrison DG (2002) Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**:1761-1768.
- Munzel T, Kurz S, Heitzer T and Harrison DG (1996) New insights into mechanisms underlying nitrate tolerance. *Am J Cardiol* **77**:24C-30C.
- Munzel T, Li H, Mollnau H, Hink U, Matheis E, Hartmann M, Oelze M, Skatchkov M, Warnholtz A, Duncker L, Meinertz T and Forstermann U (2000a) Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ Res* **86**:E7-E12.
- Munzel T, Mollnau H, Hartmann M, Geiger C, Oelze M, Warnholtz A, Yehia AH, Forstermann U and Meinertz T (2000b) Effects of a nitrate-free interval on tolerance, vasoconstrictor sensitivity and vascular superoxide production. *J Am Coll Cardiol* **36**:628-634.
- Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM and Harrison DG (1995) Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* **95**:187-194.
- Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T and Inoue M (1991) Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:10045-10048.
- Ndiaye M, Chataigneau M, Lobyscheva I, Chataigneau T and Schini-Kerth VB (2004a) Red wine polyphenols-induced endothelium-dependant NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependant phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *FASEB in press*.
- Ndiaye M, Chataigneau T, Andriantsitohaina R, Stoclet JC and Schini-Kerth VB (2003) Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **310**:371-377.
- Ndiaye M, Chataigneau T, Chataigneau M and Schini-Kerth VB (2004b) Red wine polyphenols induce EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries through the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway. *Br J Pharmacol* **142**:1131-1136.
- Negishi H, Xu JW, Ikeda K, Njelekela M, Nara Y and Yamori Y (2004) Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* **134**:38-42.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K and van Leeuwen PA (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* **74**:418-425.
- Nikitovic D and Holmgren A (1996) S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *J Biol Chem* **271**:19180-19185.

- Nishiyama A, Fukui T, Fujisawa Y, Rahman M, Tian RX, Kimura S and Abe Y (2001) Systemic and Regional Hemodynamic Responses to Tempol in Angiotensin II-Infused Hypertensive Rats. *Hypertension* **37**:77-83.
- Noack E and Feelisch M (1991) Molecular mechanisms of nitrovasodilator bioactivation. *Basic Res Cardiol* **86 Suppl 2**:37-50.
- Noguchi T, Ikeda K, Sasaki Y, Yamamoto J, Seki J, Yamagata K, Nara Y, Hara H, Kakuta H and Yamori Y (2001) Effects of vitamin E and sesamin on hypertension and cerebral thrombogenesis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* **24**:735-742.
- Oak MH, Chataigneau M, Keravis T, Chataigneau T, Beretz A, Andriantsitohaina R, Stoclet JC, Chang SJ and Schini-Kerth VB (2003) Red wine polyphenolic compounds inhibit vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells by preventing the activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**:1001-1007.
- Oak MH, El Bedoui J, Anglard P and Schini-Kerth VB (2004) Red wine polyphenolic compounds strongly inhibit pro-matrix metalloproteinase-2 expression and its activation in response to thrombin via direct inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation* **110**:1861-1867.
- Okamoto K and Aoki K (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* **27**:282-293.
- Oskarsson HJ and Heistad DD (1997) Oxidative stress produced by angiotensin too. Implications for hypertension and vascular injury. *Circulation* **95**:557-559.
- Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM and Quinn MT (1997) Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:14483-14488.
- Palmer RM, Ferrige AG and Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**:524-526.
- Park JB, Touyz RM, Chen X and Schiffrin EL (2002) Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* **15**:78-84.
- Parker JD (2004) Nitrate tolerance, oxidative stress, and mitochondrial function: another worrisome chapter on the effects of organic nitrates. *J Clin Invest* **113**:352-354.
- Parker JD, Farrell B, Fenton T, Cohenim M and Parker JO (1991) Counter-regulatory responses to continuous and intermittent therapy with nitroglycerin. *Circulation* **84**:2336-2345.
- Pechanova O, Bernatova I, Babal P, Martinez MC, Kysela S, Stvrtina S and Andriantsitohaina R (2004) Red wine polyphenols prevent cardiovascular alterations in L-NAME-induced hypertension. *J Hypertens* **22**:1551-1559.
- Pellegrini N, Pareti FI, Stabile F, Brusamolino A and Simonett P (1996) Effects of moderate consumption of red wine on platelet aggregation and haemostatic variables in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* **50**:209-213.
- Pendurthi UR, Williams JT and Rao LV (1999) Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells : A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**:419-426.
- Plane F, Hurrell A, Jeremy JY and Garland CJ (1996) Evidence that potassium channels make a major contribution to SIN-1-evoked relaxation of rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol* **119**:1557-1562.

- Prasad A, Andrews NP, Padder FA, Husain M and Quyyumi AA (1999) Glutathione reverses endothelial dysfunction and improves nitric oxide bioavailability. *J Am Coll Cardiol* **34**:507-514.
- Rabelo LA, Cortes SF, Alvarez-Leite JI and Lemos VS (2003) Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H2O2. *Br J Pharmacol* **138**:1215-1220.
- Rajagopalan S and Harrison DG (1996) Reversing endothelial dysfunction with ACE inhibitors. A new trend. *Circulation* **94**:240-243.
- Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK and Harrison DG (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* **97**:1916-1923.
- Renaud S and de Lorgeril M (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339**:1523-1526.
- Renaud S and Gueguen R (1998) The French paradox and wine drinking. *Novartis Found Symp* **216**:208-217; discussion 217-222, 152-208.
- Renaud SC, Gueguen R, Schenker J and d'Houtaud A (1998) Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology* **9**:184-188.
- Rey FE, Li XC, Carretero OA, Garvin JL and Pagano PJ (2002) Perivascular superoxide anion contributes to impairment of endothelium-dependent relaxation: role of gp91(phox). *Circulation* **106**:2497-2502.
- Richardson G and Benjamin N (2002) Potential therapeutic uses for S-nitrosothiols. *Clin Sci (Lond)* **102**:99-105.
- Rimm EB (1996) Alcohol consumption and coronary heart disease: good habits may be more important than just good wine. *Am J Epidemiol* **143**:1094-1098; discussion 1099.
- Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M and Stampfer MJ (1999) Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *Bmj* **319**:1523-1528.
- Robak J and Gryglewski RJ (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* **37**:837-841.
- Rudic RD and Sessa WC (1999) Nitric oxide in endothelial dysfunction and vascular remodeling: clinical correlates and experimental links. *Am J Hum Genet* **64**:673-677.
- Sage PR, de la Lande IS, Stafford I, Bennett CL, Phillipov G, Stubberfield J and Horowitz JD (2000) Nitroglycerin tolerance in human vessels: evidence for impaired nitroglycerin bioconversion. *Circulation* **102**:2810-2815.
- Sarr M, Alencar JC, Stoclet JC, Schini-Kerth VB and Muller B (2003) Differential influence of the endothelium on NO-induced persistent inhibition of tone among arteries. *Arch Mal Coeur* **96**:359-450.
- Saville (1958) A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* **83**:670-672.
- Scharfstein JS, Keaney JF, Jr., Slivka A, Welch GN, Vita JA, Stamler JS and Loscalzo J (1994) In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols. *J Clin Invest* **94**:1432-1439.
- Schiffrin EL (2001) Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens* **14**:83S-89S.
- Schiffrin EL (2002) Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. *Am J Hypertens* **15**:115S-122S.
- Schiffrin EL and Touyz RM (2004) From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**:H435-446.

- Schini VB, Boulanger C, Regoli D and Vanhoutte PM (1990) Bradykinin stimulates the production of cyclic GMP via activation of B2 kinin receptors in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **252**:581-585.
- Schini VB, Busse R and Vanhoutte PM (1994) Inducible nitric oxide synthase in vascular smooth muscle. *Arzneimittelforschung* **44**:432-435.
- Schini VB and Vanhoutte PM (1993) Role of the L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle. *Eur Heart J* **14 Suppl I**:16-21.
- Schini-Kerth VB (1999a) Dual effects of insulin-like growth factor-I on the constitutive and inducible nitric oxide (NO) synthase-dependent formation of NO in vascular cells. *J Endocrinol Invest* **22**:82-88.
- Schini-Kerth VB (1999b) Vascular biosynthesis of nitric oxide: effect on hemostasis and fibrinolysis. *Transfus Clin Biol* **6**:355-363.
- Seo K, Jung S, Park M, Song Y and Choung S (2001) Effects of leucocyanidines on activities of metabolizing enzymes and antioxidant enzymes. *Biol Pharm Bull* **24**:592-593.
- Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, Sugaya T, Kashiwagi A and Okamura T (2004) Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. *Hypertension* **43**:255-262.
- Singh RJ, Hogg N, Joseph J and Kalyanaraman B (1996) Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J Biol Chem* **271**:18596-18603.
- Soares de Moura R, Costa Vieira FS, Souza MAV, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EPB, Rubenich LMS, Carvalho LCRM, Tano T and Gusmao Correia ML (2002) Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of vinifera grape-skin extract. *J. Pharm. Pharmacol* **54**:1515-1520.
- Somers MJ, Mavromatis K, Galis ZS and Harrison DG (2000) Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. *Circulation* **101**:1722-1728.
- Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RE, Szocs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR and Griendling KK (2002) Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* **105**:1429-1435.
- Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, Bredt M, Gamez G, Tatge H, Reepschlager N, Hornig B, Drexler H and Harrison DG (2003) Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* **107**:1383-1389.
- St Leger AS, Cochrane AL and Moore F (1979) Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet* **1**:1017-1020.
- Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR and Loscalzo J (1992) Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:7674-7677.
- Stamler JS and Toone EJ (2002) The decomposition of thionitrites. *Curr Opin Chem Biol* **6**:779-785.
- Stocker R and O'Halloran RA (2004) Dealcoholized red wine decreases atherosclerosis in apolipoprotein E gene-deficient mice independently of inhibition of lipid peroxidation in the artery wall. *Am J Clin Nutr* **79**:123-130.
- Stoclet JC (2001) Bonum vinum laetificat cor hominum. *Med Sci Monit* **7**:842-847.
- Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M and Schini-Kerth VB (2004) Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol* **500**:299-313.

- Stoclet JC, Kleschyov A, Andriambeloson E, Diebolt M and Andriantsitohaina R (1999a) Endothelial nitric oxide release caused by red wine polyphenols. *J Physiol Pharmacol* **50**:535-540.
- Stoclet JC, Muller B, Andriantsitohaina R and Kleschyov A (1998) Overproduction of nitric oxide in pathophysiology of blood vessels. *Biochemistry (Mosc)* **63**:826-832.
- Stoclet JC, Muller B, Gyorgy K, Andriantsitohaina R and Kleschyov AL (1999b) The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue. *Eur J Pharmacol* **375**:139-155.
- Stralin P, Karlsson K, Johansson BO and Marklund SL (1995) The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**:2032-2036.
- Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL and Wiseman J (1991) N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* **266**:6259-6263.
- Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK and Lambeth JD (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **401**:79-82.
- Sun J, Xin C, Eu JP, Stamler JS and Meissner G (2001) Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:11158-11162.
- Sydow K, Daiber A, Oelze M, Chen Z, August M, Wendt M, Ullrich V, Mulsch A, Schulz E, Keaney JF, Jr., Stamler JS and Munzel T (2004) Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* **113**:482-489.
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Pasini AF, Garbin U, Cominacini L and Salvetti A (2001) Effect of calcium antagonist or beta blockade treatment on nitric oxide-dependent vasodilation and oxidative stress in essential hypertensive patients. *J Hypertens* **19**:1379-1386.
- Tanito M, Nakamura H, Kwon YW, Teratani A, Masutani H, Shioji K, Kishimoto C, Ohira A, Horie R and Yodoi J (2004) Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal* **6**:89-97.
- Taubert D, Berkels R, Roesen R and Klaus W (2003) Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension. *Jama* **290**:1029-1030.
- Terluk MR, da Silva-Santos JE and Assreuy J (2000) Involvement of soluble guanylate cyclase and calcium-activated potassium channels in the long-lasting hyporesponsiveness to phenylephrine induced by nitric oxide in rat aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **361**:477-483.
- Thomas SR, Chen K and Keaney JF, Jr. (2003) Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity. *Antioxid Redox Signal* **5**:181-194.
- Torel J and Cillard P (1986) Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with proxy radical. *Phytochemistry* **25**:383-387.
- Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ and Schiffrian EL (2002) Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* **90**:1205-1213.
- Trujillo M, Alvarez MN, Peluffo G, Freeman BA and Radi R (1998) Xanthine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols. *J Biol Chem* **273**:7828-7834.

- Ulker S, McKeown PP and Bayraktutan U (2003) Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. *Hypertension* **41**:534-539.
- Unger P, Berkenboom G, Brekine D and Fontaine J (1993) Nitrate tolerance and aging in isolated rat aorta. *Eur J Pharmacol* **248**:145-149.
- Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N and Griendling KK (1996) p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **271**:23317-23321.
- Vanhoutte PM, Auch-Schweik W, Boulanger C, Janssen PA, Katusic ZS, Komori K, Miller VM, Schini VB and Vidal M (1989) Does endothelin-1 mediate endothelium-dependent contractions during anoxia? *J Cardiovasc Pharmacol* **13 Suppl 5**:S124-128; discussion S142.
- Vanin AF (1998) Dinitrosyl iron complexes and S-nitrosothiols are two possible forms for stabilization and transport of nitric oxide in biological systems. *Biochemistry (Mosc)* **63**:782-793.
- Vanin AF and Kleschyov AL (1998) EPR detection and biological implications of nitrosyl non-heme complexes, in *Nitric Oxide in Allograft Rejection and Anti-Tumor Defense* (Zweier JL ed), Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA.
- Vanin AF, Muller B, Alencar JL, Lobysheva, II, Nepveu F and Stoclet JC (2002) Evidence that intrinsic iron but not intrinsic copper determines S-nitrosocysteine decomposition in buffer solution. *Nitric Oxide* **7**:194-209.
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P and Pritchard KA, Jr. (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:9220-9225.
- Vetrovsky P, Boucher JL, Schott C, Beranova P, Chalupsky K, Callizot N, Muller B, Entlicher G, Mansuy D and Stoclet JC (2002) Involvement of NO in the endothelium-independent relaxing effects of N(omega)-hydroxy-L-arginine and other compounds bearing a C=NOH function in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* **303**:823-830.
- Vinson JA, Teufel K and Wu N (2001) Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis* **156**:67-72.
- Waddington E, Puddey IB and Croft KD (2004) Red wine polyphenolic compounds inhibit atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice independently of effects on lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* **79**:54-61.
- Walker J.S. WCJ, Murphy R.A. (1994) Energetics of crossbridge phosphorylation and contraction in vascular smooth muscle. *hypertension* **23**:1106-1112.
- Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K and Forstermann U (2002) Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **106**:1652-1658.
- Wallerath T, Poleo D, Li H and Forstermann U (2003) Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol* **41**:471-478.
- Wang D, Chen Y, Chabashvili T, Aslam S, Borrego Conde LJ, Umans JG and Wilcox CS (2003) Role of oxidative stress in endothelial dysfunction and enhanced responses to angiotensin II of afferent arterioles from rabbits infused with angiotensin II. *J Am Soc Nephrol* **14**:2783-2789.
- Wang HD, Pagano PJ, Du Y, Cayatte AJ, Quinn MT, Brecher P and Cohen RA (1998) Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. *Circ Res* **82**:810-818.

- Wang PG, Xian M, Tang X, Wu X, Wen Z, Cai T and Janczuk AJ (2002a) Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chem Rev* **102**:1091-1134.
- Wang Z, Huang Y, Zou J, Cao K, Xu Y and Wu JM (2002b) Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *Int J Mol Med* **9**:77-79.
- Warnholtz A, Tsilimingas N, Wendt M and Munzel T (2002) Mechanisms underlying nitrate-induced endothelial dysfunction: insight from experimental and clinical studies. *Heart Fail Rev* **7**:335-345.
- Wassmann S, Laufs U, Muller K, Konkol C, Ahlborg K, Baumer AT, Linz W, Bohm M and Nickenig G (2002) Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**:300-305.
- Watanabe H, Kakihana M, Ohtsuka S and Sugishita Y (1997) Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental vitamin E on attenuation of the development of nitrate tolerance. *Circulation* **96**:2545-2550.
- Wei IH, Wu YC, Wen CY and Shieh JY (2004) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates the neuronal NADPH-d/nNOS expression in the nodose ganglion of acute hypoxic rats. *Brain Res* **999**:73-80.
- Wever RM, van Dam T, van Rijn HJ, de Groot F and Rabelink TJ (1997) Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* **237**:340-344.
- Wingler K, Wunsch S, Kreutz R, Rothermund L, Paul M and Schmidt HH (2001) Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* **31**:1456-1464.
- Wolin MS, Gupte SA and Oeckler RA (2002) Superoxide in the vascular system. *J Vasc Res* **39**:191-207.
- Wollny T, Aiello L, Di Tommaso D, Bellavia V, Rotilio D, Donati MB, de Gaetano G and Iacoviello L (1999) Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production. *Br J Pharmacol* **127**:747-755.
- Woodman OL (2001) Pharmacological approaches to preserving and restoring coronary endothelial function. *Expert Opin Pharmacother* **2**:1765-1775.
- Wu R, Millette E, Wu L and de Champlain J (2001) Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* **19**:741-748.
- Xia Y, Tsai AL, Berka V and Zweier JL (1998) Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem* **273**:25804-25808.
- Yang CS and Wang ZY (1993) Tea and cancer. *J Natl Cancer Inst* **85**:1038-1049.
- Ying CJ, Xu JW, Ikeda K, Takahashi K, Nara Y and Yamori Y (2003) Tea polyphenols regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunit expression and ameliorate angiotensin II-induced hyperpermeability in endothelial cells. *Hypertens Res* **26**:823-828.
- Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R and Dagenais G (2000) Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* **342**:145-153.
- Zenebe W and Pechanova O (2002) Effects of red wine polyphenolic compounds on the cardiovascular system. *Bratisl Lek Listy* **103**:159-165.

- Zhang J, Chen Z, Cobb FR and Stamler JS (2004) Role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin-induced vasodilation of coronary and systemic vessels: an intact canine model. *Circulation* **110**:750-755.
- Zheng JS, Yang XQ, Lookingland KJ, Fink GD, Hesslinger C, Kapatos G, Kovesdi I and Chen AF (2003) Gene transfer of human guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I restores vascular tetrahydrobiopterin level and endothelial function in low renin hypertension. *Circulation* **108**:1238-1245.
- Zou M, Martin C and Ullrich V (1997) Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol Chem* **378**:707-713.