



Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie
UMR CNRS 7213 - Faculté de Pharmacie

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Sciences du Vivant - Aspects Moléculaires et Cellulaires de la
Biologie
Spécialité : Pharmacologie

Dysfonction Endothéliale et Pathologies Cardiovasculaires : Rôle du Stress Oxydant et Effets Protecteurs des Polyphénols Végétaux

Par **Stéphanie DAL-ROS**

Soutenue publiquement le 18 juin 2009 devant le jury composé de :

Directeur de Thèse : Docteur Christian BRONNER, Strasbourg
Rapporteur Interne : Docteur Jean-Jacques HELWIG, Strasbourg
Rapporteur Externe : Professeur Ludovic DROUET, Paris
Rapporteur Externe : Professeur Paul M. VANHOUTTE, Hong-Kong
Examinatrice : Professeur Valérie B. SCHINI-KERTH, Strasbourg

Remerciements

Une thèse est la somme d'un travail collectif

Où l'apport de chacun,

Bien que d'importance inégale,

Est toujours indispensable et précieux.

Ce mémoire ponctue le fruit de connaissances, expériences et réflexions échangées entre de nombreuses personnes en divers endroits et moments. J'espère que chacune s'y retrouvera un peu et que celles qui m'ont aidée à réaliser ce travail prendront autant de plaisir à le lire que j'en ai eu à le faire. A tous ceux là, je dédie ce mémoire.

A Monsieur **Christian BRONNER**,

Chargé de Recherche au Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

Qui m'a aidée et guidée dans l'élaboration et la conception de ce travail. Merci d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse durant ces 4 dernières années. Merci aussi pour toute la sagesse dont vous avez su faire preuve et qui, je l'espère, saura être contagieuse.

Sincères remerciements.

A Madame **Valérie SCHINI-KERTH**,

Professeur en Pharmacologie à la faculté de Pharmacie de Strasbourg et directrice de l'équipe de Pharmacologie et Physiopathologie Cardiovasculaires du Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

Qui m'a orientée sur la conception de ce sujet de thèse, m'a fait partager son expérience et m'a soutenue par ses encouragements. La pleine confiance qu'elle m'a accordée m'a permis d'élaborer un plan de thèse personnel et propre à mes aspirations.

Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

A Monsieur **Paul M. VANHOUTTE**,

Professeur en Pharmacologie à la faculté de Médecine de Hong-Kong et directeur du Département de Pharmacologie Li Ka Shing à Hong-Kong.

Le seul fait de vous avoir rencontré et connu était déjà un immense privilège. Vous m'avez toujours orientée et aiguillée au cours de ma thèse lors de vos venues au laboratoire.

Qu'il trouve ici mon profond respect et mon admiration.

A Messieurs Ludovic DROUET et Jean-Jacques HELWIG,

Professeur et directeur du Laboratoire de Thrombose et d'Athérosclérose à l'Hôpital Lariboisière à Paris,

Directeur de Recherche et Directeur du Laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Rénales à la Faculté de Médecine de Strasbourg.

Qui m'ont fait l'honneur de participer à ce jury de thèse. La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail malgré vos nombreuses occupations m'a profondément touchée. Vos qualités scientifiques et votre passion pour la Recherche sont une source de motivation supplémentaire pour l'avenir.

Sincères remerciements.

A Messieurs Kenneth TAKEDA et Yves MELY,

Directeurs de l'Unité. Merci de m'avoir accueilli pour mon DEA et mon Doctorat au sein du Laboratoire de Pharmacologie et Physicochimie des Interactions Cellulaires et Moléculaires (UMR 7034 et 7175) et du Laboratoire de Biophotonique et de Pharmacologie (UMR 7213).

A l'ensemble du Personnel administratif, technique, scientifique du l'UMR 7213, notamment à **Christa SCHOTT** pour son aide, ses conseils, sa bonne humeur et son soutien indispensable.

A l'ensemble du Personnel de l'animalerie de la Faculté de Pharmacie, notamment à **Jean François POIRIER** pour toute son aide précieuse.

A toutes les personnes de l'équipe de Valérie SCHINI-KERTH, la « schini team », à **Cyril AUGER** pour son aide, sa transmission de savoir, sa sympathie. Plus particulièrement à **Allison WALTER** et **Eric ANSELM** avec qui j'ai partagé cette aventure qu'était le DEA, la thèse, les manips, la rédaction. Merci d'avoir agrémenté mes journées et partager cette enrichissante période de ma vie.

Aux agréables moments passés ensemble.

A Monique OSWALD-MAMMOSSER,

Pneumologue au Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles et EA 3072 aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

Son arrivée dans notre équipe à temps partiel durant un an, a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives à ma thèse. Je la remercie pour sa collaboration et la transmission de ses nombreuses connaissances, pour son aide et surtout pour son immense soutien tout au long de ce projet et encore maintenant.

Homages respectueux.

A mon mari Jonathan,

Je tiens sincèrement à lui rendre hommage pour sa présence et sa patience durant ces dernières années. La vie n'est pas un long fleuve tranquille tout comme la réalisation d'un doctorat mais il a toujours su être présent, à l'écoute, aidant et surtout aimant.

Merci pour tous les moments déjà passés ensemble et ceux des décennies à venir.

A mes parents Marie-Christine et Bernard,

Pour leur confiance, leur amour et leur présence tout au long de ma vie.

Pour me soutenir dans mes démarches et m'aider à réaliser mes projets.

Pour m'avoir menée jusqu'ici et sans qui je n'y serais pas aujourd'hui.

Merci pour votre présence à tous les deux.

A mon frère Julien,

Pour tous les moments de bonheur partagés ensemble.

Pour être toujours présent quand il faut.

Pour notre complicité.

Simplement MERCI.

A mes Grands-parents, ma famille et belle-famille,

Pour leur gentillesse et leurs encouragements. Merci.

A tous mes amis que je ne citerai pas de peur d'en oublier. Merci.

Publications et Communications Scientifiques

I. Publications

1. Faisant l'objet de ce travail :

- * Dal-Ros S., Bronner C., Schott C., Kane M.O., Chataigneau M., Schini-Kerth V.B. and Chataigneau T. *Angiotensin II-induced hypertension is associated with a selective inhibition of EDHF-mediated responses in the rat mesenteric artery.* J Pharmacol Exp Ther. 328:478-486, 2009.
- * Dal-Ros S.*, Oswald-Mammosser M.*, Pestrikova T., Schott C., Boehm N., Bronner C., Chataigneau T., Gény B., and Schini-Kerth V.B. *Losartan prevents portal hypertension induced, redox-mediated endothelial dysfunction in the mesenteric artery in rats.* Gastroenterology, 2009).
- * Dal-Ros S., Bronner C., Schott C., Kane M.O., Schini-Kerth V.B. and Chataigneau T. *Small and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels are improved by chronic infusion of angiotensin II in small mesenteric of rats.* (en préparation, 2009).
- * Dal-Ros S., Lang A.L., Zoll J., Keller N., Bronner C., Gény B., and Schini-Kerth V.B. *Red wine polyphenols prevent aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance.* (Soumis à *Cardiovascular Research*, 2009).
- * Dal-Ros S., Bronner C., Auger C. and Schini-Kerth V.B. *Chronic intake of red wine polyphenols improves endothelial dysfunction in the mesenteric artery of old rats: role of NADPH oxidase-derived oxidative stress.* (Soumis à *American Journal of Physiology*, 2009).

2. Ne faisant pas l'objet de ce travail :

- * Anselm E., Madeira S.V.F, Dal-Ros S., Schott C., Bronner C., and Schini-Kerth. V.B. *Crataegus special extract WS®1442 causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS but not via activation of estrogen receptors.* J. Cardiovasc. Pharmacol. 2009, 53, 253-260.
- * Kane M.O.*, Etienne-Selloum N.*, Dal-Ros S., Madeira S.V.F, Sarr M., Chataigneau T., Walter A., Schott C and Schini-Kerth V. *Endothelium-Derived Contractin Factors mediate the Ang II-*

induced endothelial dysfunction in the rat aorta: Preventive effect of red wine polyphenols. (Soumis à Pflugers Archi-European Journal of Physiology, 2009).

* Rattmann Y.D., Anselm E., Hun-Kim J., Dal-Ros S., Auger C., Miguelc O., Bronner C., Chataigneau T., Santos A.R.S., and Schini-Kerth V.B. *Dicksonia sellowiana induces porcine coronary artery relaxation mediated by a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS.* (en préparation, 2009).

* Kane M.O, Schleiffer R., Etienne-Selloum N., Dal-Ros S., Demougeot C., Berthelot A., Bronner C., and Schini-Kerth V.B. *Role of arginases in the angiotensin II-induced endothelial dysfunction in the rat aorta: preventive effect of red wine polyphenols.* (en préparation, 2009).

II. Participations à des réunions scientifiques

La personne ayant présentée le travail lors du congrès est représentée en italique.

1. Orales :

* Dal-Ros S., Lang A.L, Zoll J., Keller N., Bronner C., Geny B., and Schini-Kerth V.B. *Red wine polyphenols improve endothelial dysfunction in aging.* **4th Taste-Nutrition-Health International Congress. March 18-20, 2009. Dijon, France.**

* Dal-Ros S., Oswald M.*, Pestrikova T., Schott C., Bronner C., Chataigneau T., Gény B., and Schini-Kerth V.B. *Portal hypertension in rats is associated with blunted EDHF-mediated relaxations in the mesenteric artery: role of ROS and activation of AT1 receptor.* **5th International EDHF Symposium. Endothelium, Vasoactive Factors and Inflammation. June 24-27, 2008. Tampere, Finland.** (Obtention d'un prix de type "travel grant" suite à un concours).

* Kane M.O, Anselm E., Dal S. and Schini-Kerth V. *AMP-activated protein kinase is involved in both NO- and EDHF-mediated endothelium-dependent relaxations to red wine polyphenols.* **Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, Montpellier, France. p24; 0359, 28-31 mai 2008.**

* Schini-Kerth V.B., Anselm E., Bronner C., Chataigneau T., Dal S., Etienne-Selloum N., Madeira Frota V.S., Kane M.O., Walter A., Kang C., Bonneau M., Bal Dit Sollier C. and Drouet L.. *Vascular protection by grape-derived polyphenols: in vitro and in vivo studies.* **Vin et Santé 2007 (20-22 septembre 2007), Bordeaux, France.**

- * Dal S., Schott C., Bronner C., Schini-Kerth V.B. and Chataigneau T. *Reduced expression of vascular connexins (Cx37, Cx40 and Cx43) and calcium-activated potassium channels (SKCa and IKCa) in mesenteric arteries of angiotensin II-treated rats.* **Journées Scientifiques Campus Illkirch IFR 85 Gilbert Laustriat et IGBMC 12-13 avril 2007, Illkirch, France.**
- * Dal S., Schott C., Schini-Kerth V.B. and Chataigneau T. *Chronic treatment with angiotensin II in rats induced a specific abolition of EDHF-mediated relaxations induced by red wine polyphenols ex vivo.* **French Meeting on NO Research, 2006, Paris, France.**
- * Anselm E., Dal S., Marion S., Madeira S.V.F, and V.B Schini-Kerth. *Crataegus special extract WS®1442 induces endothelium-dependent NO-mediated relaxations in coronary arteries through the redox-sensitive Src kinase and PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO synthase.* **2nd Joint French-German Meeting on NO Research, 5-7 octobre 2006, Hambourg, Allemagne.**
- * Dal S., Kane M.O., Schott C., Schini-Kerth V.B. and Chataigneau T. *Angiotensin II induced hypertension is associated with a decreased EDHF- but not NO-mediated component of the relaxation in the isolated rat mesenteric arteries.* **Journées Société Française de Pharmacologie, septembre 2005, Lille, France. Fund. Clin. Pharmacol., 2005, 19, O31, p. 200.**
- * Dal S., Kane M.O., Schott C., Schini-Kerth V.B. and Chataigneau T. *EDHF- but not NO-mediated relaxation is abolished in the isolated mesenteric arteries of hypertensive rats chronically treated with angiotensin II.* **Symposium on Mechanisms of Vasodilatation and EDHF, 31 May-4 June 2005, Antwerpen, Belgique.**
- * Dal S., Kane M.O., Schott C., Schini-Kerth V.B. and Chataigneau T. *Angiotensin II induced hypertension is associated with a decreased EDHF- but not NO-mediated component of the relaxation in the isolated rat mesenteric arteries.* **Journées Scientifiques Campus Illkirch IFR 85 Gilbert Laustriat et IGBMC 15-16 septembre 2005, Illkirch, France.**

2. Posters :

- * Dal-Ros S., Lang A.L, Zoll J., Keller N., Bronner C., Geny B., and Schini-Kerth V.B. *Chronic intake of red wine polyphenols by young rats prevents the development of an endothelium dysfunction with aging.* **10th International Symposium on Mechanisms of Vasodilatation. June 1-3, 2009. Matsushima, Miyagi, Japan.**

- * Dal-Ros S., Bronner C., and Schini-Kerth V.B. *Red wine polyphenols improve endothelial dysfunction in the mesenteric artery of old rats: role of oxidative stress.* **10th International Symposium on Mechanisms of Vasodilatation.** June 1-3, 2009. Matsushima, Miyagi, Japan.
- * Dal S., Schott C., Bronner C., Schini-Kerth V.B. and Chataigneau T. *Reduced expression of vascular connexins (Cx37, Cx40 and Cx43) and calcium-activated potassium channels (SKCa and IKCa) in mesenteric arteries of angiotensin II-treated rats.* **5th International EDHF Symposium. Endothelium, Vasoactive Factors and Inflammation.** June 24-27, 2008. Tampere, Finland.
- * Dal-Ros S.*, Oswald M.*, Pestrikova T., Schott C., Bronner C., Chataigneau T., Gény B., and Schini-Kerth V.B. *Portal hypertension in rats is associated with blunted EDHF-mediated relaxations in the mesenteric artery: role of ROS and activation of AT1 receptor.* **Journées Scientifiques Campus Illkirch IFR 85 Gilbert Laustriat et IGBMC 24-25 avril 2008, Illkirch, France.**
- * Kane M. O., Anselm E., Dal S. and Schini-Kerth V. B.. *AMP-activated protein kinase is involved in both NO- and EDHF-mediated endothelium-dependent relaxations to red wine polyphenols and green tea polyphenols.* **Congrès Printemps de la Cardiologie 28-31 mai 2008, p24 : 0359, Montpellier, France.**
- * Dal S., Schott C., Bronner C., Schini-Kerth V.B. and Chataigneau T. *Reduced expression of vascular connexins (Cx37, Cx40 and Cx43) and calcium-activated potassium channels (SKCa and IKCa) in mesenteric arteries of angiotensin II-treated rats.* **Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, Tours, 25-27 avril 2007. Arch Mal Coeur Vaiss, 100, 333, 2007.**
- * Kane M.O., Anselm E. , Dal S., Madeira S.V.F, Schott C., Chataigneau T., Bronner C. and Schini-Kerth V.B. *AMP-activated protein kinase is involved in both NO- and EDHF-mediated endothelium-dependent relaxations to red wine polyphenols and green tea polyphenols.* **Journées Scientifiques Campus Illkirch IFR 85 Gilbert Laustriat et IGBMC 12-13 avril 2007, Illkirch, France.**
- * Kane M.O., Anselm E. , Dal S., Madeira S.V.F, Schott C., Chataigneau T., Bronner C. and Schini-Kerth V.B. *AMP-activated protein kinase is involved in both NO- and EDHF-mediated endothelium-dependent relaxations to red wine polyphenols and green tea polyphenols.* **Journées Société Française de Pharmacologie, avril 2007, Toulouse, France.**

* Dal S., Schott C., Bronner C., Schini-Kerth V.B. and Chataigneau T. *Angiotensin II-induced hypertension in rats is associated with a decreased level of expression of connexins and potassium channel in mesenteric arterial wall.* Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, Toulouse, 10-13 mai 2006. Arch Mal Coeur Vaiss, 99, 391, 2006.

* Dal S., Kane M.O., Schott C., Schini-Kerth V.B. and Chataigneau T. *Chronic angiotensin II administration in rats is associated with a decreased EDHF- but not NO-mediated component of the relaxation in the isolated mesenteric arteries.* Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, Strasbourg, avril 2005. Arch des Maladies du Coeur et des Vaisseaux. 2005; tome 98 (4) : p 416.

Citation

« Que ton aliment soit ton premier médicament »

Hippocrate, 400 ans av. J.C.

Résumé

Si la France bénéficie d'une position relativement avantageuse en matière de mortalité cardiovasculaire, caractérisée par une baisse des taux de décès d'environ 25% entre 1981 et 1991 pour la tranche d'âge de 35 à 64 ans, les maladies cardiovasculaires demeurent un problème important de santé publique. Les maladies cardiovasculaires constituent là encore la 1^{ère} cause de mortalité dans le Monde. Elles sont responsables chaque année du décès de plus de 17 millions de personnes, soit 30% de la mortalité. L'étude MONICA, placée sous l'égide de l'OMS, a permis de confirmer la baisse de mortalité coronaire au cours des années 80 mais si la mortalité diminue, le nombre de maladies (cardiovasculaires, cancers) continue de progresser. Aujourd'hui le vieillissement est devenu un sujet de préoccupation. Plus d'une personne sur 10 est âgée de 65 ans et plus, chez qui, environ 70% des décès proviennent de maladies cardiaques, d'accidents vasculaires cérébraux et de cancers.

Les recherches réalisées au cours de ces dernières années, sur divers modèles animaux mais aussi chez l'Homme, ont permis d'établir que les principales pathologies cardiovasculaires (diabète, athérosclérose, hypertension artérielle, insuffisance cardiaque...) sont associées à l'apparition d'une dysfonction endothéliale, c'est-à-dire la perte d'un équilibre entre facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs. En effet, dans les conditions physiologiques normales, les cellules endothéliales ont un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie vasculaire par la formation de puissants facteurs vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI₂) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). Par le biais de ces facteurs, les cellules endothéliales maintiennent une surface non thrombogénique pour le flux sanguin, contribuent à inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses dans la paroi vasculaire et permettent la vasodilatation. Le stress oxydant, c'est-à-dire un déséquilibre de la balance formation / dégradation des espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*), jouerait aussi un rôle important dans la dysfonction endothéliale, notamment en diminuant la biodisponibilité du NO, et dans la physiopathologie de ces maladies.

De nombreuses études épidémiologiques indiquent qu'une consommation modérée de vin rouge et d'aliments d'origine végétale (fruits et légumes) réduit le risque des maladies coronariennes et cardiovasculaires malgré une alimentation riche en lipides athérogènes dans les pays méditerranéens, notamment la France et l'Italie. Outre les propriétés antioxydantes de ces composés, leurs effets bénéfiques pourraient s'expliquer par la capacité des polyphénols à

protéger l'endothélium et à améliorer sa fonction. En effet, il a été montré par l'équipe d'accueil et d'autres chercheurs que les polyphénols contenus dans le vin rouge, le jus de raisin ou le thé vert sont capables d'induire la formation endothéliale des facteurs vasorelaxants tels que le NO et EDHF.

Ainsi, l'objectif général de ce travail de thèse a été d'étudier la fonction endothéliale dans différents modèles expérimentaux de pathologies cardiovasculaires chez l'animal et plus particulièrement d'analyser le rôle du stress oxydant dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle, du syndrome hépatopulmonaire et dans le vieillissement physiologique. Les objectifs spécifiques ont été : 1) tout d'abord de déterminer s'il y a ou non présence d'une dysfonction endothéliale dans les modèles animaux cités précédemment dans l'artère mésentérique de rats et d'en déterminer les caractéristiques et les mécanismes sous jacents, notamment au niveau de la formation des facteurs vasorelaxants NO et EDHF; 2) de mettre en évidence le rôle primordial du stress oxydant dans la dysfonction endothéliale ; 3) de déterminer si les polyphénols du vin rouge sont capables d'induire des relaxations endothélium-dépendantes dans une artère de résistance (l'artère mésentérique) de rats sains mais aussi pathologiques ; 4) de déterminer lors du vieillissement physiologique, si les polyphénols du vin rouge sont capables de prévenir l'apparition d'une dysfonction endothéliale et / ou de l'améliorer chez les animaux âgés. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires de ce dysfonctionnement permettra à plus long terme de proposer de nouveaux traitements pour ces pathologies, en vue de prévenir et/ou de limiter leur évolution.

La première étude a porté sur l'exploration des effets d'un traitement chronique de rats avec l'angiotensine II (0,4 mg/kg/j pendant 3 semaines à l'aide de mini pompes osmotiques sous-cutanées) sur les paramètres hémodynamiques, *in vivo*, et la fonction endothéliale, *ex vivo* sur des anneaux isolés d'artère mésentérique. Les résultats obtenus ont permis de montrer que l'administration chronique d'angiotensine II induit une augmentation significative de la pression artérielle systolique, sans modification de la fréquence cardiaque. A cet effet hypertenseur est associé une dysfonction endothéliale, se caractérisant par une diminution sélective de la composante EDHF de la relaxation sans modification apparente de la composante NO. L'analyse de segments d'artères mésentériques *ex vivo*, en microscopie confocale, a révélé une diminution de plus de 50% de l'expression des connexines Cx37, Cx40 et Cx43 (composant les jonctions gap impliquées dans la vasodilatation médiée par EDHF) et des canaux potassiques IK_{Ca} et SK_{Ca} (impliqués dans la genèse du facteur EDHF) dans la paroi artérielle des animaux hypertendus traités avec l'angiotensine II. Nous avons également observé une production accrue d'espèces

réactives de l'oxygène dans la paroi des artères mésentériques de rats traités chroniquement avec l'angiotensine II, impliquant une augmentation de l'expression de la NADPH oxydase et de la NO synthase endothéliale.

Nous avons pu mettre en évidence que les polyphénols du vin rouge sont capables d'induire les relaxations dans l'artère mésentérique de rats contrôles, par l'activation de la voie PI3-kinase/Akt aboutissant à la formation des facteurs vasorelaxants NO et EDHF, tout comme dans l'artère coronaire de porc. Ainsi nous avons pu montrer l'existence d'une seconde voie de formation des facteurs vasorelaxants dans l'artère mésentérique, différente de la voie calcique stimulée par deux puissants stimulateurs de NO et d'EDHF, l'acétylcholine et la bradykinine. C'est pourquoi durant toutes les expériences réalisées *ex vivo* sur les artères nous avons comparé la capacité des deux stimuli, acétylcholine et polyphénols du vin rouge, à induire la relaxation des artères.

La seconde partie de mon travail a porté sur l'étude de la fonction endothéliale dans un modèle *in vivo* chez le rat de syndrome hépatopulmonaire (SHP) associée à une hypertension portale et une cirrhose biliaire. Ainsi, la ligature de la voie biliaire commune aboutit au développement de cette pathologie. Celle-ci est associée à une dysfonction endothéliale au niveau du lit mésentérique avec une atteinte sélective de la composante EDHF de la relaxation sans modification de la composante NO. Cette atteinte spécifique d'EDHF est associée à une diminution de l'expression des trois connexines Cx37, Cx40 et Cx43 et des deux canaux potassiques dépendants du calcium IK_{Ca} et SK_{Ca} . Nous avons aussi pu mettre en évidence le rôle du stress oxydant chez les animaux malades tant au niveau de l'artère mésentérique qu'au niveau de l'artère pulmonaire, avec une augmentation de la formation d'espèces réactives de l'oxygène, les anions superoxyde par la NADPH oxydase et la NOS endothéliale découplée. Les rats traités préventivement avec de l'apocynine, un inhibiteur de la NADPH oxydase et un antioxydant, ont permis de confirmer le rôle majeur du stress oxydant dans cette pathologie, puisque les rats traités présentent une fonction endothéliale normale. Un second traitement nous a permis de mettre en évidence l'importance de système rénine-angiotensine dans cette pathologie, en effet le traitement préventif au losartan un antagoniste des récepteurs à l'angiotensine II, est capable de prévenir la dysfonction endothéliale et ses mécanismes sous jacents.

Enfin la dernière partie de ma thèse a porté sur l'étude de la fonction endothéliale dans le vieillissement naturel *in vivo* chez le rat, dans laquelle une dysfonction endothéliale progressive a été mise en évidence avec l'avancement de l'âge des animaux. En effet, dès 20 semaines une diminution des relaxations endothélium-dépendantes à l'acétylcholine et aux polyphénols du vin

rouge est observée, diminution s'aggravant entre 40 et 55 semaines. Cette dysfonction endothéliale est caractérisée d'une part par une diminution des connexines Cx37, Cx40 et Cx43 et des canaux potassiques dépendants du calcium IK_{Ca} et SK_{Ca} aboutissant à l'altération des relaxations médiées par EDHF, d'autre part par la formation d'espèces réactives de l'oxygène et la formation de peroxy-nitrites aboutissant à la baisse de la biodisponibilité du NO et donc des relaxations moindres. Le rôle du stress oxydant dans le vieillissement a été confirmé par la capacité d'un traitement préventif et curatif avec l'apocynine, à prévenir et à améliorer les modifications induites avec l'âge. De plus, les traitements avec les polyphénols du vin rouge ont permis de mettre en évidence leur capacité à prévenir l'apparition de la dysfonction endothéliale chez le rat âgé mais aussi de restaurer en partie les relaxations endothélium-dépendantes chez les animaux âgés ayant été traités avec les polyphénols du vin rouge durant un mois. De plus, nous avons analysé l'effet de l'âge sur la capacité physique des animaux et donc sur les conséquences du vieillissement sur l'animal entier. Nous avons pu mettre en évidence une perte de la capacité d'exercice chez les animaux âgés en partie prévenue par l'apocynine et les polyphénols du vin rouge, soulignant ainsi les effets protecteurs et bénéfiques des polyphénols du vin rouge sur l'organisme entier et pas uniquement sur la fonction endothéliale.

Ces études ont permis de mettre en évidence des similitudes dans les mécanismes de l'atteinte vasculaire observée dans l'hypertension artérielle, le syndrome hépatopulmonaire ainsi que dans le vieillissement. Ceux-ci offrent ainsi de nouvelles pistes quant à l'implication majeure du stress oxydant et du système rénine-angiotensine dans ces pathologies. Deux traitements se sont avérés efficaces pour ces pathologies, le losartan dans le traitement du SHP et de ses complications et les polyphénols du vin rouge bénéfiques dans le cas du vieillissement physiologique. Du point de vue clinique, nos résultats suggèrent que le losartan pourrait ainsi ouvrir sa fenêtre thérapeutique au contrôle et à l'amélioration de l'hyperdynamie circulatoire et spécialement dans le SHP, complication de la cirrhose et de l'hypertension portale. Les polyphénols du vin rouge avaient déjà démontré leur capacité à prévenir l'hypertension artérielle mais offrent aujourd'hui de nouveaux espoirs quant à leurs effets bénéfiques pour le système vasculaire au cours du vieillissement physiologique. A l'heure actuelle, des études sont en cours dans l'équipe d'accueil afin de déterminer quelles sont les molécules actives dans l'extrait de vin rouge ; ceci permettant de proposer de nouvelles alternatives thérapeutiques. De plus, l'identification des sources alimentaires (fruits, légumes, boissons) riches en ces molécules actives permettra de proposer des orientations hygiéno-diététiques en conseillant une consommation régulière de ces aliments et boissons.

Table de Matières

ABBREVIATIONS	18
PREAMBULE	19
INTRODUCTION	21
CHAPITRE 1 : L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE AU CŒUR DU CONTROLE DE L'HOMÉOSTASIE VASCULAIRE	21
1.1 Structure et fonctions des artères	22
1.1.1. L'intima ou endothélium	22
1.1.2. La média	23
1.1.3. L'adventice	23
1.2. L'endothélium, source de facteurs vasoactifs.....	24
1.3. La prostacycline	25
1.4. Le monoxyde d'azote (NO)	27
1.4.1. Biosynthèse du NO.....	28
1.4.2. Les NO synthases (NOS).....	29
1.4.3. La NO synthase endothéliale	30
1.4.4. Rôles physiologiques du NO d'origine endothéliale	32
1.5. Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF)	33
1.5.1. Mécanismes d'action et hypothèses quant à la nature d'EDHF	34
1.5.2. Importance d'EDHF	39
1.6. Les facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium (EDCFs)	39
1.6.1. Les dérivés de l'acide arachidonique vasoconstricteurs	40
1.6.2. L'endothéline 1 (ET1)	41
1.6.3. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)	41
1.6.4. L'angiotensine II	42
CHAPITRE 2 : LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE AU CŒUR DES PATHOLOGIES VASCULAIRES	43
2.1 Hypertension artérielle (HTA) systémique	45
2.1.1. Pathophysiologie	46
2.1.2. Hypertension artérielle et fonction endothéliale	48
2.1.3. Lien étroit entre stress oxydant, angiotensine II et hypertension artérielle	49
2.1.4. Importance du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) dans les pathologies vasculaires	51
2.2. Syndrome hépatopulmonaire (SHP)	59
2.2.1. Aspects cliniques	59
2.2.2. Physiopathologie	59
2.2.3. Pathogenèse et fonction endothéliale	61
2.2.4. Un syndrome circulatoire hyperdynamique	63
2.3. Vieillesse vasculaire	64
2.3.1. Vieillesse et pathologies	64
2.3.2. Vieillesse et fonction endothéliale	67
2.3.3. Mécanismes de la dysfonction endothéliale liée à l'âge	67
2.3.4. Vieillesse et stress oxydant	68

CHAPITRE 3 : LE STRESS OXYDANT AU CŒUR DE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE	69
3.1. Espèces réactives de l'oxygène (ROS)	70
3.1.1. Nature et localisation des espèces réactives de l'oxygène	70
3.1.2. Les conséquences du stress oxydant	71
3.2. Rôle de la NADPH oxydase comme source d'anions superoxydes	78
3.3. Rôle de la eNOS comme source d'anions superoxydes	80
3.4. Rôle de la chaîne respiratoire mitochondriale comme source d'anions superoxydes	81
CHAPITRE 4: LES POLYPHENOLS VEGETAUX : PROTECTEURS CARDIOVASCULAIRES	83
4.1. Les polyphénols : généralités	85
4.1.1. Définitions	85
4.1.2. Classification	86
4.1.3. Les polyphénols au centre de notre alimentation	90
4.2 Les effets cardiovasculaires des polyphénols	91
4.2.1. Les polyphénols, une activité anti- et pro-oxydante	92
4.2.2. Les polyphénols, acteurs dans le contrôle de la vasomotricité	93
4.2.3. Les polyphénols, des anti-thrombotiques	94
4.2.4. Les polyphénols, des anti-athérosclérotiques	95
4.2.5. Les polyphénols, des anti-inflammatoires	96
4.2.6. Les polyphénols, des anti-tumoraux	96
4.3. Autres propriétés des polyphénols : des anti-ostéoporoses et des anti-viraux	96
APPROCHES EXPERIMENTALES	97
PARTIE 1 : LES MODELES ANIMAUX	98
1.1. Hypertension artérielle : infusion chronique d'angiotensine II (mémoires 1 et 2)	98
1.1.1. Animaux, conditions d'élevage et chirurgie	98
1.1.2. Protocole expérimental	99
1.1.3. Mesure de pression artérielle et de fréquence cardiaque	100
1.2. Hypertension portale et cirrhose biliaire : ligature de la voie biliaire commune (mémoire 3)	100
1.2.1. Animaux, conditions d'élevage et chirurgie	100
1.2.2. Protocole expérimental	101
1.3. Vieillesse (mémoires 4 et 5)	101
1.3.1. Animaux, conditions d'élevage et protocoles expérimentaux	101
1.3.2. Etude préventive	102
1.3.3. Etude curative	103
1.3.4. Composition du vin et de l'extrait de vin de Corbières	103
1.4. Sacrifices et prélèvements	104
1.4.1. Prélèvements sanguins	105
1.4.2. Prélèvements d'organes	105
PARTIE 2: ETUDE DE LA FONCTION ENDOTHELIALE : LA REACTIVITE VASCULAIRE EN CHAMBRES A ORGANES ISOLEES	107

PARTIE 3: ANALYSES BIOCHIMIQUES ET STATISTIQUES	111
3.1. Immunomarquages et microscopie confocale	112
3.2. Mesures de la formation des espèces réactives de l'oxygène	112
3.3. Immunohistochimie	113
3.4. Mesure de l'activité rénine-plasmatique	113
3.5. Analyses statistiques	114
OBJECTIFS DES ETUDES EXPERIMENTALES	115
RESULTATS EXPERIMENTAUX	117
<u>PUBLICATIONS 1 et 2:</u> Etude de la fonction endothéliale dans un modèle expérimental d'hypertension artérielle <i>in vivo</i> chez le rat	118
<u>PUBLICATION 3:</u> Etude de la fonction endothéliale dans un modèle expérimental de syndrome hépatopulmonaire <i>in vivo</i> chez le rat : rôle du stress oxydant et effets protecteurs du losartan	163
<u>PUBLICATIONS 4 et 5:</u> Etude de la fonction endothéliale dans un modèle de vieillissement <i>in vivo</i> chez le rat : rôle du stress oxydant et effets protecteurs des polyphénols du vin rouge	205
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	275
REFERENCES	291
BILAN DE COMPETENCES - Valorisation des compétences des docteurs - « Un nouveau chapitre de la thèse® »	343

Abbréviations

Listes des abréviations utilisées couramment dans ce mémoire

AA : acide arachidonique

ACh : acétylcholine

Ang II : angiotensine II

APA : apamine

BH₄ : tétrahydrobioptérine

CaM : calmoduline

CBDL : *common bile duct ligation*, ligature de la voie biliaire commune

COXs : cyclooxygénases

CTX : charybdotoxine

Cx : connexines

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine II

EDCFs : *endothelium-derived contracting factor*, facteurs contracturants dérivés de l'endothélium

EDHF : *endothelium-derived hyperpolarizing factor*, facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

ET1 : endothéline 1

eNOS : NO synthase endothéliale

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

IK_{Ca} : canaux potassiques dépendants du calcium d'intermédiaire conductance

JGME : jonctions gap myoendothéliale

L-NA : N^w-nitro-L-arginine

NO : monoxyde d'azote

O₂⁻ : anions superoxyde

OH⁻ : anions hydroxyl

ONOO⁻ : peroxydinitrite

PGH₂, PGG₂ : prostaglandines H₂ et G₂, PGI₂ : prostacycline

ROS : *reactive oxygen species*, espèces réactives de l'oxygène

SK_{Ca} : canaux potassiques dépendants du calcium de faible conductance

SOD : superoxyde dismutase

SHP : syndrome hépatopulmonaire

SHR : *spontaneous hypertensive rats*, rats spontanément hypertendus

SRAA : système rénine-angiotensine-aldostérone

TXA₂ : thromboxane A₂

Préambule

L'endothélium constitue une interface cellulaire obligatoire entre le sang circulant et la paroi vasculaire. Il est considéré aujourd'hui comme une véritable glande endocrine capable de moduler la plupart des fonctions vasculaires pour maintenir l'homéostasie circulatoire. La régulation du tonus vasculaire, de l'adhésion cellulaire, de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et des processus inflammatoires en sont des exemples (Vanhoutte, 1982 ; Vanhoutte et Rimele, 1982 ; Moncada *et al.*, 1991 ; Schini-Kerth *et al.*, 1994 ; Busse et Fleming, 1995 ; Deanfield *et al.*, 2007). Sa position privilégiée, ainsi que les conditions physiologiques circulatoires, rendent l'ensemble des cellules endothéliales très sensibles aux modifications pathologiques. Depuis une vingtaine d'années, les données expérimentales et cliniques démontrent que l'endothélium vasculaire est une cible privilégiée des facteurs de risque cardiovasculaire. Il peut subir des modifications fonctionnelles dites d'adaptation ou d'aggravation du risque. Ces modifications subies par l'endothélium en réponse au risque cardiovasculaire sont regroupées sous le terme de « dysfonction endothéliale ». L'hypothèse de travail dérivée de ces observations est que la dysfonction des cellules endothéliales joue un rôle dans l'initiation et la progression les maladies cardiovasculaires. Les études qui abordent cette hypothèse continuent d'apporter une compréhension plus profonde des mécanismes physiopathologiques et de suggérer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Étant donné le rôle majeur de la dysfonction endothéliale dans la maladie cardiovasculaire, on comprend pourquoi elle est rapidement apparue comme une cible préventive et thérapeutique prioritaire.

Selon différentes données épidémiologiques, il existe une corrélation inverse entre risque cardiovasculaire et consommation de polyphénols d'origine naturelle (Ruf, 1999 ; Stoclet *et al.*, 2004). 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 et par d'autres équipes, que des extraits polyphénoliques de vin rouge et des polyphénols d'autres origines augmentent la production par l'endothélium de facteurs relaxants, notamment du NO (Fitzpatrick *et al.*, 1993 ; Cishek *et al.*, 1997 ; Stoclet *et al.*, 1999). Ces composés étant aussi connus pour leurs propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anti-agrégants plaquettaires (Agarwal, 2002 ; Duffy *et al.*, 2003) une partie de leur effet protecteur pourrait ainsi être liée à la normalisation de la biodisponibilité du NO.

Ainsi, l'objectif général de ce travail de thèse a été d'étudier la fonction endothéliale dans différents modèles expérimentaux de pathologies cardiovasculaires chez l'animal et plus particulièrement d'analyser le rôle du stress oxydant dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle, du syndrome hépatopulmonaire et du vieillissement « naturel ». Les objectifs spécifiques ont été :

- De déterminer s'il y avait ou non présence d'une dysfonction endothéliale dans les modèles animaux d'hypertension artérielle, de SHP, de vieillissement physiologique dans l'artère mésentérique de rats ;
- D'en déterminer les caractéristiques et les mécanismes sous jacents, notamment au niveau de la formation des facteurs vasorelaxants NO et EDHF;
- De mettre en évidence le rôle primordial du stress oxydant dans la dysfonction endothéliale ;
- De déterminer si les polyphénols du vin rouge étaient aussi capables d'induire des relaxations endothélium-dépendantes dans l'artère mésentérique de rats sains et pathologiques ;
- De déterminer dans le cadre du vieillissement physiologique, si les polyphénols du vin rouge étaient capables de prévenir l'apparition d'une dysfonction endothéliale et / ou de l'améliorer chez les animaux pathologiques.

L'ensemble de ce travail se décompose en plusieurs parties :

- * Une introduction bibliographique sur les connaissances actuelles au niveau de l'endothélium, des pathologies cardiovasculaires et des polyphénols végétaux ;
- * Une partie exposant les techniques communes utilisées pour les différentes études ;
- * Une partie présentant les principaux résultats expérimentaux intégrant les publications concernant les différentes études sur l'animal ;
- * Une conclusion générale et des perspectives.

CHAPITRE 1 :

L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE AU CŒUR DU CONTROLE DE L'HOMÉOSTASIE VASCULAIRE

CHAPITRE 1 : L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE AU CŒUR DU CONTROLE DE L'HOMÉOSTASIE VASCULAIRE

1.1 Structure et fonctions des artères :

La paroi artérielle est constituée de trois couches individualisées, de la lumière à la périphérie (Figure 1) : l'intima, la média et l'adventice (Mulvany et Aalkjaer, 1990).

1.1.1. L'intima ou endothélium :

C'est la couche la plus interne, elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales et d'une base extracellulaire (collagène, glycoprotéines). L'intima joue un rôle majeur d'interface entre le sang et la paroi artérielle. Les cellules endothéliales ont une fonction fibrinolytique, antithrombotique, elles permettent la modulation de la vasomotricité artérielle par la synthèse et la transmission de nombreuses substances vasoactives vers le muscle lisse sous-jacent [voir paragraphe 1.2].

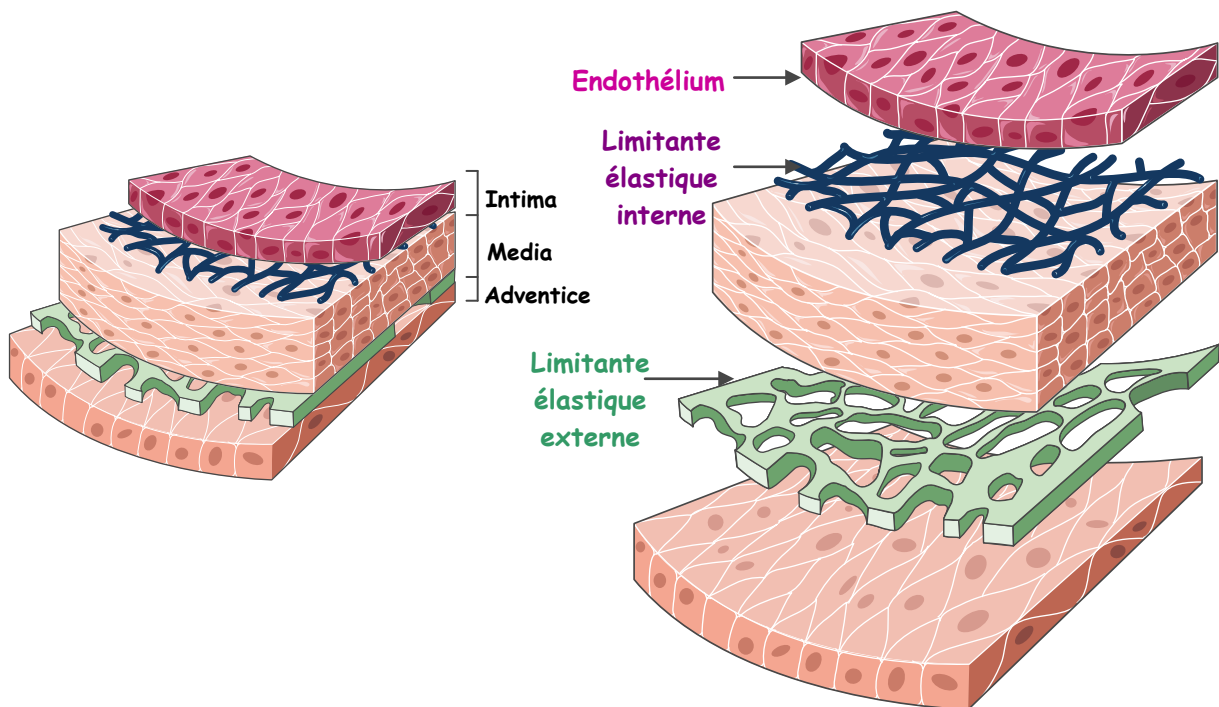


Figure 1 : Représentation schématique des différentes tuniques de la paroi vasculaire.

1.1.2. La média :

C'est la couche centrale, la plus épaisse de la paroi artérielle. Dans les artères de conductance (aorte) elle est limitée par une lame élastique interne côté luminal et une lame élastique externe et se compose d'une succession de sous-couches délimitées par les lames élastiques. Dans les artères de résistance (mésentérique de 1^{ème}, 2^{ème} ordre...), la lame élastique externe est fragmentée ou bien absente. La média est constituée essentiellement d'un type cellulaire prédominant, la cellule musculaire lisse vasculaire. Celle-ci est insérée dans une matrice extracellulaire qu'elle secrète et qui est constituée de fibres d'élastine et de collagène. Les cellules musculaires lisses sont indispensables pour la relaxation et la contraction des artères.

1.1.3. L'adventice :

C'est la couche périphérique, constituée de tissu conjonctif (élastine, collagène), de fibroblastes, macrophages, terminaisons nerveuses et vasa vasorum (pour l'apport d'oxygène et nutriments). Les terminaisons nerveuses sont plus nombreuses sur les vaisseaux de faible calibre et musculaire alors que les vasa vasorum sont plus importants dans les artères de gros calibre (> 200 μm). Cette couche externe joue un rôle dans la régulation de la vasomotricité en libérant des neurotransmetteurs responsables de signaux divers pour la cellule musculaire lisse. Les fibroblastes sont aussi capables de produire des médiateurs vasoactifs comme le NO (Kleschyov *et al.*, 1998, 2000b) ou les anions superoxydes (Pagano *et al.*, 1997) et ainsi d'affecter le tonus vasculaire (Gutterman, 1999 ; Rey *et al.*, 2002).

C'est sur cette structure en trois couches que reposent de nombreuses fonctions physiologiques dont la principale est d'assurer l'irrigation sanguine des différents organes. Il existe également de nombreuses interactions entre les différentes couches, plus particulièrement entre les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales, mais également avec les éléments du plasma et figurés du sang (plaquettes, globules rouges et blancs...).

Selon les secteurs artériels considérés, la structure et l'importance relative de chaque tunique varient et confèrent à ces secteurs des propriétés caractéristiques. Le système artériel est subdivisé en deux grands secteurs, en fonction des propriétés mécaniques et structurales de la paroi artérielle : * **les artères de conductance** : élastiques, de gros calibre, où la matrice extracellulaire joue un rôle important. Elles opposent une très faible résistance au débit sanguin et ont un rôle hydraulique. * **les artères de résistance** : musculaires, de moyen et de petit calibre, où la média est moins organisée et la trame élastique moins importante. Ces artères

distribuent le sang en volume et pression adéquate au niveau des capillaires, participant ainsi à la régulation physiologique de la résistance périphérique pré-capillaire.

1.2 L'endothélium, source de facteurs vasoactifs :

L'endothélium vasculaire n'est plus considéré comme une simple barrière inerte entre le sang et les tissus (Bunting *et al.*, 1976 ; Furchgott et Zawadzki, 1980). Bien au contraire, les diverses fonctions de l'endothélium comprennent le contrôle du tonus vasculaire, de la perméabilité endothéliale, l'agrégation plaquettaire mais aussi l'adhésion des plaquettes et des leucocytes, la prolifération des cellules musculaires lisses et la régulation de divers paramètres plasmatiques et de la fibrinolyse (Vanhoutte, 1982 ; Vanhoutte et Rimele, 1982 ; Moncada *et al.*, 1991 ; Schini *et al.*, 1994 ; Fleming et Busse, 1995). Les facteurs impliqués dans ces nombreux processus physiologiques sont sécrétés lorsque l'endothélium est activé par des agonistes tels que : les neurotransmetteurs (acétylcholine, noradrénaline, adénosine tri-phosphate, substance P), les hormones circulantes (catécholamines, vasopressine, angiotensine II, insuline), les autacoïdes (bradykinine, adénosine diphosphate (ADP)/adénosine triphosphate (ATP), endothéline), les produits des plaquettes ou de la coagulation sanguine (sérotonine, adénosine diphosphate, thrombine). Ces agonistes se lient principalement à des récepteurs couplés aux protéines G et entraînent une augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire dans la cellule endothéliale, responsable des différents effets vasoactifs via la stimulation de différentes enzymes.

Le tonus vasculaire est régulé par de nombreux facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs endothéliaux. Les facteurs vasoconstricteurs sont principalement composés du thromboxane A_2 , des anions superoxydes, de l'endothéline-1, de la prostaglandine H_2 et de l'angiotensine II (Furchgott et Vanhoutte, 1989 ; Schiffrin et Touyz, 2004). Les trois principaux facteurs vasorelaxants (figure 2) sont le monoxyde d'azote ou **NO**, la prostacycline ou **PGI₂** et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ou **EDHF**. Ainsi, l'endothélium joue un rôle crucial en maintenant un équilibre entre vasoconstriction et vasodilatation, en régulant la prolifération des cellules musculaires lisses et en maintenant un équilibre entre des activités anti- et pro-fibrinolytique et anti- et pro-thrombotique (figure 3).

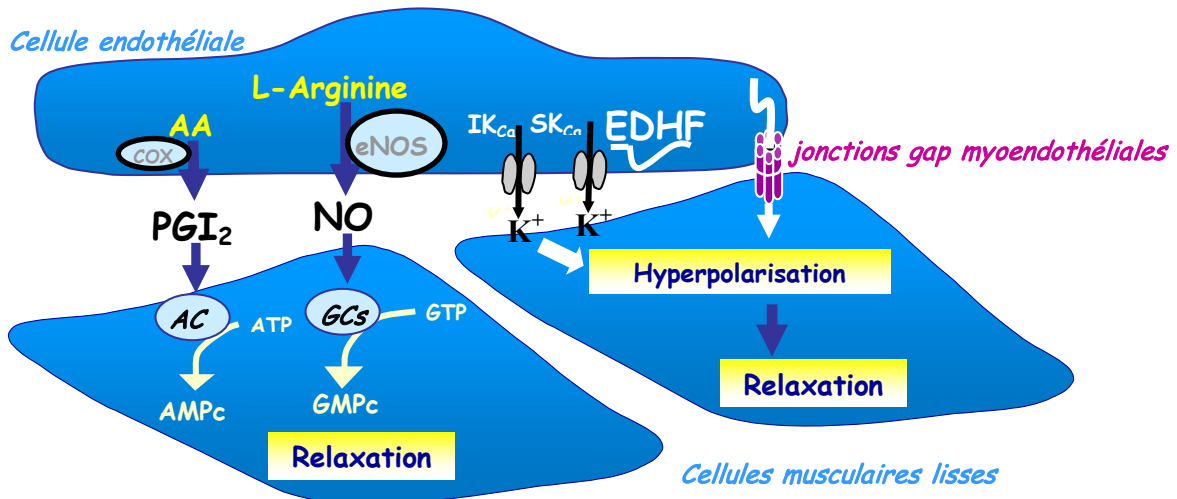


Figure 2 : Facteurs vasorelaxants synthétisés par l'endothélium.

AA : acide arachidonique, AC : adénylyl cyclase, COX : cyclooxygénase, EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, GCS : guanylyl cylase soluble, IK_{Ca} et SK_{Ca} : canaux potassiques dépendants du calcium de moyenne et de faible conductance, K^+ : potassium, NO : monoxyde d'azote, eNOS : NO synthase endothéliale, PGI_2 : prostacycline.

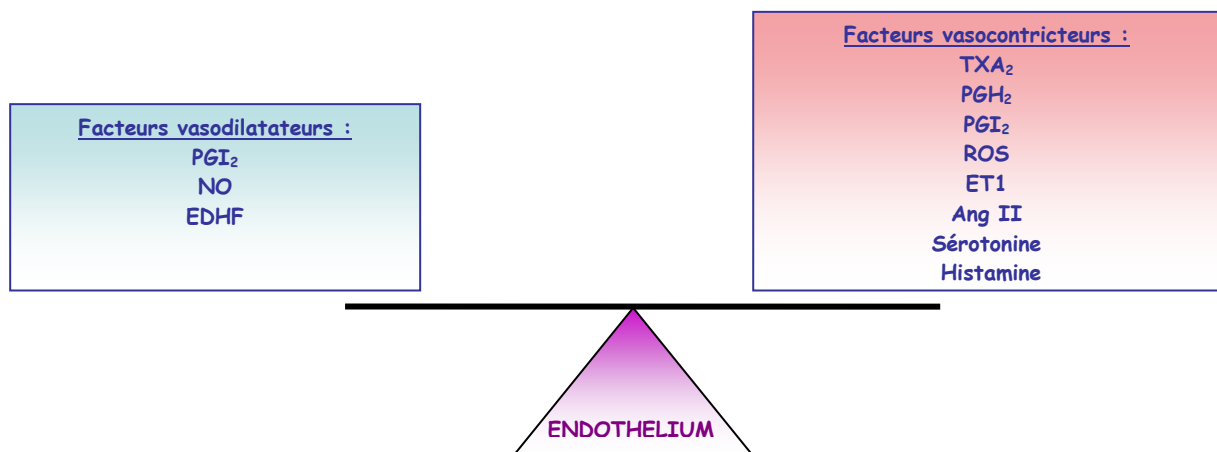


Figure 3 : Fonctions de régulation de l'endothélium.

Ang II : angiotensine II, EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, ET1 : endothéline 1, NO : monoxyde d'azote, PGI_2 : prostacycline, PGH_2 : prostaglandine, ROS : espèces réactives de l'oxygène, TXA_2 : Thromboxane A_2 .

1.3 La prostacycline (PGI_2) :

La prostacycline PGI_2 appartient à la famille des eicosanoïdes, des dérivés de l'acide arachidonique, et a été découverte en 1976 par Bunting, Gryglewski, Moncada et Vane (Bunting *et al.*, 1976). Les eicosanoïdes sont synthétisés par l'enzyme cyclooxygénase COX-1 exprimée constitutivement par ces cellules. La synthèse de PGI_2 se faisant à partir de l'acide arachidonique, la disponibilité de l'acide arachidonique représente un facteur limitant de la synthèse de PGI_2 . L'acide arachidonique est libéré par la phospholipase A_2 (PLA_2) à partir des

phospholipides membranaires. L'acide arachidonique sera alors transformé par la COX-1 en PGG₂, un endoperoxyde cyclique instable. A son tour, PGG₂ est convertie en PGH₂ (Hecker et Ullrich, 1989). PGH₂ est aussi instable et va subir une isomérisation catalysée par la PGI₂ synthase, aboutissant ainsi à la formation de PGI₂. Dans des conditions de pH physiologiques, la demi-vie de PGI₂ est d'environ 3 minutes. A son tour, PGI₂ est hydrolysée en 6-kéto-PGF_{1α} qui est stable mais inactif. Au niveau endothélial on trouvera également d'autres prostaglandines telles que PGE₂, PGF_{2α} et PGD₂ (Lamontagne *et al.*, 1992) (Figure 4). La production de PGI₂ est stimulée par divers stimuli tels que l'hypoxie, les forces de cisaillement, en réponse à l'activation des récepteurs pour l'ATP, l'ADP, la bradykinine, l'histamine et la thrombine et en réponse à des stimuli indépendants de récepteurs tels que l'ionophore calcique A23187 et divers cations (Newby et Henderson, 1990 ; Quadt *et al.*, 1982). La synthèse de PGI₂ est dépendante de la concentration en calcium cytosolique qui est nécessaire à l'activité de la PLA₂ responsable de la libération de l'acide arachidonique (White et Martin, 1989).

Tout comme le NO, la PGI₂ est un puissant vasodilatateur et un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et de l'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales mais également aux cellules musculaires lisses (Higgs *et al.*, 1978 ; Lamontagne *et al.*, 1992 ; Moncada *et al.*, 1976). On lui attribue également des effets anti-prolifératifs pour les cellules musculaires lisses vasculaires (Peiro *et al.*, 1995 ; Shirovani *et al.*, 1991). De plus, le NO et la PGI₂ vont pouvoir exercer des effets synergiques sur ces différentes cibles (Radomski *et al.*, 1987).

Une fois synthétisée, PGI₂ va diffuser librement et venir se lier au niveau de récepteurs à la prostacycline, des récepteurs à sept domaines transmembranaires que l'on trouvera au niveau des cellules cibles (Smyth et FitzGerald, 2002). Ces récepteurs vont activer l'adénylyl cyclase localisée au niveau membranaire, ce qui résulte en une augmentation de la formation d'AMP cyclique. L'AMP cyclique ainsi produit active la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique, la PKA, capable d'induire notamment la relaxation des cellules musculaires lisses (Adelstein et Hathaway, 1979). D'autre part, la PGI₂ est également capable d'activer différents canaux dépendants de l'ATP tels que les canaux potassiques dépendants de l'ATP, les canaux potassiques dépendants du calcium à large conductance, les canaux potassiques à rectification entrante et les canaux potassiques voltage-dépendants participant tous à la relaxation du muscle lisse vasculaire (Félétou et Vanhoutte, 2006a). De par ces nombreux effets sur les plaquettes et sur le tonus vasculaire, la PGI₂ est un puissant facteur anti-thrombotique. Ainsi, le transfert du gène codant pour la cyclooxygénase de type 1, à l'origine de la synthèse de PGI₂, a un effet anti-thrombotique et antihyperplasique dans des modèles animaux d'angioplastie (Wu, 1996). En revanche, dans

certaines conditions, la prostacycline peut avoir des effets vasoconstricteurs (Rapoport et Williams, 1996 ; Gluais et al., 2005) [voir paragraphe 1.6.1].

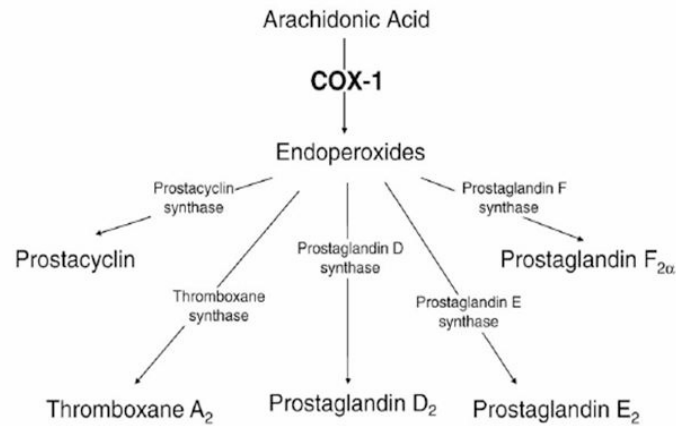


Figure 4 : Métabolisme de l'acide arachidonique en prostanoïdes spécifiques (d'après Tang et Vanhoutte, 2009).

1.4 Le monoxyde d'azote (NO) :

Connu depuis la fin des années 1970 comme l'un des ligands capables d'activer la guanylyl cyclase soluble et responsable de la relaxation des muscles lisses vasculaires (Katsuki *et al.*, 1977), le monoxyde d'azote ou NO n'a pu être considéré comme un vasodilatateur endogène que quelques années plus tard, suite à la découverte par Furchgott et Zawadzki du rôle essentiel de l'endothélium dans la relaxation du muscle lisse vasculaire par le facteur relaxant dérivé de l'endothélium ou *endothelium-derived relaxing factor*, EDRF (Furchgott et Zawadzki, 1980). En 1986, Furchgott et Ignarro notaient que le NO et l'EDRF relaxaient le muscle lisse de façon identique et étaient similairement piégés par l'hémoglobine et l'anion superoxyde (Rubanyi et Vanhoutte, 1986 ; Gryglewski *et al.*, 1986 ; Ignarro *et al.*, 1988). Ils proposèrent alors que l'EDRF puisse être le NO ou un composé labile libérant du NO, conclusion confirmée par la suite par de nombreuses études biologiques et pharmacologiques (Palmer *et al.*, 1987, 1988a, b, 1989 ; Moncada, 1997). Le prix Nobel de Médecine honorait en 1998 trois chercheurs américains Furchgott, Murad et Ignarro pour leurs travaux sur le NO.

1.4.1. Biosynthèse du NO

Le NO est une molécule biatomique gazeuse non chargée. Le NO est un radical libre car une de ses orbitales externes contient un électron non apparié. Sa synthèse s'effectue à partir de la L-arginine grâce à la NO synthase (NOS) (Palmer *et al.*, 1988b). En présence de NADPH (nicotinamide-adenine-dinucléotide-phosphate) comme donneur d'électron, qui est transmis via le couple FAD (flavine-adenine-dinucléotide) et FMN (flavine-mononucléotide) au fer de l'hème en présence de tétrahydrobioptérine (BH₄) et d'oxygène, la NOS transforme la L-arginine en hydroxyarginine qui, peut être libéré du site actif de l'enzyme et exercer des effets autocrines ou paracrines, mais qui après réduction est transformée en NO et citrulline selon la réaction suivante (figure 5) :

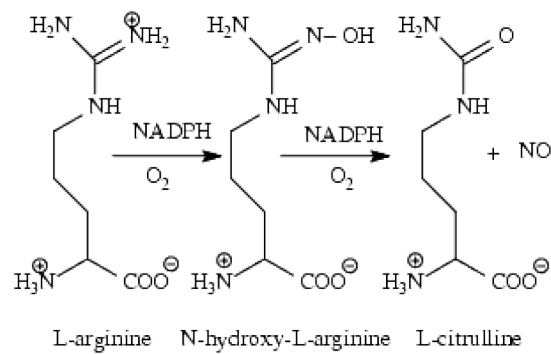


Figure 5 : Biosynthèse du NO à partir de la L-arginine (d'après Stuehr *et al.*, 1991).

La citrulline, en présence de l'arginosuccinate synthétase et d'aspartate, est transformée en arginosuccinate, puis en fumarate et L-arginine. La L-arginine provient ainsi d'un renouvellement endogène et d'un apport exogène, alimentaire.

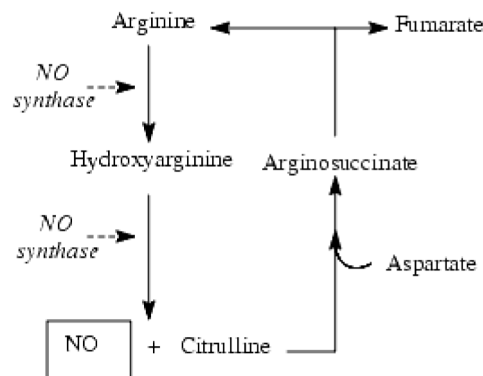


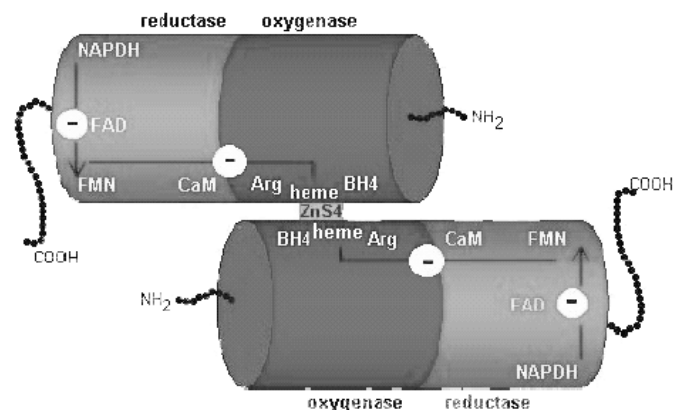
Figure 6 : Biosynthèse du NO et régénération de la L-arginine (d'après Stuehr *et al.*, 1991).

1.4.2. Les NO synthases (NOS)

Les NOSs sont des enzymes contenant un groupement hème. Plusieurs isoformes des NOSs ont été décrites : deux isoformes sont constitutivement actives, les isoformes endothéliale (eNOS ou de type III) et neuronale (nNOS ou de type I) et une troisième isoforme est dite inducible (iNOS ou de type II) en réponse à différents stimuli du système immunitaire. Les 3 isoformes sont codées par 3 gènes différents et possèdent entre elles environ 53% d'homologie (Nathan et Xie, 1994). Ces trois isoformes ont en commun une même organisation de leur domaines catalytiques : une activité oxygénase dans la partie N-terminale, une partie réductase dans la partie C-terminale et entre les deux domaines un site de liaison de la calmoduline (Griffith et Stuehr, 1995 ; Alderton *et al.*, 2001). Le domaine d'activité oxygénase contient les sites de liaison de l'hème, de la L-arginine et de BH₄. Le domaine d'activité réductase va contenir les sites de liaison de la nicotinamide adénine diphosphate sous forme réduite (NADPH) et de cofacteurs flaviniques : la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide (FMN) (figure 7).

Figure 7 : Représentation schématique de la structure des NOS et du transfert d'électron du domaine réductase vers le domaine oxygénase de l'enzyme.

Les électrons sont fournis par le NADPH au niveau du domaine réductase. La protéine comporte plusieurs sites de liaison : du substrat, de l'arginine, l'hème, de la calmoduline, et des cofacteurs : NADPH, BH₄, FAD et FMN. (D'après Albrecht *et al.*, 2003).



Les NOSs constitutives (eNOS et nNOS) possèdent une activation dépendante du calcium se fixant à la calmoduline, donc rapide et de courte durée (quelques minutes) et produisent de faible quantité de NO (nM). A l'opposé la iNOS voit son expression augmenter en réponse à divers stimuli (interféron γ , lipopolysaccharide bactérien, interleukine 1 β ,...) et est activée en absence de calcium, entraînant une plus forte production de NO (μ M) sur une plus longue durée (plusieurs jours) (Nathan et Xie, 1994). A l'état natif, les NOS sont des protéines hémiques monomériques. La forme monomérique n'est pas liée à l'hème et ne produit pas de NO mais possède une activité cytochrome P₄₅₀ réductase. La liaison d'une molécule d'hème au niveau du domaine oxygénase provoque la dimérisation qui va permettre l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline. Cette réaction nécessite la présence du cofacteur BH₄.

1.4.3. La NO synthase endothéliale :

La eNOS est une protéine de masse moléculaire 134 kDa. Elle est exprimée principalement dans les cellules endothéliales vasculaires et les plaquettes ainsi que dans certaines populations de neurones et dans l'épithélium respiratoire (Moncada *et al.*, 1997). C'est aussi l'isoforme la plus largement exprimée dans le cœur en condition physiologique, au niveau de l'endothélium endocardique et des cardiomyocytes (Mungrue *et al.*, 2002). Cette isoforme présente une régulation de son activité catalytique par le complexe Ca^{2+}/CaM ainsi que par son état de phosphorylation / déphosphorylation (Fleming et Busse, 1999). L'activité enzymatique de la eNOS peut être modulée (Förstermann *et al.*, 1998 ; Li *et al.*, 2002a, b) au niveau de son activité (Schini *et al.*, 1990 ; Castro *et al.*, 1998) et de son expression (Arnal *et al.*, 1999), par les médiateurs circulants, les forces de cisaillement, les agonistes variés (bradykinine, sérotonine, adénosine, ADP/ATP, histamine, thrombine).

- Activation de la NO synthase endothéliale par le calcium :

L'activation de la eNOS implique plusieurs voies de signalisation et une translocation vers l'appareil de Golgi (Fleming et Busse, 2003). Dans la cellule endothéliale au repos, la eNOS est liée à la cavéoline, une protéine structurale des caveolae, microdomaines membranaires impliqués dans la transduction des signaux. A basse concentration cytosolique de Ca^{2+} , la eNOS est liée à la protéine Hsp90 (*Heat Shock Protein-90*) ce qui a pour conséquence une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour le complexe Ca^{2+}/CaM et favorise donc la dissociation de la cavéoline à la eNOS (Takabashi *et al.*, 2003). La liaison de la eNOS à Hsp90 permet également l'interaction entre l'enzyme et les kinases impliquées dans la phosphorylation de l'enzyme par la voie de la protéine kinase Akt (Fleming et Busse, 2003). Lorsque les cellules endothéliales sont activées par un stimulus externe, l'augmentation consécutive de la concentration cytosolique de Ca^{2+} va entraîner de par la liaison du Ca^{2+} au complexe Ca^{2+}/CaM , la dissociation de la eNOS de la cavéoline. L'association avec Hsp90 permettant ensuite une phosphorylation de la eNOS par des kinases dont la nature va varier en fonction de la nature du stimulus (Fleming et Busse, 2003 ; Shaul, 2002). L'enzyme ainsi activée se localiserait ensuite au niveau de l'appareil de Golgi (Sowa *et al.*, 1999) où elle est capable de produire du NO (Fulton *et al.*, 2002) (figure 8).

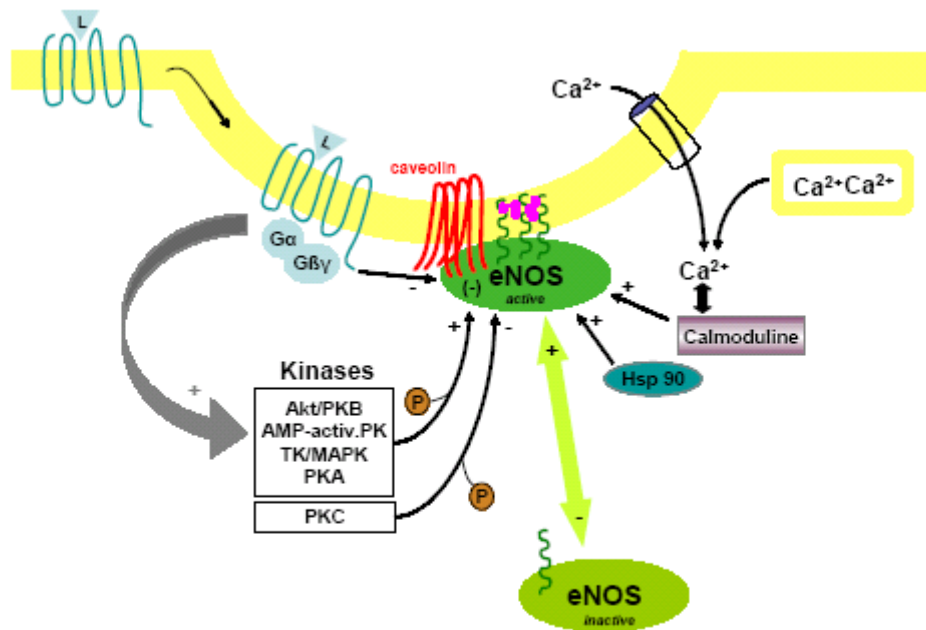


Figure 8 : Mécanismes hypothétiques de la régulation de l'activité de la NO synthase endothéliale dans les caveolae. La eNOS active est prioritairement localisée dans les cavéoles dont la membrane est enrichie en cholestérol. L'interaction avec la **cavéoline** inhibe en partie l'activité eNOS. Classiquement la fixation d'un **ligand (L)** sur un récepteur transloqué dans les cavéoles stimule une ou plusieurs kinases impliquées dans la phosphorylation de la eNOS. Ces phosphorylations peuvent activer (+) ou inhiber (-) l'activité de la eNOS en fonction des acides aminés cibles. Par ailleurs l'activation nécessite la formation du complexe **calmoduline/calcium**, ce dernier ayant pour origine les stocks intracellulaires à proximité des cavéoles où l'entrée de calcium extracellulaire. L'activité eNOS est augmentée par Hsp90 (heat shock protein 90 KDa) et diminuée par l'interaction avec le domaine C-terminal de certains **RCPGs** (D'après Shaul *et al.*, 2002).

- **Activation de la NO synthase endothéliale indépendante du calcium :**

Bien que l'activité de la eNOS soit couplée à une augmentation du niveau de $[Ca^{2+}]_i$, son activation passe aussi par des mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation (Fleming et Busse, 2003 ; Jin *et al.*, 2003). Busse et Fleming (2003) ont montré que des forces de cisaillement exercées par le flux sanguin activent la eNOS indépendamment de l'élévation de $[Ca^{2+}]_i$. Ainsi, il a été montré que l'activité de la eNOS peut être induite par divers inhibiteurs de tyrosine kinases (Fleming *et al.*, 1996 ; 1997a, b), ou de sérine phosphatases (Dimmeler *et al.*, 1999 ; Gallis *et al.*, 1999). Ces effets pourraient être dus à la phosphorylation d'une protéine modulant directement la eNOS. Par exemple, la protéine Hsp90 est phosphorylée en tyrosyl, suite à une stimulation par divers agonistes, ce qui induit sa liaison avec la eNOS et l'activation de l'enzyme (Harris *et al.*, 2000 ; Venema *et al.*, 1996). En revanche, il est clairement établi que l'activation de la eNOS par ces forces de cisaillement exercées par le flux sanguin est liée à la phosphorylation de résidus sérine par la voie PI3-kinase / Akt (Busse et Fleming, 2003 ; Dimmeler *et al.*, 1999 ; Gallis *et al.*, 1999 ; Jin *et al.*, 2003). Ces forces de cisaillement exercées par le flux activent le

récepteur R₂ du VEGF par le biais des Src kinases et une activation de la voie PI3-kinase/Akt suivie d'une phosphorylation de la eNOS (Jin *et al.*, 2003). L'activation de cette voie indépendamment du calcium peut être stimulée par le VEGF ou les œstrogènes (Dimmeler *et al.*, 1999 ; Haynes *et al.*, 2000). L'état de phosphorylation de la eNOS joue donc un rôle important dans la régulation de son activité : la phosphorylation des résidus sérines 1177, 633, 615 conduit généralement à son activation alors que celle sur le résidu thréonine 495 et sérine 114 sont inhibitrices (Mount *et al.*, 2007) (figure 9).

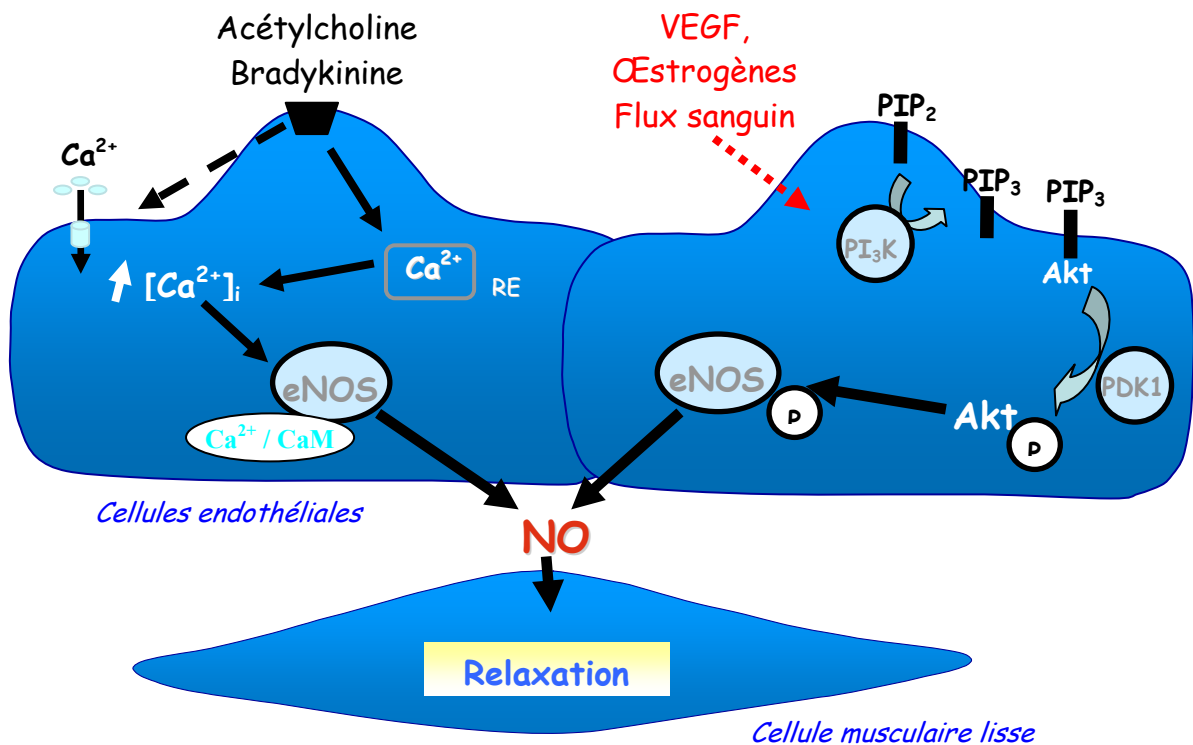


Figure 9 : Voies de synthèse du NO. [Ca²⁺]_i : concentration en calcium intracellulaire ; CaM : calmoduline, eNOS : NO synthase endothéliale ; PIP₂ : lipides membranaires phosphatidylinositol-4,5-biphosphates ; PIP₃ : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphates ; PI₃K : PI₃-kinase ; PDK1 : protéine kinase 1 dépendante des phosphoinositides ; P : site phosphorylé ; RE : réticulum endoplasmique.

1.4.4. Rôles physiologiques du NO d'origine endothéliale

Le NO d'origine endothéliale exerce localement des effets multiples (figure 10). 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 luminale 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 superoxydes. 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 inhiber 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).

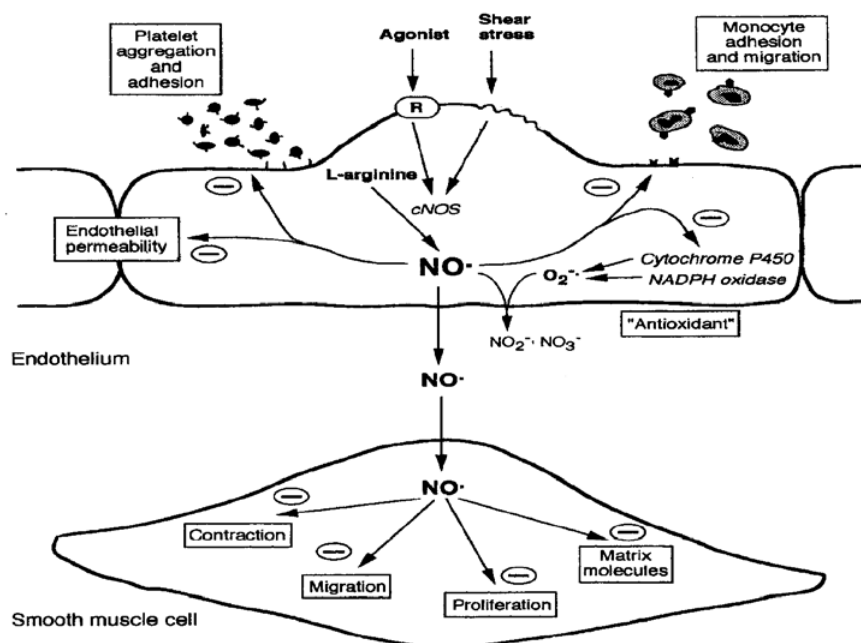


Figure 10 : Effets multiples du NO endothélial.

eNOS : NO synthase endothéliale, NO : monoxyde d'azote, NO_2^- : ion nitrite, NO_3^- : ion nitrate, O_2^- : anions superoxyde, R : récepteur, - : inhibition (d'après Schini-Kerth, 1999).

1.5 Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) :

Le troisième facteur intervenant dans le contrôle du tonus vasculaire est le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ou *endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF. La formation d'EDHF comme celle du NO et de la PGI_2 a été décrite comme étant dépendante du calcium et pouvant être induite soit par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G par des agonistes tels que l'acétylcholine, la bradykinine et la substance P, soit par des stimuli indépendants de l'activation de récepteurs tels que l'ionophore calcique A23187, la thapsigargine ou l'acide cyclopiazonique (Luckhoff *et al.*, 1988 ; Johns *et al.*, 1988 ; Chen et Suzuki, 1990 ;

Cowan et Cohen, 1991 ; Cheung *et al.*, 1992). Il est admis que, quelle que soit sa nature (figure 11), le phénomène EDHF prend naissance avec une hyperpolarisation résultant de l'activation de canaux potassiques calcium-dépendants de faible et moyenne conductance (SK_{Ca} et IK_{Ca}) localisés au niveau des cellules endothéliales. Ces canaux sont activés par une augmentation du calcium intracellulaire stimulée par les agonistes vasculaires (Marrelli *et al.*, 2003 ; Garland et Plane, 1996 ; Corriu *et al.*, 1996 ; Ding *et al.*, 2003 ; Gluais *et al.*, 2005).

Dans la plupart des vaisseaux sanguins, humains et animaux, résistifs et de moyen diamètre, y compris les artères coronaires, des études électrophysiologiques ont démontrées l'existence d'une hyperpolarisation dépendante de l'endothélium et qui est responsable de la relaxation des muscles lisses. Elle est résistante à la combinaison d'inhibiteurs de la eNOS et des COXs et peut être stimulée par les agonistes classiques tels que l'acétylcholine et la bradykinine (Komori *et al.*, 1988 ; Nagao et Vanhoutte, 1992 ; Garland et McPherson, 1992 ; Chataigneau *et al.*, 1998 ; Ohashi *et al.*, 1999 ; Quignard *et al.*, 2000).

1.5.1. Mécanismes d'action et hypothèses quant à la nature d'EDHF :

La nature chimique de l'EDHF suscite actuellement encore de nombreuses interrogations et semble être variable d'un lit vasculaire à l'autre. Dans pratiquement tous les vaisseaux les réponses médiées par EDHF sont supprimées par une combinaison de deux toxines, la charybdotoxine et l'apamine, inhibant les canaux potassiques IK_{Ca} et SK_{Ca} , respectivement (Corriu *et al.*, 1996 ; Chataigneau *et al.*, 1998a). Cette composante est insensible à un inhibiteur des canaux potassiques dépendant de l'ATP, la glibenclamide (Corriu *et al.*, 1996), et elle est résistante aux inhibiteurs de la eNOS et de COXs (Komori *et al.*, 1988 ; Nagao et Vanhoutte, 1992 ; Garland et McPherson, 1992). L'hyperpolarisation endothéliale est un pré-requis pour l'hyperpolarisation et la relaxation des cellules musculaires lisses sous-jacentes dans la signalisation d'EDHF (Doughty *et al.*, 1999 ; Ohashi *et al.*, 1999). La transmission de l'hyperpolarisation entre les deux types cellulaires implique vraisemblablement soit les ions K^+ issus de l'efflux potassique endothélial, K^+ pouvant activer à la fois la pompe Na^+/K^+ ATPase et les canaux potassiques rectifiant entrant des cellules musculaires lisses, soit des jonctions gap myo-endothéliales composées de connexines permettant la transmission de l'hyperpolarisation des cellules endothéliales aux cellules musculaires lisses (Dora *et al.*, 1997 ; Beny et Pacicca, 1994 ; Marchenko et Sage, 1994 ; Yamamoto *et al.*, 1999). Cette hyperpolarisation a pour principal effet d'empêcher l'activation des canaux calciques dépendants du potentiel des cellules musculaires

lisses vasculaires, entraînant une diminution de la concentration cytosolique en calcium libre et la relaxation (Busse *et al.*, 2002).

Plusieurs hypothèses ont été émises quant à la nature d'EDHF (figure 11) :

- **Les métabolites des cytochromes P450 mono-oxygénases** : A partir d'expériences réalisées principalement sur des troncs coronaires d'origine canine, porcine ou bovine, de nombreux auteurs ont suggéré que les réponses attribuées à l'EDHF impliquaient les acides epoxyeicosatriénoïques, les EETs (Hecker *et al.*, 1994 ; Rubanyi *et al.*, 1987 ; Bauersachs *et al.*, 1996 ; Campbell *et al.*, 1996 ; Fisslthaler *et al.*, 1999 ; Quilley *et al.*, 2000 ; Féléto et Vanhoutte, 2006). Les EETs auraient pour cible la cellule musculaire lisse et entraîneraient son hyperpolarisation en augmentant la probabilité d'ouverture des canaux potassiques K_{Ca} de ces cellules (Campbell *et al.*, 1996 ; Gebremedhin *et al.*, 1992 ; Fulton *et al.*, 1998 ; Fisslthaler *et al.*, 1999). Enfin, si les EETs peuvent exercer une action sur les cellules musculaires lisses, ces composés jouent également un rôle majeur au sein de la cellule endothéliale (Fleming *et al.*, 2001b). Il semble cependant que l'inhibition du cytochrome P₄₅₀ n'affecte pas les relaxations médiées par l'EDHF dans l'artère mésentérique et l'artère hépatique de rat (Zygmunt *et al.*, 1995). Ceci conforte l'idée que la nature de l'EDHF est variable d'une espèce à l'autre et d'un lit vasculaire à l'autre (figure 11).

- **Les jonctions gap myo-endothéliales**: L'hyperpolarisation membranaire peut être transmise aux cellules musculaires lisses par l'intermédiaire des jonctions gap myoendothéliales. Les cellules endothéliales, ainsi que les cellules musculaires lisses sont couplées entre elles par des jonctions gap impliquant diverses connexines, Cx37, Cx40 et Cx43 (Beny, 1999 ; Hill *et al.*, 2002). Il existe aussi des jonctions hétérocellulaires myoendothéliales, couplant les cellules endothéliales et musculaires. Le nombre de ces jonctions gap myo-endothéliales est inversement proportionnel au calibre des vaisseaux, ce qui contribue en partie à expliquer l'importance de ce type d'EDHF dans les vaisseaux de faible calibre (Sandow et Hill, 2000). De plus, dans les vaisseaux dont les relaxations dépendantes de l'endothélium ne comportent pas de composante EDHF, comme dans l'artère fémorale de rat, les jonctions gap myoendothéliales sont absentes (Sandow et Hill, 2002). Ces jonctions permettent vraiment la communication des cellules entre elles, le calcium par exemple peut ainsi diffuser d'une cellule à l'autre (Dora *et al.*, 1997). Dans certaines artères, comme l'artère carotide de cobaye ou l'artère mésentérique de rat, des

inhibiteurs de jonctions gap inhibent les réponses attribuées à EDHF (Taylor *et al.*, 1998 ; Yamamoto *et al.*, 1998 ; Edwards *et al.*, 1999) (figure 11).

- **Les ions potassium** : Une troisième hypothèse est l'assimilation d'EDHF à des ions potassium. En effet, à faible concentration dans l'espace intercellulaire, les ions potassium provenant des courants K^+ par les canaux potassiques calcium-dépendants endothéliaux vont activer à la fois la Na^+/K^+ ATPase et les canaux potassiques rectifiant dans le sens entrant (K_{IR}) des cellules musculaires lisses (Nelson et Quayle, 1995 ; Prior *et al.*, 1998), entraînant ainsi une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses (Edwards *et al.*, 1998). Ce concept a été établi et sa pertinence vérifiée en mesurant le potentiel de membrane des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses d'artères hépatiques et mésentériques de rat (Edwards *et al.*, 1998). La contribution du potassium dans la relaxation médiée par EDHF a été démontrée dans de nombreux vaisseaux, incluant ceux de chez l'Homme (Edwards et Weston, 2004) (figure 11 a, c).

- **Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)**: Une quatrième hypothèse quant à la nature d'EDHF est le peroxyde d'hydrogène comme cela a notamment été décrit dans les artères mésentériques de souris, mais également humaines (Matoba *et al.*, 2002). Cette hypothèse est née de l'observation que dans certains vaisseaux sanguins, les relaxations non-NO non-PGI₂ induites par des agonistes ou par le flux, étaient partiellement inhibées par la catalase et que ces relaxations induisaient une production de H_2O_2 (Shimokawa et Matoba, 2004). La SOD jouerait un rôle majeur dans la production de H_2O_2 au niveau de l'endothélium pour induire l'hyperpolarisation endothélium-dépendante (Morikawa *et al.*, 2003). En revanche, les types de canaux potassiques impliqués au niveau endothélial ou musculaire n'ont pu être déterminés. De plus, la catalase n'inhibe pas dans toutes les artères les relaxations non-NO non-PGI₂ dépendantes (Beny *et al.*, 1991 ; Ellis *et al.*, 2003 ; Chaytor *et al.*, 2003 ; Gluais *et al.*, 2005), et H_2O_2 n'induit pas la relaxation ou l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses dans toutes les artères (Chaytor *et al.*, 2003 ; Gluais *et al.*, 2005), ainsi la nature d'EDHF varie bien en fonction des lits vasculaires et des espèces étudiées (figure 11).

- **Le nitroxyl (HNO)**: a été identifié comme un EDHF très récemment par Andrews *et al.* (2009), responsable des relaxations et des hyperpolarisations endothélium-dépendantes dans l'artère mésentérique de souris et de rats. Celles-ci sont inhibées en présence de L-cystéine, un scavenger de HNO (Pino et Feelisch, 1994 ; Irvine *et al.*, 2007). HNO peut avoir plusieurs

origines : formé par la eNOS (Hobbs et al., 1994 ; Schmidt et al. 1996 ; Rusche et al., 1998) notamment dans le cas d'une diminution de son co-facteur le BH4 (Fukuto *et al.*, 1992b ; Pufahl *et al.*, 1995), par la réduction du NO par le cytochrome c mitochondrial (Sharpe et Cooper, 1998), par la xanthine oxydase (Saleem et Ohshima, 2004). En revanche, son rôle dans les artères de résistances n'est pas encore connu. Son action peut être dépendante ou non de l'activation de la guanylyl cyclase soluble (Irvine *et al.*, 2003 ; Paolucci *et al.*, 2007) et peut activer les canaux potassiques dépendants du voltage (K_V) et induire une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses (Irvine *et al.*, 2003 ; Favalaro et Kemp-Harper, 2007) (figure 11b).

Dans tous les cas, l'hyperpolarisation résultante des cellules musculaires lisses s'oppose à l'activation des canaux calciques dépendants du potentiel ce qui va diminuer voir bloquer l'entrée de calcium dans ces cellules et donc entraîner leur relâchement (Cohen et Vanhoutte, 1995 ; Garland *et al.*, 1995). Les divers mécanismes ne sont pas nécessairement exclusifs, ils peuvent se produire simultanément, être additifs, voire synergiques.

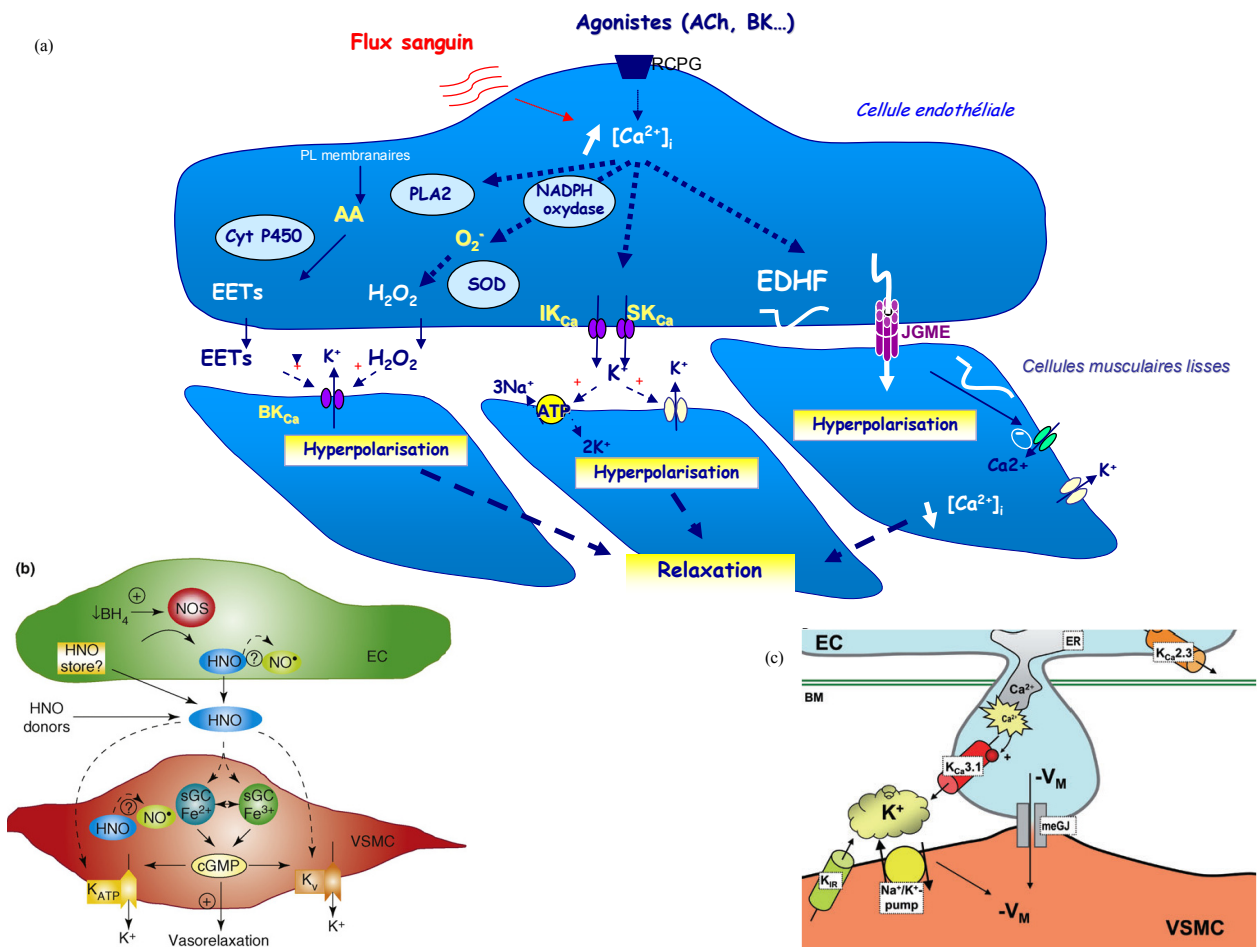


Figure 11 : Hypothèses quant à la nature d'EDHF.

AA : acide arachidonique, ACh : acétylcholine, BK : bradykinine, BK_{Ca} , IK_{Ca} et SK_{Ca} : canaux potassiques dépendants du calcium de haute, d'intermédiaire et de faible conductance, $[Ca^{2+}]_i$: concentration en calcium intracellulaire, Cyt P450 : cytochrome P450, EETs : acides epoxyeicosatriénoïques, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, JGME : jonction gap myoendothéliales, O_2^- : anions superoxydes, PLA₂ : phospholipase A₂, RCPG : récepteur couplé aux protéines G, SOD : superoxyde dismutase, EC : cellules endothéliales, VSMC : cellules musculaires lisses vasculaires (modifiée d'après Shimokawa et Matoba, 2004).

b) HNO module la fonction vasculaire en induisant une relaxation des cellules musculaires lisses (VSMC) en stimulant la guanylyl cyclase soluble (sGC), soit par réduction (Fe^{2+}) soit par oxydation (Fe^{3+}) du fer, augmentant le GMP cyclique (cGMP). HNO peut aussi activer les canaux potassiques dépendants de l'ATP (K_{ATP}) ou voltage dépendants (K_v). BH_4 : tétrahydrobiopterine, HNO store : stocks de thiol-nytrosylés, ? : mécanismes inconnus (d'après Irvine *et al.*, 2008)

c) $KCa_{2.3}$ = SK_{Ca} , $KCa_{3.1}$ = IK_{Ca} , K_{IR} : canaux potassiques rectifiants entrants meGJ = jonctions gap myoendothéliales (d'après Grgic *et al.*, 2009).

1.5.2. Importance d'EDHF :

La voie de signalisation EDHF joue donc un rôle physiologique crucial en promouvant la vasodilatation des artères et artérioles (Félétou et Vanhoutte, 1985, 1988 ; Garland *et al.*, 1995 ; Shimokawa *et al.*, 1996 ; Köhler *et al.*, 2001). Certes sa nature reste controversée mais il apparaît comme étant un vasodilatateur majoritaire dans les artères coronaires et les artères de résistance (Suzuki et Chen, 1990 ; Busse *et al.*, 2002 ; Weston *et al.* 2002), alors que sa participation est faible dans les vaisseaux de conductance. Les mécanismes vasodilatateurs varient en fonction du lit vasculaire, et en fonction du degré d'implication des différents facteurs endothéliaux dans un même lit vasculaire. Dans l'artère mésentérique de rat, par exemple, Shimokawa *et al.* (1996) ont mis en évidence l'augmentation de l'importance du facteur EDHF (par rapport au NO) dans les relaxations endothélium-dépendantes lorsque la taille du vaisseau sanguin est diminuée (proximale/distale). Sandow et Hill (2000) ont montré par microscopie électronique, un nombre plus important de jonctions gap myo-endothéliales par cellules musculaires lisses dans l'artère mésentérique distale (3^{ème} ordre) de rat que dans la proximale (1^{er} ordre). La corrélation entre l'incidence des jonctions gap myoendothéliales et l'importance d'EDHF au lieu de NO pour les réponses vasodilatatrices suggère que les jonctions gap myoendothéliales permettent le couplage avec l'activité d'EDHF, couplage électrique ou le transfert de petites molécules (Sandow et Hill, 2002). Ces deux études montrent une réponse graduelle de la contribution d'EDHF par rapport au NO qui serait en partie due à l'augmentation des jonctions gap myoendothéliales.

1.6 Les facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium (EDCFs) :

Il existe une grande hétérogénéité dans la formation d'EDCFs (*endothelium-derived contracting factors*) dépendant des stimuli, des lits vasculaires, de l'âge et des modèles animaux expérimentaux utilisés. Parmi les facteurs contracturants produits par la cellule endothéliale, nous citerons en particulier les dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique : les endoperoxydes, le thromboxane A₂ (TXA₂), la prostaglandine H₂ (PGH₂), et la prostacycline (PGI₂), mais aussi les anions superoxydes (O₂⁻), l'endothéline 1 (ET1), l'angiotensine II et l'UTP dans l'artère cérébrale (Zhao *et al.*, 2008).

1.6.1. Les dérivés de l'acide arachidonique vasoconstricteurs :

- **Endoperoxydes et prostaglandines** : L'acide arachidonique est transformé par la COX-1 en PGG_2 , un endoperoxyde cyclique instable et est alors convertie en PGH_2 par une réaction peroxydase (Hecker et Ullrich, 1989), le précurseur des prostanoides tel que le thromboxane A_2 (Moncada *et al.*, 1979). Les endoperoxydes eux-mêmes ont la capacité d'induire des contractions endothélium-dépendantes (Auch-Schwelk *et al.*, 1990 ; Ito *et al.*, 1991 ; Ge *et al.*, 1995). En 1985, l'équipe de Paul Vanhoutte avait déjà montré que l'acide arachidonique était capable d'induire une contraction dépendante de l'endothélium sur la veine fémorale de chien et que cette réponse était bloquée par des inhibiteurs de COXs (Miller et Vanhoutte, 1985). La PGH_2 et le TXA_2 libérés par les cellules endothéliales peuvent se lier aux récepteurs endoperoxyde / thromboxane (TP) des cellules musculaires lisses (Shirahase *et al.*, 1988 ; Halushka *et al.*, 1989 ; Coleman *et al.*, 1994 ; Yang *et al.*, 2004a ; Gluais *et al.*, 2006, 2007). Le récepteur TP est couplé à une protéine G hétérotrimérique. Au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires, l'activation de ce récepteur conduit à la production d'inositol tri-phosphates (IP_3) et de diacylglycérol (DAG) via la phospholypase c (PLC) ou à une inhibition de la production d'AMPc via l'adénylyl cyclase (Narumiya *et al.*, 1999). La contraction induite par la PGH_2/TXA_2 fait donc appel à une augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ (influx de Ca^{2+} extracellulaire et/ou libération à partir des stocks) et une sensibilisation au Ca^{2+} (Ungvari *et al.*, 2000 ; Murtha *et al.*, 1999). Leur formation atténue les relaxations induites par l'acétylcholine dans l'artère rénale isolée humaine (Lüscher *et al.*, 1987a,b). Il faut toutefois noter que le métabolite principal de l'acide arachidonique via les COXs est la PGI_2 (Moncada *et al.*, 1979 ; Mombouli *et al.*, 1999). Dans les conditions physiologiques, l'influence de petites quantités de prostanoides vasoconstricteurs libérés par les cellules endothéliales est masquée par la production de PGI_2 , de NO et d'EDHF (Mombouli *et al.*, 1999) (figure 12).

- **La prostacycline** : Levy *et al.* (1980) ont montré que la prostacycline était capable d'induire des contractions des cellules musculaires lisses par son action sur les récepteurs TP, et qui a été confirmé en 1994 par Williams *et al.*. Au cours des contractions induites par l'acétylcholine, il y a une plus forte libération de prostacycline que de prostaglandines (Gluais *et al.*, 2005) qui ne produit pas une vasodilatation mais une vasoconstriction (Rapoport et Williams, 1996). Cette contraction peut être de faible importance et transitoire du fait de la faible affinité de la prostacycline pour les récepteurs TP et par sa rapide dégradation en un métabolite inactif, le 6-kéto- $PGF_{1\alpha}$ (Gluais *et al.*, 2005). De plus, il semblerait que la prostacycline et les endoperoxydes soient les EDCFs impliqués dans les contractions induites par l'acétylcholine, mais

dans le cas d'autres agoniste (ionophore calcique A23187, ADP, endothéline 1, thrombine ou nicotine) se serait plutôt le thromboxane A_2 qui aurait le rôle d'EDCF (Katusic *et al.*, 1988 ; Shirahase *et al.*, 1988 ; Auch-Schwelk et Vanhoutte, 1992 ; Taddei et Vanhoutte, 1993 ; Derkach *et al.*, 2000 ; Gluais *et al.*, 2005, 2006, 2007) (figure 12).

1.6.2. L'endothéline 1 (ET1) :

La stimulation des cellules endothéliales par la thrombine, l'interleukine 1, le facteur de croissance $TGF\beta_1$, l'adrénaline, l'ionophore calcique A23187, la vasopressine ou encore les catécholamines (Yanagisawa *et al.*, 1989 ; Schini et Vanhoutte, 1991 ; Lüscher *et al.*, 1996) peut conduire à la synthèse de l'ET1 à partir de la prohormone big-endothéline, grâce à l'enzyme de conversion de l'endothéline (Yanagisawa *et al.*, 1988 ; Masaki *et al.*, 1995). L'endothéline est un puissant peptide vasoconstricteur qui permet le maintien du tonus vasculaire basal mais ses effets sont modulés en fonction des localisations anatomiques et des conditions physiopathologiques. Il s'agit d'une famille de peptides de trois structures différentes [ET1, ET2 et ET3, (Kedzierski *et al.*, 2001)]. La contraction fait suite à la liaison de l'ET1 à ses récepteurs ET_A et ET_B présents sur les cellules musculaires lisses. Ces récepteurs sont couplés à la protéine G hétérotrimériques et leur activation conduit à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ par la libération des stocks intracellulaires et l'influx de Ca^{2+} extracellulaire mais également à l'augmentation de la sensibilité de l'appareil contractile au Ca^{2+} (Sakurai *et al.*, 1992 ; Ungvari *et al.*, 2000 ; Goto *et al.*, 1996 ; Miwa *et al.*, 1999). Une fois libérée par l'endothélium, l'ET1 peut également agir sur ses récepteurs ET_B endothéliaux (Sakurai *et al.*, 1992 ; Masaki, 1995 ; Schiffring et Touyz, 1998) et conduire ainsi à une vasodilatation artérielle via la production de NO, PGI_2 et EDHF. Enfin, l'ET1 peut conduire à la libération de TXA_2 par les cellules endothéliales (Oriji *et al.*, 1999 ; Hollenberg *et al.*, 1994).

1.6.3. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) :

Les cellules endothéliales peuvent produire différents types d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*), H_2O_2 et O_2^- en réponse aux forces de cisaillement, à des agonistes endothéliaux telle que la bradykinine (Shimizu *et al.*, 1994) ou bien lors de l'activation des COXs (Katusic *et al.*, 1988). Les O_2^- peuvent être produits par différentes enzymes endothéliales telles que la eNOS, la xanthine oxydase, la NADPH oxydase, les COXs (Zalba *et al.*, 2000 ; Vanhoutte, 2001). L'interaction des O_2^- avec le NO conduit à une diminution des effets vasodilatateurs du NO via la formation de peroxy-nitrites (Rubanyi et Vanhoutte, 1986 ;

Gryglewski *et al.*, 1986 ; Auch-Schwelk *et al.*, 1992 ; Cosentino *et al.*, 1994 ; Tschudi *et al.*, 1996 ; De Lano *et al.*, 2006 ; Kagota *et al.*, 2007 ; Miyagawa *et al.*, 2007 ; Macarthur *et al.*, 2008) et à une perte de sa biodisponibilité (Kojda et Harrison, 1999). Les O_2^- peuvent aussi induire une contraction comme par exemple dans l'artère cérébrale de chien (Katusic *et al.*, 1988 ; Katusic et Vanhoutte, 1989). Ils peuvent également faciliter la mobilisation du Ca^{2+} cytosolique dans la cellule musculaire lisse vasculaire en inhibant la dégradation de l' IP_3 ou en inhibant les SERCAs (Suzuki et Ford, 1992 ; Elmoselhi *et al.*, 1996) ou encore promouvoir la sensibilisation des éléments contractiles au Ca^{2+} via la PKC (Jin *et al.*, 1991). L'augmentation du stress oxydant est aussi associée à une diminution des relaxations endothélium-dépendantes et les antioxydants sont capables d'améliorer ces réponses *in vitro* et *in vivo* chez l'animal (Aubin *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2007) mais aussi chez l'homme (Kanani *et al.*, 1999 ; Taddei *et al.*, 2001b ; Holowatz et Kenney, 2007) (figure 12). [Le chapitre 3 est consacré au lien stress oxydant et dysfonction endothéliale].

1.6.4. L'angiotensine II :

La cellule endothéliale présente à sa surface l'enzyme de conversion qui permet la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II. La plupart des effets pharmacologiques observés avec l'angiotensine II est médiée par les récepteurs AT1 [Voir paragraphe 2.1.4].

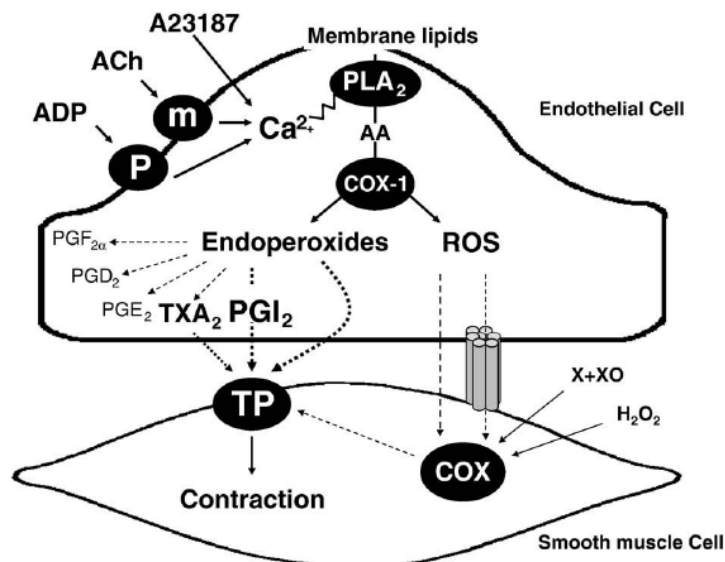


Figure 12 : Les facteurs vasoconstricteurs endothéliaux.

AA : acide arachidonique ; ACh : acétylcholine ; ADP : adénosine diphosphate ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; m : récepteur muscarinique ; P : récepteur purinergique ; PGD_2 : prostaglandine D_2 ; PGE_2 : prostaglandine E_2 ; $PGF_{2\alpha}$: prostaglandine $F_{2\alpha}$; PGI_2 : prostacycline ; PLA_2 : phospholipase A_2 ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; TXA_2 : thromboxane A_2 ; X+XO = xanthine plus xanthine oxydase (d'après Tang et Vanhoutte, 2009).

CHAPITRE 2 :

LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE AU CŒUR DES PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES

CHAPITRE 2 : LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE AU CŒUR DES PATHOLOGIES VASCULAIRES

Si la France bénéficie d'une position relativement avantageuse en matière de mortalité cardiovasculaire, caractérisée par une baisse des taux de décès d'environ 25% entre 1981 et 1991 pour la tranche d'âge de 35 à 64 ans, les maladies cardiovasculaires demeurent un problème important de santé publique (*source : Programme national de réduction des risques Cardiovasculaires, 2002-2005, Ministère délégué à la Santé*). Elles sont de loin la 1^{ère} cause de décès chez les femmes (93 571, soit 36%) et la 2nde, derrière les cancers chez les hommes (29% contre 32%). Chez les plus de 65 ans, elles représentent la 3^{ème} cause de mortalité prématurée derrière les cancers et les morts accidentelles et violentes (16 et 12% chez les hommes et les femmes respectivement)(*source : La recherche cardio-vasculaire en France, GRRC*).

Au niveau international, les maladies cardiovasculaires constituent, là encore, la 1^{ère} cause de mortalité. Elles sont responsables chaque année du décès de plus de 17 millions de personnes, soit 30% de la mortalité dans le Monde (*source : Sanofi-Aventis*). L'étude MONICA, placée sous l'égide de l'OMS, a permis de confirmer la baisse de mortalité coronaire dans le Monde au cours des années 80, mais si la mortalité diminue, le nombre de types de pathologies continue de progresser. Aujourd'hui le vieillissement est devenu un sujet de préoccupation, plus d'une personne sur 10 est âgée de 65 ans et plus, chez qui, environ 70% des décès proviennent de maladies cardiaques et d'accidents vasculaires cérébraux puis de cancers.

Nous avons vu jusqu'à présent que l'endothélium joue un rôle tout à fait primordial dans le maintien du tonus et de l'intégrité vasculaire et notamment par la sécrétion de médiateurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs. Dans la plupart des pathologies vasculaires, cet équilibre va être rompu par atténuation de la fonction vasodilatatrice de l'endothélium (Vanhoutte, 1989 ; Vanhoutte, 1991 ; Vanhoutte *et al.*, 1995). On parle alors de dysfonction endothéliale. Elle peut se manifester suite à une diminution de sécrétion des facteurs vasodilatateurs et/ou par l'augmentation des facteurs vasoconstricteurs au sein de l'endothélium (Figure 13). Elle peut aussi être la conséquence d'une diminution de la sensibilité des cellules musculaires pour les facteurs vasodilatateurs comme le NO, la prostacycline ou l'EDHF. L'augmentation des espèces

réactives de l'oxygène au niveau des cellules endothéliales et musculaires lisses est très certainement une cause majeure de dysfonction endothéliale mais ne saurait expliquer à elle seule la dysfonction endothéliale.

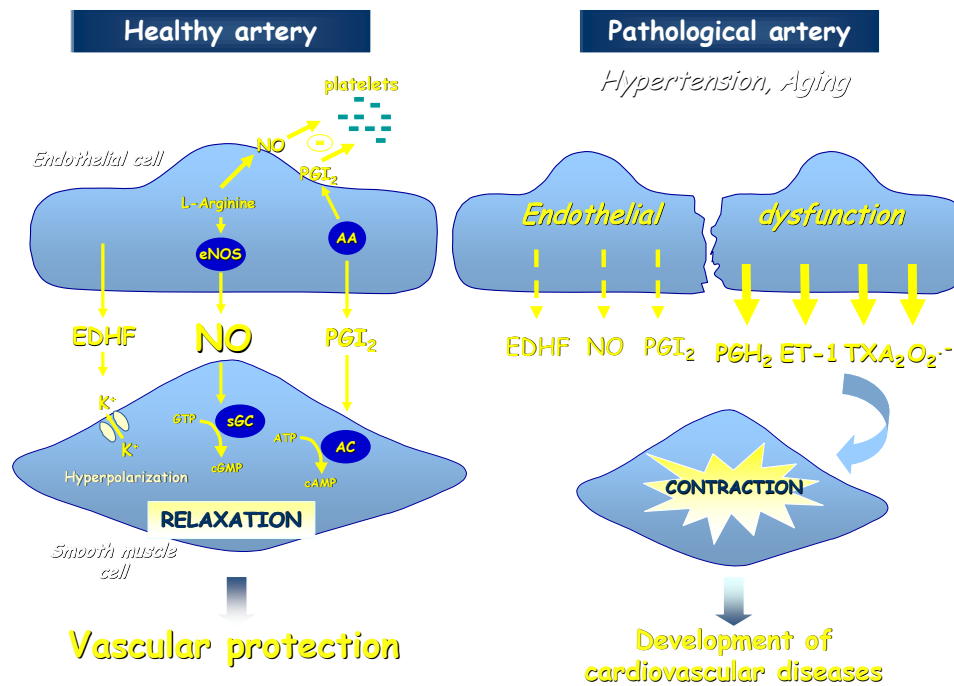


Figure 13 : La dysfonction endothéliale. AA : acide arachidonique, AC : adénylyl cyclase, EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, eNOS : NO synthase endothéliale, ET1 : endothéline 1, GCs : guanylyl cyclase soluble, K⁺ : potassium, NO : monoxyde d'azote, O₂⁻ : anions superoxyde, PGH₂ : prostaglandine H₂, PGI₂ : prostacycline, TXA₂ : thromboxane A₂.

2.1 Hypertension artérielle (HTA) systémique

L'hypertension artérielle se définit lorsque les mesures effectuées en consultation sont supérieures ou égales à 140 mmHg pour la systolique et 90 mmHg pour la diastolique. Cette évolution des chiffres tensionnels peut être d'origine essentielle, c'est-à-dire sans cause spécifique reconnue, ou secondaire à une pathologie rénale, endocrinienne. L'hypertension artérielle est à la fois une pathologie cardiovasculaire en elle-même et est un facteur de risque de maladies cardiovasculaires. Jusqu'en 1950, il n'existait pas de traitement efficace de l'hypertension artérielle et l'utilisation des médicaments anti-hypertenseurs a considérablement augmentée l'espérance de vie des patients hypertendus.

2.1.1. Pathophysiologie (d'après l'ouvrage de Silbernagl et Despopoulos).

L'HTA peut avoir pour causes : a) une augmentation du volume du compartiment extracellulaire, accompagnée d'un retour veineux plus important, d'où une élévation consécutive du débit cardiaque (hypertension de volume) ou, b) une augmentation des résistances périphériques (hypertension de résistance). Comme les différents types d'hypertension provoquent des lésions des parois artérielles dont les résistances augmentent, l'hypertension de volume se transforme dans le temps en hypertension de résistance ; il s'établit donc, quelque soit l'origine de l'hypertension, d'un cercle vicieux. Le volume du compartiment extracellulaire devient plus important si l'entrée de NaCl (et d'eau) est supérieure à la sortie. Une des causes de la forme la plus connue d'hypertension appelée essentielle ou primaire pourrait être l'apport alimentaire généralement trop riche en NaCl surtout chez les patients dits sensibles au sel. Une hypertension de volume se produit également si, consécutivement à une insuffisance rénale par exemple, un apport relativement faible en NaCl ne peut plus être équilibré, ou si une tumeur surrénale produit de manière incontrôlée une trop grande quantité d'aldostérone, amenant ainsi une rétention de Na⁺. D'autres causes importantes de l'hypertension artérielle sont le phéochromocytome, tumeur produisant des catécholamines qui induisent à la fois une augmentation du débit cardiaque et de la résistance périphérique totale, ainsi que l'hypertension rénale (suite à une sténose rénale par exemple). Dans ce dernier cas, la libération de rénine est accrue ce qui augmente la pression sanguine par le système rénine-angiotensine.

La Figure 14 résume les principaux mécanismes physiologiques impliqués dans la régulation de la pression artérielle : le système nerveux autonome sympathique, le système rénine-angiotensine, les dérivés vasoactifs de l'endothélium (NO, endothéline). De plus le remodelage, vasculaire et cardiaque, associé à l'hypertension, participe à l'aggravation de la pathologie. Le rôle des facteurs de croissance (angiotensine II) et des inhibiteurs de cette croissance (NO) impliqués dans ce phénomène de remodelage sont aussi des cibles pharmacologiques. L'HTA retentit principalement sur quatre organes cibles : le cœur, le rein, le cerveau et la rétine. Au niveau cardiaque, la majoration des résistances artérielles entraîne une augmentation chronique du travail du cœur, en particulier du ventricule gauche qui s'hypertrophie, évoluant vers l'insuffisance cardiaque. Au niveau rénal, les petites artères ont tendance à se scléroser, le débit de filtration diminue et l'insuffisance rénale apparaît progressivement. L'athérosclérose au niveau des artères irrigant le cerveau augmente le risque d'accidents vasculaires cérébraux ischémiques et hémorragiques. Au niveau rétinien, l'HTA favorise la rétinopathie hypertensive. Actuellement, on tente de traiter l'hypertension avant qu'elle ne devienne symptomatique. La

prise en charge de l'HTA fait appel à des mesures hygiéno-diététiques et à des traitements médicamenteux. L'objectif est de normaliser les chiffres tensionnels de façon à réduire le risque cardio-vasculaire et à prévenir la survenue ou l'aggravation des complications au niveau des organes cibles.

La première mesure est hygiéno-diététique :

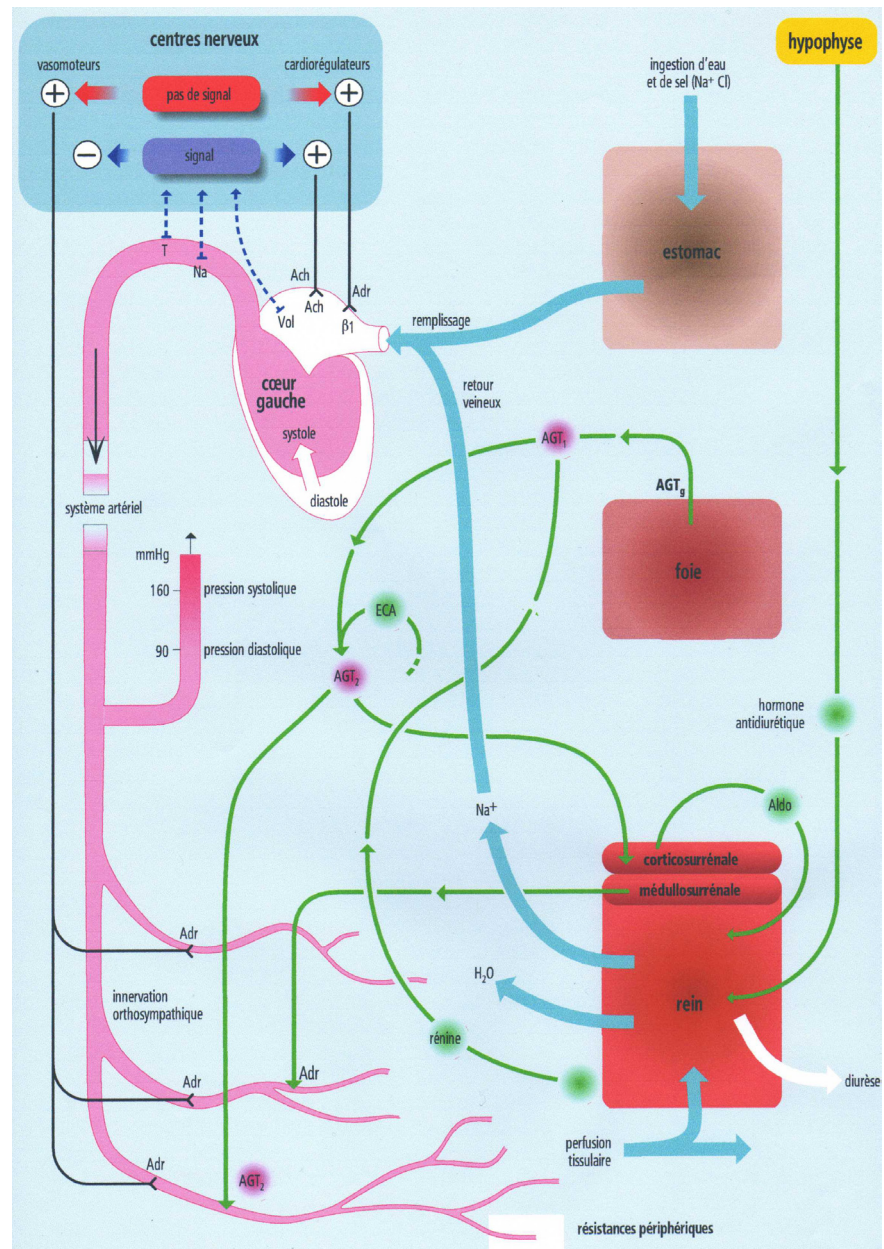
- éviter de fumer (génère l'athérosclérose),
- ne pas consommer trop d'alcool (selon le *Programme National Nutrition et Santé*: 3 verres de vin par jour pour un homme de poids moyen et 2 pour une femme),
- en cas d'hypercholestérolémie diminuer le taux de cholestérol (alimentation ou médicaments) car c'est un facteur de risque de maladies cardiovasculaires,
- maigrir si nécessaire, car la surcharge pondérale est un facteur de risque accru elle provoque la dyslipidémie, l'hypercholestérolémie donc l'athérosclérose, ainsi que le diabète ; l'obésité abdominale constitue un risque encore plus grand,
- avoir une alimentation équilibrée (fruits, légumes et moins de matières grasses)
- limiter la consommation de sel
- avoir une activité physique régulière

Si ces mesures sont suivies et ne suffisent pas pour que la tension baisse, il faut envisager un traitement médicamenteux à choisir en fonction du profil du patient, de la sévérité de l'HTA, de son stade d'évolution, des facteurs de risques et des maladies associées :

- les diurétiques, agissant sur le rein en augmentant l'élimination de l'eau et du sel
- les bêta-bloquants, entraînant une diminution du tonus bêta adrénergique et diminuant la sécrétion de rénine
- les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC), diminuant les concentrations de l'angiotensine II et de l'aldostérone
- les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (sartans), diminuant l'action tensile de l'angiotensine II
- les antagonistes du calcium ou inhibiteurs calciques, diminuant le tonus vasoconstricteur des vaisseaux sanguins
- les alpha-bloquants périphériques, entraînant un risque d'hypotension au début du traitement
- les antihypertenseurs centraux, agissant directement sur les centres nerveux au niveau du cerveau, diminuant le tonus sympathique

Figure 14 :
Principaux acteurs
dans la régulation
de la pression
artérielle.

ACh : acétylcholine
Adr : adrénaline
AGT₂ : angiotensine II
AGT_g : angiotensinogène
Aldo : aldostérone
ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine II
T : tension pariétale
Vol : volume sanguin
β₁ : récepteur adrénergique
lignes discontinues :
afférences sensibles
(d'après l'encyclopédie
Universalis)



2.1.2. Hypertension artérielle et fonction endothéliale :

Les maladies cardiovasculaires telles que l'hypercholestérolémie, le diabète, l'angine de poitrine ou l'hypertension sont caractérisées par une dysfonction endothéliale et une réduction de la vasodilatation médiée par l'endothélium (Vanhoutte, 1989, 1991 ; Vanhoutte et Boulanger, 1995 ; Mollnau *et al.*, 2002) notamment dans le modèle animal d'hypertension et chez le patient hypertendu (Linder *et al.*, 1990 ; Panza *et al.*, 1990 ; Taddei *et al.*, 1993, 1995, 1997b, 2000 ; Vanhoutte, 1996).

De nombreuses études chez l'homme et l'animal ont montré qu'une dysfonction endothéliale, caractérisée par une diminution significative des relaxations endothélium-dépendantes due notamment à la réduction de la biodisponibilité du NO, apparaît très

précocement dans le développement de la plupart des pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle (Mombouli et Vanhoutte, 1999) De plus, il a été montré que dans les artères mésentériques d'une souche de rats spontanément hypertendus, les SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*), l'hyperpolarisation et la relaxation médiées par EDHF sont inhibées (Fujii *et al.*, 1992 ; Goto *et al.*, 2000) ; des traitements à visée anti-hypertensive utilisant les inhibiteurs du système rénine-angiotensine (inhibiteur de l'enzyme de conversion, l'Enalapril et antagonistes des récepteurs AT1 de l'angiotensine II, le Candesartan) restaurent les réponses médiées par EDHF (Fujii *et al.*, 1992 ; Goto *et al.*, 2000). Ces traitements antihypertenseurs permettent aussi une restauration du niveau d'expression des connexines Cx37, Cx40 et Cx43 dans les artères mésentériques de rats SHR similaire à celui des rats contrôles (Kansui *et al.*, 2004). Ces travaux suggèrent que la dysfonction endothéliale affectant la composante EDHF chez ces animaux pourrait s'expliquer par une altération de l'expression des connexines Cx37, Cx40 et Cx43 en réponse à l'angiotensine II.

2.1.3. Lien étroit entre stress oxydant, angiotensine II et hypertension artérielle :

Les ROS jouent un rôle important dans la physiopathologie de l'hypertension. Il y a de nombreuses études qui ont montré la présence de ROS dans différents modèles d'hypertension artérielle. C'est le cas dans les modèles expérimentaux d'hypertension artérielle : induite par l'administration chronique d'angiotensine II (Laurson *et al.*, 1997 , Viridis *et al.*, 2004), induite par le sel chez les rats Dahl (Tojo *et al.*, 2002), associée à l'obésité (Dobrian *et al.*, 2001), induite par les minéralo-corticoïdes (Wu *et al.*, 2001 ; Viridis *et al.*, 2002), dans le modèle 2 reins/1 clip (Welch *et al.*, 2003). Il en est de même dans les modèles d'hypertensions génétiques, tels que les SHR (Zalba *et al.*, 2000) et les SHRSP (*stroke-prone SHR*) (Chen *et al.*, 2001). Il a été décrit une augmentation de l'activation de la NADPH oxydase (Rajagopalan *et al.*, 1996 ; Griendeling *et al.*, 2000 ; Zalba *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2001 ; Lassegue et Clempus, 2003) et de la xanthine oxydase (Fortepiani *et al.*, 2003), un découplage de la eNOS [voir paragraphe 3.3] (Milstien et Katusik, 1999 ; Cosentino *et al.*, 2001 ; Vasquez-vivar *et al.*, 2002) impliqués dans la formation des ROS dans ces modèles. L'inhibition de l'apparition du stress oxydant par l'apocynine ou l'allopurinol, deux antioxydants inhibant respectivement la NADPH oxydase et la xanthine oxydase, par la capture des ROS avec des antioxydants (vitamine E) ou l'utilisation d'analogues de la superoxyde dismutase permettent de diminuer la pression artérielle et de prévenir le développement de l'hypertension artérielle dans les modèles d'hypertension expérimentaux

(Sharma *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 2001 ; Frenoux *et al.*, 2002 ; Park *et al.*, 2002 ; Tanito *et al.*, 2004). Ces effets bénéfiques ont été attribués à l'amélioration de la fonction endothéliale et la diminution de l'état inflammatoire des vaisseaux (Touyz *et al.*, 2000 ; Wilcox, 2002). Des données similaires ont été démontré en clinique chez des patients atteints d'hypertension artérielle essentielle (Prabha *et al.*, 1990 ; Sagar *et al.*, 1992 ; Lacy *et al.*, 2000 ; Minuz *et al.*, 2002 ; Stojiljkovic *et al.*, 2002), mettant en avant la perte des moyens endogènes de défenses antioxydantes (Russo *et al.*, 1998), l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase contribuant à l'apparition de stress oxydant (Berry *et al.*, 2000 ; Bengtsson *et al.*, 2003). Touyz et ses collaborateurs ont d'ailleurs suggéré que l'activation du SRA serait l'activateur majeur de la NADPH oxydase et de la formation des ROS dans l'hypertension humaine (Touyz *et al.*, 2003a).

L'élévation du taux d'angiotensine II constitue aussi l'un des facteurs majeurs d'aggravation de la dysfonction endothéliale (Rajagopalan *et al.*, 1996) observée dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires, comme l'angine de poitrine, le diabète, l'hypercholestérolémie ou encore l'hypertension artérielle (Vanhoutte, 1997). L'angiotensine II est un peptide multifonctionnel jouant un rôle dans le maintien de la pression artérielle, ayant des effets prolifératifs au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires et des cardiomyocytes et qui a également été identifié comme un médiateur pro-inflammatoire [voir paragraphe 2.1.4, ci-après] (Touyz *et al.*, 2005). L'angiotensine II diminue aussi la biodisponibilité du NO, un phénomène qui pourrait être principalement la conséquence d'une formation accrue de ROS et en particulier d'anions superoxydes qui sont capables d'interagir et de dégrader le NO par formation de peroxynitrites (Mugge *et al.*, 1991). En effet, l'angiotensine II active la NADPH oxydase, source majeure d'espèces réactives de l'oxygène produite au niveau des cellules endothéliales (Landmesser *et al.*, 1997). Il a été montré par Landmesser *et al.* (2002) que des souris knock-out pour la sous-unité p47^{phox} de la NADPH oxydase ne développent pas d'hypertension artérielle ni de production de ROS suite à l'infusion chronique d'angiotensine II. De plus Sarr *et al.* (2006) ont montré que l'administration chronique d'angiotensine II chez le rat induit une hypertension artérielle qui est associée à une diminution des relaxations endothélium-dépendantes de l'aorte. La dysfonction endothéliale observée est caractérisée par une augmentation de l'expression de la NADPH oxydase associé à un fort stress oxydant au niveau de l'aorte, diminuant la biodisponibilité du NO.

Type of hypertension	ROS bioavailability
<i>Human hypertension</i>	
Mild essential hypertension	0
Severe hypertension	+
Salt-sensitive hypertension	+
Malignant hypertension	+
Renovascular hypertension	+
Pre-eclampsia	+
<i>Genetic forms of hypertension</i>	
SHR and SHRSP	+
<i>Experimentally induced hypertension</i>	
Angiotensin II-infused	+
Norepinephrine-infused	0
Salt-sensitive (Dahl SS, salt-loaded SHRSP)	+
Lead-induced	+
Obesity-associated	+
2-kidney 1-clip	+
Postmenopausal	+
Mineralocorticoid	+

Figure 15 : Formes d'hypertension cliniques et expérimentales impliquant un stress oxydant. + : augmentation du statut oxydant, 0 : pas de changement, SHR *spontaneously hypertensive rats*, SHRSP *stroke-prone SHR* (d'après Touyz et Schifflin, 2004).

2.1.4. Importance du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) dans les pathologies vasculaires :

Le SRAA joue un rôle important dans la régulation de la pression artérielle et des fonctions cardiovasculaires. Ce système affecte le cerveau, l'hypophyse, le cœur, les vaisseaux, le foie, les reins, les glandes cortico-surrénales (Figure 16). L'angiotensine II est le principal effecteur de ce SRAA, jouant un rôle important dans la régulation de la pression artérielle, l'homéostasie hydrosodée et la régulation de la soif, la sécrétion d'aldostérone, le tonus des cellules musculaires lisses vasculaires. L'activation chronique du SRAA est impliquée dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle, les maladies chroniques rénales, l'athérosclérose, le diabète, l'insuffisance cardiaque et l'infarctus du myocarde (Figure 16). Des essais cliniques pertinents ont démontré que le blocage du SRAA diminue la morbidité et la mortalité de l'hypertension artérielle, de l'infarctus du myocarde, de l'insuffisance cardiaque, des complications de l'athérosclérose (coronaropathies, néphropathies) ainsi que celles du diabète, pathologies souvent intriquées, il a ainsi été admis que la meilleure stratégie pour la prévention des maladies cardiovasculaires était l'inhibition du SRAA (Zaman *et al.*, 2002). L'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) ou

d'antagonistes des récepteurs AT_1 de l'angiotensine II semble appropriée pour traiter les pathologies cardiovasculaires impliquant le SRAA et prévenir les complications attendues.

En plus du SRAA circulant, il existe des évidences aujourd'hui pour la présence de ce système au sein même des tissus d'organes spécifiques tels que le rein (Mezzano *et al.*, 2003a, b ; Hollenberg *et al.*, 2003), le cœur (Danser *et al.*, 1997 ; Arakawa *et al.*, 2000 ; Frustaci *et al.*, 2000), les yeux (Strain *et al.*, 2002), le cerveau (Sakai et Sigmund, 2005 ; Lavoie *et al.*, 2003), l'endothélium vasculaire (Dzau, 2001), le pancréas (Leung *et al.*, 2003 ; Hanes *et al.*, 2004) et les tissus adipocytaires (Faloia *et al.*, 2002 ; Engeli *et al.*, 2000). Le SRAA local joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du tissu. Par exemple, le SRAA rénal exerce de multiples effets directs sur la vasoconstriction rénale, la réabsorption et l'excrétion sodée (Mezzano *et al.*, 2003 a, b ; Hollenberg *et al.*, 2003) (figure 16). Ce système intervient aussi sur des fonctions cérébrales comme la mémoire ou l'apprentissage, ce qui permet d'envisager de nouveaux traitements pour prévenir les méfaits dus à l'âge comme les troubles cognitifs.

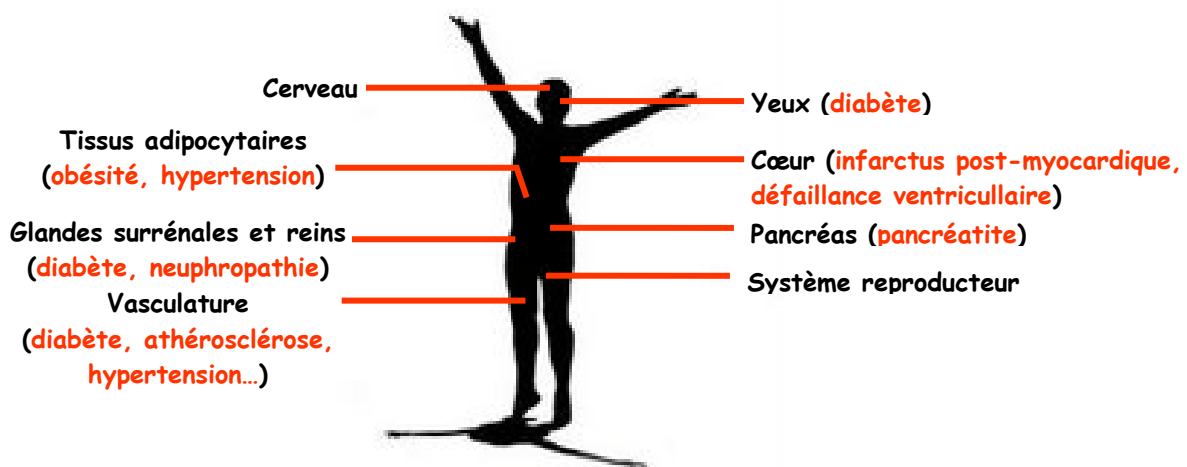


Figure 16 : Activation du système rénine-angiotensine tissulaire et local dans de nombreuses pathologies

2.1.4.1. Acteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone :

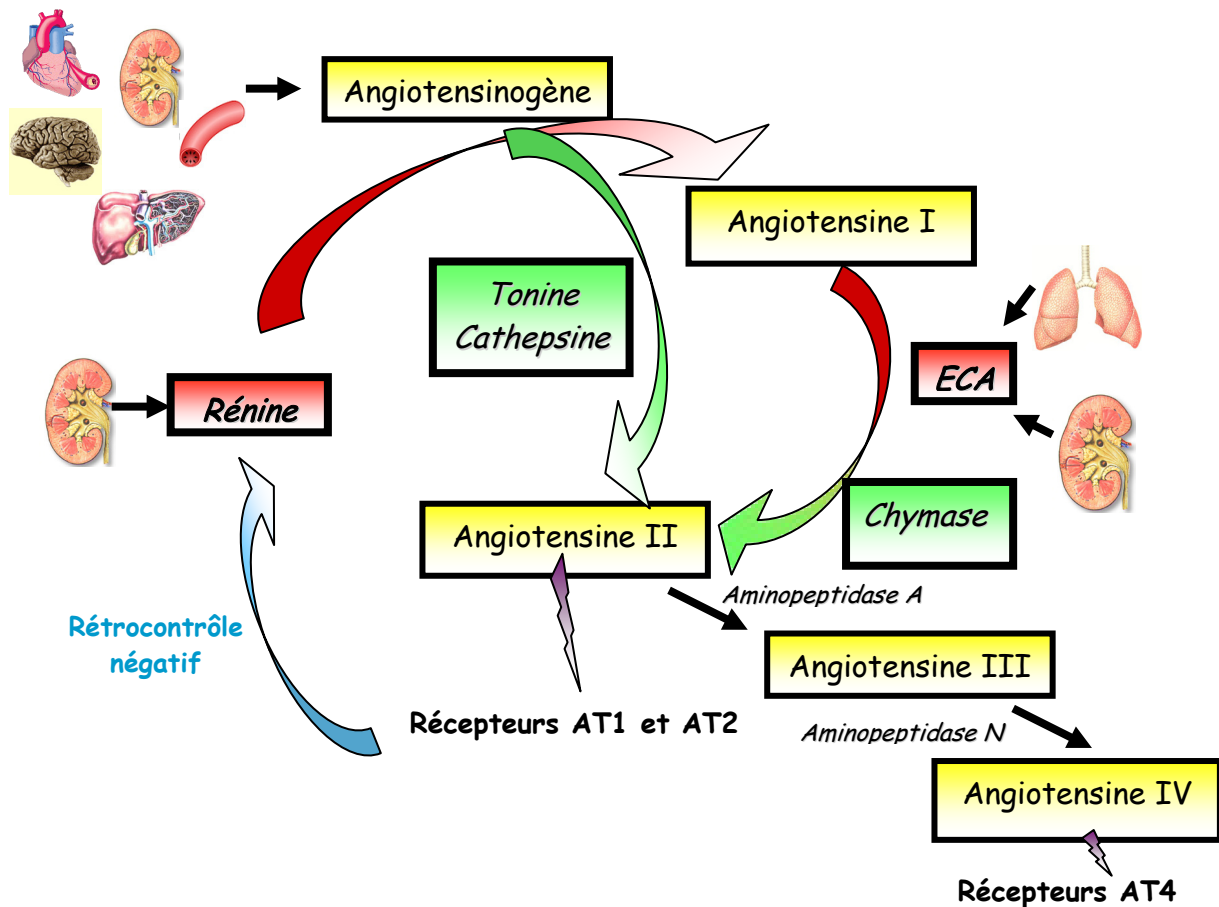


Figure 17 : Le système rénine-angiotensine.

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine, AT1, AT2 et AT4: récepteurs de type 1, 2 et 4 à l'angiotensine II. Voie enzymatique principale en rouge et secondaire en verte

- L'angiotensinogène : est une glycoprotéine, est le seul précurseur protéique de la famille de ces peptides : angiotensines I, II, III, IV et angiotensine-(1-7). L'angiotensinogène circulant provient essentiellement des hépatocytes, mais cette prohormone est aussi synthétisée dans le cerveau, le cœur, les vaisseaux, les reins et les adipocytes. Dans la circulation, la voie enzymatique principale utilise la rénine qui le transforme en un décapeptide, l'angiotensine I. La sécrétion de rénine qui est la première étape de régulation du SRAA est un processus endocrine (Ardailou et Michel, 1999). D'autres enzymes comme la cathepsine produites dans certains organes (foie, cœur), constituent des voies parallèles de synthèse directe d'angiotensine II (Figure 17).

- **La rénine** : elle a été découverte par Tigerstedt et Bergman en 1898 comme une substance pressive dans le cortex rénal. En 1934, Goldblatt *et al.* ont montré que la diminution du flux sanguin dans les artères rénales provoque une augmentation prolongée de la pression artérielle. Il est maintenant bien admis que cette hypertension ischémie-dépendante est due à la synthèse d'un agent presseur, l'angiotensine II, à partir d'une chaîne de réactions enzymatiques complexes impliquant la rénine (Fasciolo, 1990). La rénine est une enzyme protéolytique présente dans la circulation et dans de nombreux tissus mais elle est exclusivement produite au niveau des cellules de l'appareil juxta-glomérulaire rénal (Reudelhuber *et al.*, 1994) (figure 17). La sécrétion peut être induite par une chute de la concentration plasmatique de sodium, par une diminution de la pression de perfusion rénale, par les agonistes β adrénergiques, et l'angiotensine II exerce un rétrocontrôle négatif sur cette sécrétion. Un récepteur spécifique de la rénine et de la prénine a été cloné par Nguyen *et al.* (2002), c'est d'une part un cofacteur de la rénine qui augmente son activité catalytique de clivage de l'angiotensinogène (Methot *et al.*, 1999 ; Prescott *et al.*, 2002), d'autre part il active la phosphorylation de MAP kinases impliquées dans les processus de prolifération et de fibrogenèse. Ils sont localisés sur les cellules mésangiales glomérulaires et les cellules musculaires lisses vasculaires (Nguyen G *et coll.*, 1996). Le récepteur représenterait un moyen de capture de la (pro) rénine permettant de concentrer la (pro) rénine à la surface des cellules musculaires lisses vasculaires, à l'interface avec les cellules endothéliales. Ainsi la génération de l'angiotensine I, puis de l'angiotensine II est beaucoup plus efficace puisque à proximité des récepteurs AT₁ et AT₂.

- **L'angiotensine I et enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)**: l'angiotensine I ne possède pas d'activité par elle-même, mais se trouve rapidement convertie par l'ECA en un octapeptide, l'angiotensine II, un puissant vasoconstricteur. L'ECA est liée à la membrane plasmique des cellules endothéliales, particulièrement abondante dans les vaisseaux pulmonaires, mais aussi exprimée dans les systèmes vasculaires du cœur, du cerveau, du muscle strié et du rein. En conséquence, l'angiotensine II formée *in situ* peut contrôler localement le tonus vasculaire de différents lits vasculaires. De plus l'ECA n'est pas spécifique et dégrade un certain nombre d'autres peptides comme la bradykinine, agent vasodilatateur qu'elle inactive. L'ECA est bloquée par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC)(figure 17).

La chymase, autre enzyme impliquée dans la formation de l'angiotensine I en angiotensine II, est une enzyme présente dans divers tissus dont le cœur. Son action est spécifique à l'opposé de l'ECA, et son activité n'est pas modifiée par les IEC (figure 17).

• L'angiotensine II : la biosynthèse de l'angiotensine II se fait comme nous l'avons vu ci-dessus par deux voies : la classique connue depuis longtemps, mettant en jeu la rénine et l'ECA; et une voie de connaissance plus récente, mettant en jeu une chymase jouant le même rôle que l'ECA et d'autres enzymes permettant la transformation directe de l'angiotensinogène en angiotensine II (Figure 17). La plupart des effets de l'angiotensine II résultent de sa fixation aux récepteurs AT1, mais il existe une part non négligeable d'effets médiés par l'AT2, deux récepteurs couplés aux protéines G [voir paragraphe 2.1.4.2] (figure 18).

	Récepteur AT1	Récepteur AT2
Distributions (pour revue : Chung et Unger, 1996)	Ubiquitaire Tissus adultes: Vaisseaux sanguins (cellules musculaires lisses) Cœur Cerveau Reins	Tissus fœtaux majoritairement Tissus adultes: Vaisseaux sanguin (endothélium) Myocarde Cerveau Glandes surrénales Ovaires et utérus
Rôles physiologiques principaux	Vasoconstriction : → effet hypertensif Prolifération cellulaire : → hyperplasie vasculaire Synthèse de MEC : → hypertrophie Inotrope/chronotrope positif : → contractilité myocardique et hypertrophie Synthèse d'aldostérone : → rétention sodée, → élimination potassium RC négatif sur appareil juxtaglomérulaire : → inhibe synthèse rénine RC positif sur le foie : → active synthèse angiotensinogène Au niveau central: → active système sympathique → synthèse noradrénaline: → dipsogène	Vasodilatation par synthèse de NO : → effet anti-hypertensif (Ichiki <i>et al.</i> , 1995 ; Barber <i>et al.</i> , 1995 ; Gigante <i>et al.</i> , 1998) Autres effets : → Anti-mitogène → Anti-prolifératif → Anti-différenciation cellulaire → Apoptose (Li <i>et al.</i> , 1998)

Figure 18 : Caractéristiques des récepteurs AT1 et AT2 à l'angiotensine II.
MEC : matrice extracellulaire, RC : rétrocontrôle

• L'angiotensine III et IV : L'aminopeptidase de type A produit l'angiotensine III à partir de l'angiotensine II en détachant l'acide aspartique et l'aminopeptidase de type N clive l'angiotensine III en angiotensine IV (Zini *et al.*, 1996) (Figure 17). L'angiotensine III se fixe

aux récepteurs de l'angiotensine II avec la même affinité que cette dernière et donne les mêmes effets. L'angiotensine IV ou angiotensine-(3-8), est un fragment de la protéolyse de l'angiotensine II, qui a longtemps été considéré comme un produit de dégradation inactif des angiotensines II et III. La découverte d'un site spécifique, le récepteur AT₄ (de Gasparo *et al.*, 2000), exprimé dans de nombreux tissus tels que le cerveau, les reins, le cœur et les vaisseaux, ainsi que la preuve d'effets physiologiques *in vivo*, ont amené à considérer actuellement l'angiotensine IV comme un effecteur du SRAA mais ayant des effets complexes. En effet, L'angiotensine IV augmente le flux sanguin dans le cortex rénal, la cochlée et le cerveau, par le biais d'un effet vasodilatateur (Thomas et Mendelsohn, 2003). En revanche, dans certains lits vasculaires, l'angiotensine IV montre un effet vasoconstricteur par son action sur les récepteurs AT1. Ces effets opposés vasodilatation / vasoconstriction seraient mis en évidence dans le cas d'un blocage du récepteur AT1 ou AT2 (Loufrani *et al.*, 1999).

- L'angiotensine-(1-7) : L'angiotensine I peut aussi être transformée en angiotensine-(1-7) par des endopeptidases neutres. Selon le tissu ou l'organe, la synthèse de l'angiotensine-(1-7) est contrôlée par d'autres enzymes telles que la néprilysine (l'endopeptidase neutre 24-11) ainsi qu'un homologue de l'ECA découvert récemment, l'ECA2 (Donoghue *et al.*, 2000). C'est une métalloprotéase zinc-dépendante, qui régule négativement le SRAA. L'ECA2 est exprimée dans l'endothélium vasculaire au niveau rénal et cardiaque. L'ECA2 dégrade l'angiotensine I en angiotensine-(1-9) le précurseur inactif de l'angiotensine-(1-7), mais aussi l'angiotensine II directement en angiotensine-(1-7) (Santos *et al.*, 2000). Enfin, l'angiotensine-(1-7) est, comme l'angiotensine I et la bradykinine, un substrat endogène de l'ECA qui la dégrade par clivage en angiotensine-(1-5), un pentapeptide inactif (Chappell *et al.*, 1998). La mise en évidence du récepteur de l'angiotensine-(1-7) (AT₁₋₇) et d'un site spécifique de fixation de l'angiotensine-(1-7) remonte à plus d'une dizaine d'années (Santos *et al.*, 1994 ; Ferrario et Iyer, 1998). L'angiotensine-(1-7) n'a pas d'effet vasoconstricteur, n'entraîne pas d'augmentation d'origine centrale de la pression artérielle, ne déclenche pas le mécanisme dypsiq. Ferrario a montré un effet dépresseur, vasodilatateur et une action antihypertensive de ce peptide (Ferrario *et al.*, 1997). Elle augmente la synthèse et la sécrétion de prostaglandines relaxantes, potentialise l'action de la bradykinine et stimule la sécrétion de monoxyde d'azote, comme l'indique un certain nombre de travaux expérimentaux (Brosnihan *et al.*, 1996 ; Iyer *et al.*, 2000). Enfin de nombreux travaux ont montré qu'elle s'oppose à l'action proliférative et au remodelage vasculaire dus à l'angiotensine II (Freeman *et al.*, 1996 ; Strawn *et al.*, 1999) (figure 17).

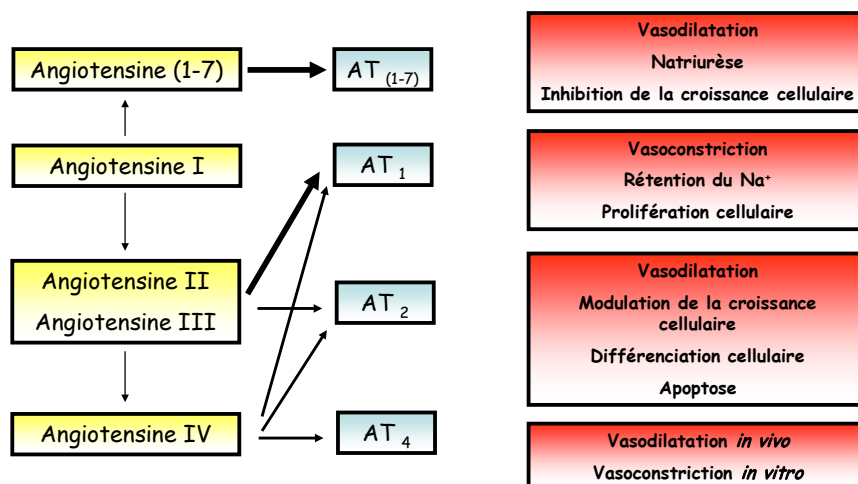
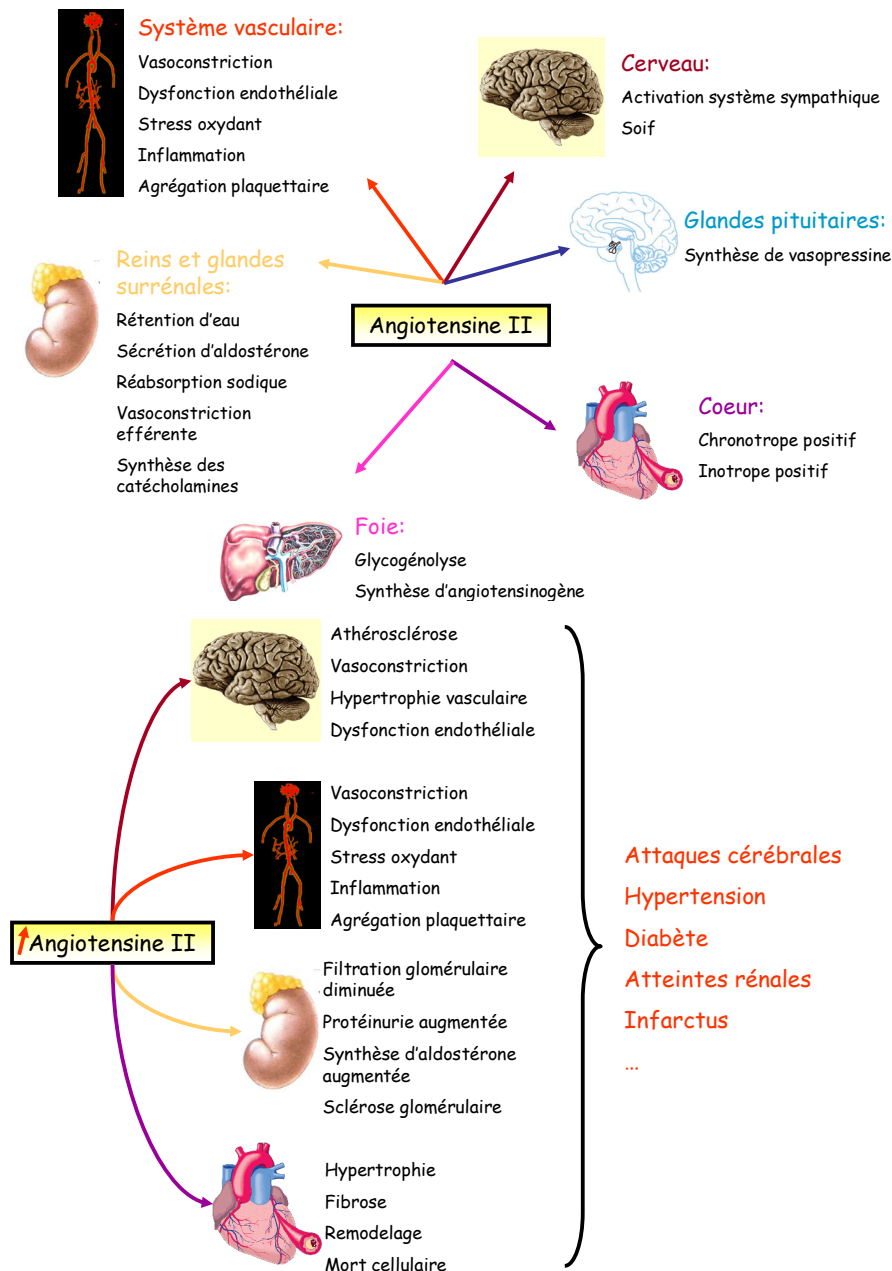


Figure 19 : Récapitulatif des effets des couplages Angiotensine et récepteurs.
AT : récepteur à l'angiotensine.

2.1.4.2. Récapitulatifs des effets de l'angiotensine II :

Il a été montré que l'angiotensine II, en plus de réguler la pression artérielle, a des fonctions autocrine et paracrine dans de nombreux organes et tissus où elle est localement synthétisée (cœur, rein, cerveau) (Dzau, 1984). L'angiotensine II stimule l'expression de molécules d'adhésion des leucocytes, des cytokines inflammatoires et augmente le stress oxydant, lui-même responsable du déséquilibre de la balance endothéliale entre le monoxyde d'azote (NO) et les radicaux libres. Inversement, les cellules inflammatoires génèrent des enzymes telles que l'ECA, favorisant une augmentation de la production locale d'angiotensine II dans la paroi vasculaire, instaurant un véritable cercle vicieux. L'angiotensine II agit aussi comme un facteur de croissance pour les cellules musculaires lisses vasculaires et elle induit la néoangiogenèse. La perfusion d'angiotensine II à des souris ApoE^{-/-} entraîne une augmentation de l'athérosclérose (Babamusta *et al.*, 2005 ; Iwai *et al.*, 2005). Chez ces mêmes souris, l'induction d'une HTA rénovasculaire (2reins-1clip) entraîne une hyperréactivité à la noradrénaline et diminue la relaxation endothélium dépendante (Arruda *et al.*, 2005). L'ensemble de ces propriétés va finalement contribuer à la formation, au développement et à la rupture des plaques d'athérome. L'angiotensine II est donc un médiateur essentiel dans les mécanismes physiopathologiques qui débutent avec un dysfonctionnement endothélial et peuvent éventuellement aller jusqu'à la rupture d'une plaque et la thrombose (Dzau, 2001 ; Dzau *et al.*,

2002). Il apparaît donc que la thérapeutique idéale revient à réduire la synthèse de l'angiotensine II ou à bloquer les voies de signalisation mises en jeu par la stimulation des récepteurs AT_1 . Ainsi il est possible de s'opposer aux mécanismes inflammatoires des complications de l'athérosclérose ainsi qu'au remodelage vasculaire permettant d'obtenir un effet protecteur supplémentaire au delà de la baisse de la pression artérielle.



Figures 20 et 21 : Effets de l'angiotensine II sur les organes cibles : l'activation chronique du système rénine-angiotensine contribue à l'apparition des pathologies vasculaires.

2.2 Syndrome hépatopulmonaire (SHP)

Le syndrome hépatopulmonaire est défini comme la coexistence d'une maladie hépatique et d'une hypoxémie induite par des dilatations vasculaires pulmonaires (Krowka, 2000). Les dilatations vasculaires pulmonaires sont à l'origine d'un shunt intrapulmonaire et donc de l'hypoxémie. Le premier témoin des anomalies dans les échanges gazeux survenant chez les patients atteints d'un SHP est l'augmentation du gradient de pressions alvéolo-artérielles en oxygène (PaO_2). Une PaO_2 pour un sujet respirant à l'air ambiant au niveau de la mer supérieure ou égale à 15 mmHg (ou ≥ 20 mmHg chez des patients âgés de 64 ans et plus) est considérée comme anormale (Schenk *et al.*, 2002).

La prévalence du SHP dépend donc des critères et des méthodes diagnostiques utilisés et se situerait aux environs de 15-30 % chez les patients cirrhotiques candidats à une greffe (Arguedas *et al.*, 2003). La plus grande partie des cas rapportés dans la littérature est représentée par des patients atteints de **cirrhose** d'étiologie variée (et de façon intéressante sans corrélation évidente retrouvée entre la sévérité du SHP et le degré d'insuffisance hépatocellulaire). Cependant, le SHP peut également survenir plus rarement dans le cadre d'une **hypertension portale** non cirrhotique et même au cours d'hépatite aiguë ou chronique sans cirrhose (Rodriguez-Roisin *et al.*, 2004).

2.2.1. Aspects cliniques

L'apparition d'une dyspnée d'effort d'aggravation progressive est le symptôme le plus commun retrouvé et est liée au développement progressif d'une hypoxémie. Il peut exister un symptôme plus spécifique : la platypnée, caractérisée par une aggravation de la dyspnée en position debout. Ceci résulte de l'augmentation du flux sanguin dans les vaisseaux pulmonaires dilatés des bases pulmonaires qui accentue ainsi le shunt. Le corollaire gazométrique de la platypnée est l'orthodéoxie définie par une chute de la $PaO_2 \geq 4$ mmHg ou de la SaO_2 (saturation artérielle en oxygène) ≥ 5 % lors du passage de la position couchée à debout (Rodriguez-Roisin *et al.*, 2004). Cyanose, hippocratisme digital et angiomes stellaires sont fréquents (Palma et Fallon, 2006).

2.2.2. Physiopathologie

Les anomalies du rapport ventilation/perfusion constituent le principal mécanisme pouvant rendre compte de l'hypoxémie : il existe ainsi un déséquilibre entre des territoires alvéolaires normalement ventilés mais dont la perfusion est anormalement augmentée (effet shunt). Ce sont

les dilatations des vaisseaux pré-capillaires et capillaires pulmonaires, reflète de la diminution du tonus vasculaire pulmonaire qui sont pour une grande partie responsables du shunt. Bien que de grosses fistules artério-veineuses ne soient pas retrouvées, il peut se développer de petites fistules semblables à des étoiles comme les angiomes stellaires cutanés qui se comportent comme de petits shunts artério-veineux.

Pour rendre compte de l'amélioration parfois spectaculaire de l'oxygénation observée chez des patients pourtant porteurs de shunts anatomiques vrais lorsqu'on leur administre de l'oxygène à haute concentration, un autre concept (figure 22) a vu le jour appelé altération de la diffusion-perfusion. En fait, l'importance de la dilatation vasculaire pulmonaire empêcherait les molécules d'oxygène d'atteindre le centre du flux sanguin veineux. Ce phénomène est exacerbé par l'augmentation du débit cardiaque retrouvé chez le cirrhotique qui réduit la durée de diffusion de l'oxygène et le temps de transit et donc de contact des globules rouges à travers le lit vasculaire pulmonaire. L'administration d'oxygène permettrait ainsi d'élever suffisamment la pression partielle pour compenser ce défaut relatif de diffusion.

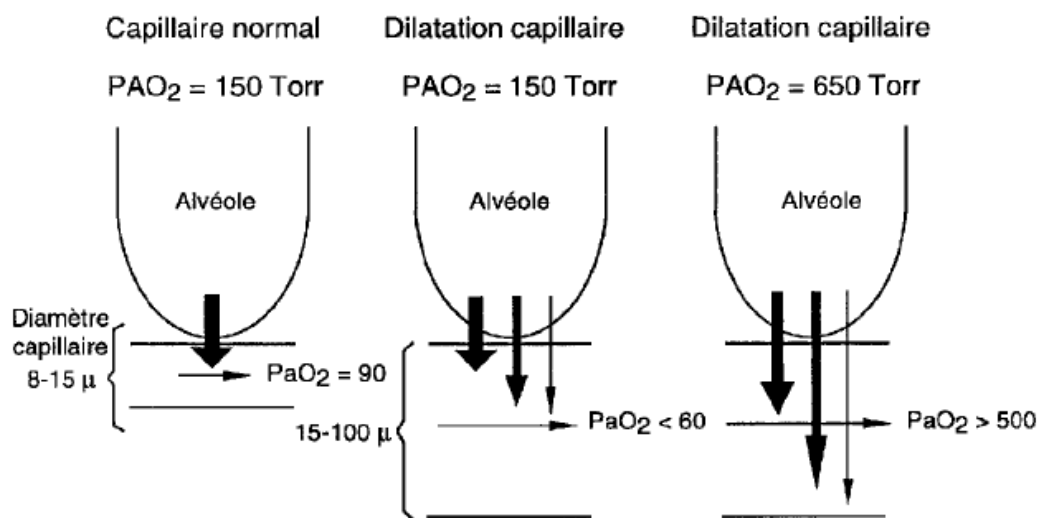


Figure 22 : Concept de « diffusion-perfusion ». Ce diagramme schématise les anomalies vasculaires pulmonaires observées au cours du SHP. Les dilatations vasculaires intrapulmonaires associées à une augmentation du débit sanguin créent un trouble de diffusion-perfusion qui mène à l'hypoxémie. En air ambiant, la pression alvéolaire en oxygène est estimée à 150 Torr. Le gradient alvéolo-artériel n'est pas suffisant pour permettre une diffusion de l'oxygène jusqu'au centre du capillaire dilaté et oxygéner normalement le sang veineux. Sous oxygène pur, la PaO_2 , supérieure à 600 Torr, permet de corriger au moins en partie cette altération des échanges gazeux et améliore ainsi l'oxygénation. PaO_2 : pression alvéolaire en oxygène, est représenté par les flèches. (Adapté de Krowka *et al.*, 1985).

Par ailleurs un trouble vrai de la diffusion (avec atteinte de la membrane alvéolo-capillaire) est également possible. Ces trois mécanismes (déséquilibre du rapport ventilation-perfusion, shunts intrapulmonaires et défaut de diffusion-perfusion) concourent à des degrés divers selon la sévérité du SHP dans la genèse de l'hypoxémie : alors que ce sont les inégalités du rapport ventilation-perfusion et l'apparition de shunts modérés (< 10 % du débit cardiaque) qui sont au premier plan chez les patients avec une hypoxémie modérée ($PaO_2 > 60$ mmHg), les trois mécanismes coexistent dans les cas plus sévères ($PaO_2 < 60$ mmHg) (Rodriguez-Roisin *et al.*, 2004).

2.2.3. Pathogenèse et fonction endothéliale

La pathogenèse et la nature précise des anomalies vasculaires impliquées dans le SHP représentent un domaine de recherche très actif. C'est en effet par une meilleure compréhension des mécanismes complexes impliqués dans les anomalies de tonus et de l'architecture de la microvascularisation pulmonaire des patients atteints de SHP que pourront se développer des traitements médicaux efficaces.

Les modèles expérimentaux de SHP, réalisés chez des rongeurs traités par ligature du canal hépatique commun (voir Protocoles expérimentaux, paragraphe 1.2.2), ont fait apparaître le rôle central joué par le NO dans la pathogenèse du SHP (figure 23) (Lange *et al.*, 1995 ; Hervé *et al.*, 1998). Ces études ont mis en évidence une corrélation étroite entre les anomalies de l'oxygénation et l'augmentation de l'expression et de l'activité pulmonaire à la fois de la eNOS et de la iNOS provenant de l'accumulation intravasculaire de cellules macrophagiques (Nunes *et al.*, 2001). Un deuxième médiateur vasoactif, l'endothéline-1, serait également impliqué dans le développement du SHP. Cette protéine connue classiquement pour son action vasoconstrictrice peut en fait interagir avec deux types de récepteurs : ET_A et ET_B . Les récepteurs ET_A se trouvent principalement au niveau des cellules musculaires lisses des vaisseaux et sont responsables de leur contraction. Les récepteurs ET_B quant à eux sont présents également au niveau de ces cellules musculaires lisses (avec une action comparable aux récepteurs ET_A) mais aussi au niveau des cellules endothéliales provoquant une élévation de la production de NO via l'augmentation de l'expression et de l'activité de la eNOS (Luo *et al.*, 1997 ; Fallon et Adams, 2000).

Après ligature biliaire chez le rat, on peut observer dans la première semaine une augmentation plasmatique de l'ET-1 provenant notamment de l'épithélium biliaire et des cellules stellaires du foie. Un SHP se développe vers la deuxième semaine avec une augmentation des taux

de eNOS pulmonaire et du nombre des récepteurs ET_B. (Fallon *et al.*, 1997 ; Ling *et al.*, 2004). L'inhibition sélective des récepteurs ET_B engendre une réduction marquée de la vasodilatation et intrapulmonaire avec diminution des taux d'eNOS et des récepteurs ET_B intrapulmonaires. L'effet vasodilatateur pulmonaire de l'endothéline-1 semble ainsi résulter de l'activation des récepteurs ET_B qui engendre une importante production de NO par la eNOS (Ling *et al.*, 2004). A la troisième semaine, on peut observer une accumulation de macrophages intravasculaires avec production d'iNOS et d'hème oxydase-1 (HO-1) dans les poumons. Fait intéressant, ces événements n'apparaissent qu'après le développement du SHP suggérant que l'initiation de ce syndrome (en tout cas expérimentalement) n'est pas dépendante de la production macrophagique de la iNOS et d'HO-1. L'HO-1 catalyse la formation de monoxyde de carbone (CO), un autre vasodilatateur à forte affinité pour l'hémoglobine circulant sous forme de carboxyhémoglobine (HbCO). La mesure de la HbCO est un reflet dans le sang de la production de CO. Chez le rat atteint de SHP, les taux de HbCO sont significativement augmentés et l'inhibition de l'HO-1 permet de normaliser les concentrations de HbCO avec amélioration de la vasodilatation pulmonaire (Zhang *et al.*, 2003). Durant la progression du SHP, une augmentation de la production du TNF- α associée à la translocation bactérienne contribue à la mobilisation des macrophages et l'expression de l'iNOS (Rabiller *et al.*, 2002). Toujours dans le modèle animal, la pentoxifylline, un inhibiteur du TNF- α , a pu prévenir le développement du SHP suggérant ainsi son rôle pathogénique dans la genèse du SHP (Sztrymf *et al.*, 2004) (figure 23).

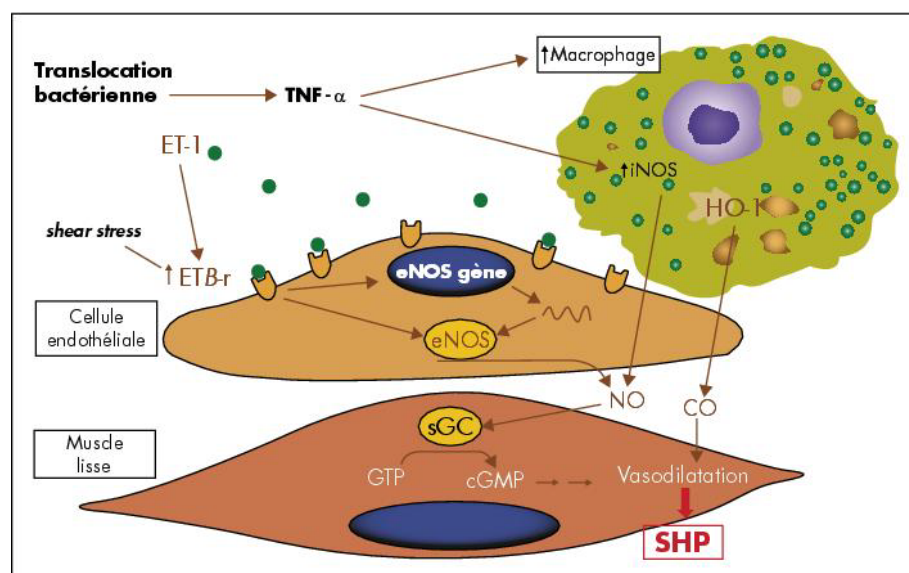


Figure 23 : Mécanismes impliqués dans la pathogenèse du SHP. ET-1 : endothéline 1 ; TNF- α : *Tumor necrosis factor* ; ETB-r : récepteur B à l'endothéline ; eNOS : NO synthase endothéliale ; iNOS : NO synthase inducible ; HO-1 : hème oxydase-1 ; sGC : soluble guanylyl cyclase ; GTP : guanosine triphosphate ; cGMP : guanosine monophosphate cyclique (d'après Palma et Fallon, 2006).

Chez les patients cirrhotiques atteints de SHP, il a été également démontré une production pulmonaire augmentée de NO (Rolla *et al.*, 1998). Une administration aiguë d'inhibiteurs de la NOS ou de la guanylyl cyclase (L-NAME ou le bleu de méthylène) a montré une amélioration à court terme de l'oxygénation chez les patients cirrhotiques (Brussino *et al.*, 2003 ; Schenk *et al.*, 2000). Ces données doivent être pondérées par deux publications récentes qui n'ont pas retrouvé d'amélioration des échanges gazeux après inhibition de la formation de NO bien qu'une action sur le tonus vasculaire ait été observée (avec notamment une réduction significative de l'hyperkinésie circulatoire) (Gomez *et al.*, 2006 ; Almeida *et al.*, 2007). En fait, on ignore l'effet d'une administration chronique de ces inhibiteurs. De plus, le rôle joué par des altérations de l'architecture microvasculaire pulmonaire survenant durant la progression du SHP (angiogenèse, vasculogenèse, remodelage) a été peu étudié, celles-ci peuvent prendre beaucoup de temps à disparaître comme en témoigne la normalisation de l'oxygénation survenant parfois des mois après la transplantation hépatique.

En résumé, il existe, dans le SHP, une surproduction pulmonaire chronique d'un certain nombre de médiateurs vasoactifs, stimulée par l'inflammation systémique (endotoxémie) et peut-être favorisée par une susceptibilité génétique, qui résulterait de combinaisons variables d'altérations du tonus et de l'architecture microvasculaire pulmonaire aboutissant aux anomalies des échanges gazeux.

2.2.4. Un syndrome circulatoire hyperdynamique

L'augmentation du flux sanguin est une conséquence de la diminution de la résistance artérielle splanchnique (splénique et mésentérique) (Merkel *et al.*, 1985 ; Gusberg *et al.*, 1994). Cela joue un rôle dans le développement d'un syndrome circulatoire hyperdynamique, défini par une augmentation de l'index cardiaque et la diminution des résistances vasculaires systémiques (Bernardi and Trevisani, 1997 ; Gatta *et al.*, 1999). Au cours de la cirrhose, l'hypertension portale sinusoidale conduit à une vasodilatation splanchnique et systémique responsable d'une diminution du volume sanguin artériel efficace. La compensation de la diminution de la volémie aboutit à une rétention de sodium et d'eau avec une expansion du volume plasmatique, une augmentation du débit cardiaque aboutissant à un syndrome hyperdynamique généralisé à de nombreux organes (Iwakiri et Groszmann, 2006) Cet état hyperdynamique circulatoire est présent chez 50% des patients cirrhotiques et dans les modèles expérimentaux de cirrhose et d'hypertension portale (Herve *et al.*, 1998). Il est directement impliqué dans la pathogénie de nombreuses complications de la cirrhose (SHP, hypoxémie, varices oesophagiennes et digestives)

et responsables de nombreux symptômes de l'hypertension artérielle (tachycardie, hypotension artérielle systémique).

Ainsi, le SHP touche 15 à 30% des malades en pré-transplantation hépatique. L'importance de la morbidité/mortalité, qui lui est attribuable en post-transplantation, nécessite qu'il soit reconnu. Il n'y a actuellement aucun traitement médical ou instrumental qui puisse prétendre guérir un SHP. Néanmoins, de tels traitements pourraient améliorer les malades ne pouvant être transplantés ou en attente de transplantation. Pour le moment, seule la transplantation hépatique est capable de guérir le SHP. Il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes sous jacents à cette pathologie pour pouvoir proposer des traitements médicaux afin de pouvoir en ralentir l'évolution dans l'attente d'une greffe.

2.3 Vieillesse vasculaire

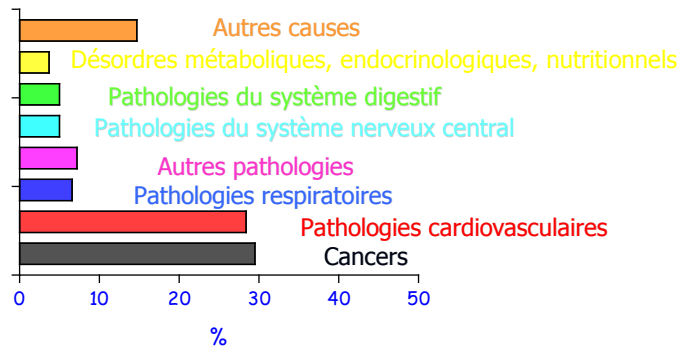
2.3.1. Vieillesse et pathologies :

Le vieillissement est un processus complexe, lent et progressif, qui implique divers facteurs biologiques, psychologiques et sociaux diminuant progressivement l'aptitude d'un objet, d'une information ou d'un organisme à assurer ses fonctions. L'Organisation Mondiale de la Santé retient le critère d'âge de 65 ans et plus. Il est la résultante des effets intriqués de facteurs génétiques (vieillesse intrinsèque) et de facteurs environnementaux auxquels est soumis l'organisme tout au long de sa vie. L'état de santé d'une personne âgée résulte habituellement des effets du vieillissement et des effets additifs de maladies passées (séquelles), actuelles, chroniques ou aiguës.

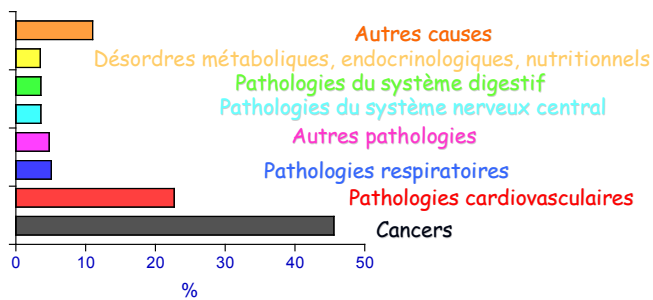
Le vieillissement de la population est l'un des faits marquants du XXe et du début de ce XXIe siècle. L'augmentation du nombre et de la proportion de personnes âgées de 65 ans et plus, observée aussi bien dans les pays développés que dans les pays en développement, représente un des enjeux majeurs de notre société pour les prochaines décennies. Dans les 50 prochaines années, la population mondiale augmentera de plus de 50%, passant de 6 à 9 milliards d'individus ! En France, dès 2010, il y aura plus de personnes de plus de 60 ans que de personnes de moins de 20 ans (*Bilan démographique 2000. INSEE Première, n°757, février 2001 ; Projection de la population à l'horizon 2050. INSEE Première, n°762, mars 2001*). Il devient donc urgent de se préoccuper du vieillissement de l'homme du 3^{ème} millénaire. Un nombre croissant d'hommes atteint et atteindra un âge où la prévalence des maladies chroniques incapacitantes est élevée.

Les études épidémiologiques révèlent que le vieillissement, à lui seul et en absence des autres facteurs de risque (diabète, hypertension, hyperhomocystéinémie, hypercholestérolémie), est capable de modifier progressivement le système cardiovasculaire chez des sujets sains. Les années passants, la morbidité et la mortalité cardiovasculaire augmentent (figure 24) (Lakatta et Levy, 2003). Le risque de mortalité lié aux maladies cardiovasculaires est 80 fois supérieur chez les sujets âgés de 75-84 ans et 270 fois plus élevé chez les sujets âgés de plus de 85 ans par comparaison aux sujets âgés de 35-44 ans (*National Center for Health Statistics, 2006*). Dans les pays développés, on estime que parmi les personnes âgées de 65 ans et plus, 80 % ont au moins une maladie chronique (Furner *et al.*, 1997 ; Kinsella *et al.*, 2000). Les principales maladies chroniques rencontrées au cours du vieillissement dans les pays développés sont les pathologies ostéo-articulaires, les maladies cardiovasculaires (hypertension artérielle notamment), le diabète, les bronchopneumopathies chroniques obstructives, les accidents vasculaires cérébraux, les pathologies néoplasiques, les pathologies mentales (démence et dépression) et la déficience visuelle (Furner *et al.*, 1997 ; Jackson *et al.*, 1998 ; Olshansky *et al.*, 1997). En 2020, les trois quarts des décès dans les pays en développement pourraient être liés aux maladies accompagnant le vieillissement. La plus grande partie sera due à des maladies non transmissibles comme les maladies de l'appareil circulatoire, le cancer et le diabète (Jackson *et al.*, 1998 ; Kalache *et al.*, 2000).

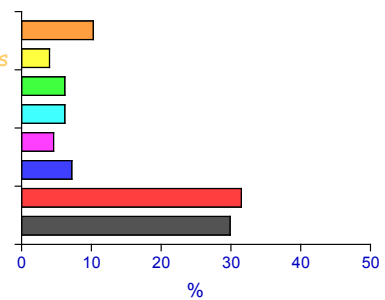
Causes de décès en France (2005)



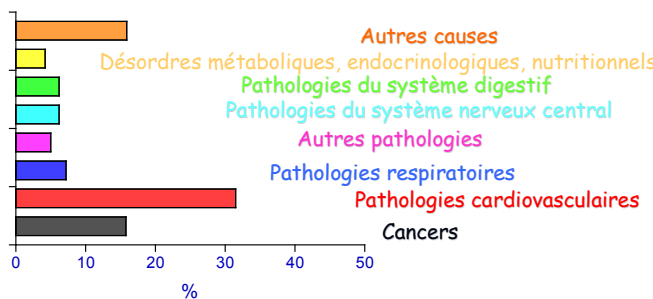
Causes de décès chez les personnes âgées (65 à 74 ans)



Causes de décès chez les personnes âgées (75 à 84ans)



Causes de décès chez les personnes âgées (85 à 94 ans)



Causes de décès chez les personnes âgées (95 ans et plus)

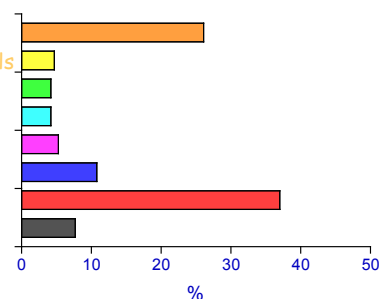


Figure 24 : Causes de décès en France en 2005, dans la population totale et par tranche d'âge chez les personnes âgées. (Sources : Inserm, CépiDc (Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès))

2.3.2. Vieillessement et fonction endothéliale :

Parmi les structures biologiques modifiées durant le vieillissement, l'endothélium vasculaire, de par son rôle dans la régulation des structures et des fonctions vasculaires, revêt une importance majeure. Différentes études ont évalué l'impact du vieillissement sur la fonction endothéliale, dans la circulation périphérique et coronaire tant chez l'Homme et chez l'animal (Labinskyy *et al.*, 2006). Chez des patients âgés, mais ne présentant pas d'athérosclérose au niveau coronarien, une atteinte progressive de la macro et microcirculation coronarienne a été démontrée (Yasue *et al.*, 1990 ; Egashira *et al.*, 1993). En revanche, dans ces études, l'importance d'autres facteurs de risques cardiovasculaires ne peuvent pas être exclus. D'autres preuves de cette atteinte proviennent d'études réalisées au niveau de la circulation périphérique, par mesure de la capacité vasodilatatrice de l'artère branchiale en réponse à l'acétylcholine (Taddei *et al.*, 1995) ou la métacholine (Gerhard *et al.*, 1996). Ainsi, chez des hommes adultes et en bonne santé, il a pu être démontré une corrélation inverse entre la capacité vasodilatatrice et l'âge des patients. En revanche, les relaxations indépendantes de l'endothélium, mesurées en réponse à un donneur exogène de NO le nitroprussiate de sodium, n'en sont que peu affectées (Taddei *et al.*, 1995 ; Zeiher *et al.*, 1993).

2.3.3. Mécanismes de la dysfonction endothéliale liée à l'âge :

Les processus biochimiques et pathophysiologiques de l'atteinte vasculaire par le vieillissement ne sont pas encore bien connus. Cependant, des modifications de la voie de synthèse et de biodisponibilité du NO ont été étudiées par technique de mesure de flux au niveau de l'artère brachiale après administration de L-arginine et de N⁶monométhyl-L-arginine (inhibiteur de la eNOS, L-NMMA). Taddei et ses collaborateurs (2001) ont ainsi pu montrer que la voie du NO déclinait proportionnellement à l'avancement de l'âge des patients (< 30 ans, entre 30 et 60 ans, > 60 ans). Il y a donc des évidences suggérant une atteinte de la formation ou une dégradation accrue des autacoïdes endothéliaux. Ces observations chez l'Homme ont été confirmées par des études réalisées chez l'animal, notamment dans les vaisseaux de conductance (Hongo *et al.*, 1998 ; Kung et Lüscher, 1995 ; Geary *et al.*, 2003) et de résistances (Csiszar *et al.*, 2002 ; Muller-Delp *et al.*, 2002) chez le rat, chez le cochon (Murohana *et al.*, 1991), le lapin (Chinellato *et al.*, 1991) et la souris (Blackwell *et al.*, 2004). Indépendamment des changements structurels des vaisseaux, la vasodilatation dépendante de l'endothélium est diminuée avec l'âge sans modifications de celles indépendantes de l'endothélium. Cette modification peut ou non être associée à une augmentation de la vasoconstriction (Shirasaki *et al.*, 1986 ; Matz *et al.*, 2000 ;

Vanhoutte *et al.*, 2005). L'atténuation progressive de la vasodilatation endothélium-dépendante par le vieillissement concerne les trois facteurs vasodilatateurs endothéliaux, NO, EDHF et prostacycline (Csiszar *et al.*, 2002). Fujii et ses collaborateurs (1993) ont observé une diminution de l'hyperpolarisation induite par l'acétylcholine dans les branches principales de l'artère mésentérique supérieure de rat âgé de souche WKY. Certaines études relatent aussi l'apparition de facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'AA par les COXs (Koga *et al.*, 1988). En effet, une partie du défaut de relaxation observé aux fortes concentrations d'acétylcholine dans l'aorte de rat de souche WKY est améliorée par le pré-traitement des artères par l'indométacine, un inhibiteur des COXs. En revanche, Küng et Lüscher (1995) ont réfuté cette hypothèse, et ont montré que les relaxations à l'acétylcholine n'étaient pas améliorées par la pré-incubation des vaisseaux avec le SQ30741, un antagoniste des récepteurs au TXA₂ et à la PGH₂. Mayhan et ses collaborateurs (1990) ont confirmé ces résultats en montrant que les relaxations à l'acétylcholine, la sérotonine et l'ADP n'étaient pas améliorées avec l'indométacine.

2.3.4. Vieillessement et stress oxydant :

L'hypothèse de l'importance du stress oxydant dans le vieillissement a été proposée pour la première fois par Denham Harman en 1956, partant de la constatation que tous les organismes aérobies utilisent l'oxygène, ceci étant étroitement lié à la genèse potentielle d'espèces réactives de l'oxygène et donc par conséquent induire des modifications moléculaires et cellulaire. Cette théorie domine le domaine de la recherche sur le vieillissement depuis plus de cinquante ans.

Il n'y a plus de doutes que le vieillissement soit associé à une augmentation du stress oxydant et ses conséquences (Harman, 2003 ; Finkel *et al.*, 2000). L'endothélium vasculaire apparaît comme étant une importante source de ROS notamment d'anions superoxydes (Hamilton *et al.*, 2001 ; Brandes *et al.*, 1997 ; Gorbach *et al.*, 2000 ; Jung *et al.*, 2004). Ces effets augmentent avec l'âge provoquant une atténuation des relaxations endothélium-dépendantes dans l'aorte et l'artère mésentérique de rat (Shirasaki *et al.*, 1986). De plus, la suppression de l'endothélium, l'inhibition de la NADPH oxydase et de la eNOS permet de réduire la formation des O₂⁻ dans les artères de rats WKY âgés (Hamilton *et al.*, 2001). Chez l'Homme, l'administration intra-brachiale d'un puissant antioxydant la vitamine C, n'ayant pas d'effet chez l'homme jeune et en bonne santé, va restaurer les relaxations à l'acétylcholine en absence et en présence de L-NMMA chez la personne âgée de plus de 60 ans (Taddei *et al.*, 2001). De plus, les sources enzymatiques à l'origine du stress oxydant ont été identifiées : les COXs (Taddei *et al.*, 1998) et la NADPH oxydase (Donato *et al.*, 2007).

CHAPITRE 3 :

LE STRESS OXYDANT AU COEUR DE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE

CHAPITRE 3 : LE STRESS OXYDANT AU CŒUR DE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE

Nous avons vu dans le premier chapitre que de par sa position anatomique, l'endothélium est en constante interaction avec le sang et soumis aux contraintes mécaniques subies par le vaisseau : pression intraluminale, contraintes liés au flux, notamment de cisaillement. Cette situation stratégique lui permet de remplir un rôle de détecteur vis-à-vis de ces stimuli et d'y répondre par la production de messagers adaptés adressés à des cellules voisines ou plus distantes via le flux sanguin. Ainsi l'endothélium a un rôle primordial dans la régulation de l'homéostasie et le tonus vasculaire par le maintien de la balance entre la synthèse de facteurs vasorelaxants et vasocontracturants. Cependant, l'endothélium est aussi la première cible des facteurs de risques comme l'hypercholestérolémie ou l'hypertension, (John et Schmierer, 2000), le tabagisme (Hutchison, 1998), le diabète (Angulo *et al.*, 2003), ainsi que le vieillissement (Andrawis *et al.*, 2000), où l'équilibre est rompu et aboutit à une atténuation de la fonction vasodilatatrice de l'endothélium alors que la production de médiateurs vasoconstricteurs, pro-agrégants et pro-mitogènes est maintenue ou bien stimulée (Vanhoutte, 1981 ; 1991 ; Vanhoutte et Boulanger, 1995). Cette dysfonction endothéliale est une étape précoce dans les pathologies installées comme l'athérosclérose ou l'insuffisance cardiaque (Badimon *et al.*, 1992 ; Busse et Fleming, 1996 ; Barton, 2000 ; Bousette et Giaid, 2003 ; Davignon et Ganz, 2004). Nous avons vu que les mécanismes de la dysfonction endothéliale sont complexes et que l'étiologie exacte de ce processus est toujours au cœur de la recherche actuelle, mais le stress oxydant en serait le dénominateur commun (Griendling et FitzGerald, 2003a, b).

3.1 Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

3.1.1. Nature et localisation des espèces réactives de l'oxygène

Le stress oxydant est caractérisé par la formation accrue de ROS, principalement des radicaux libres oxygénés. Ces principaux radicaux sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle (OH \cdot). D'autres ROS tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le peroxy-nitrite ($ONOO^{\cdot-}$), le dioxyde d'azote (NO_2) et l'acide hypochloreux (HOCl) ne sont pas considérées *per se* comme des radicaux libres, mais elles ont des pouvoirs oxydants contribuant ainsi au stress oxydatif. Dans une situation physiologique, l'anion superoxyde peut être formé par différentes enzymes telles que la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, les COXs et lipoxygénases, les

NOSs, le cytochrome P₄₅₀ et les enzymes de la chaîne mitochondriale (Cai et Harrison, 2000), à des concentrations qui normalement devraient être réduites par les superoxyde dismutases (SOD) (Ducrocq *et al.*, 2001). Les SOD représentent un mécanisme de défense important vis-à-vis des O₂⁻, elles dismutent les anions superoxydes en H₂O₂, qui lui-même peut être dégradé en eau et oxygène par la catalase ou la glutathion peroxydase (Andreoli *et al.*, 1986 ; Harlan *et al.*, 1984 ; Dickinson et Forman, 2002), ou bien former OH[•] par la réaction de Fenton (Figure 25). Dans les conditions physiologiques normales, il existe une balance en production et dégradation des ROS. En revanche, lorsqu'un dysfonctionnement apparaît entre la formation des ROS et la capacité antioxydante de défense, il en découle une augmentation de la biodisponibilité de ces ROS et le stress oxydant s'installe, à l'origine de nombreuses pathologies cardiovasculaires. (Griendling *et al.*, 2000a ; Landmesser et Harrison, 2001 ; Zalba *et al.*, 2001a)

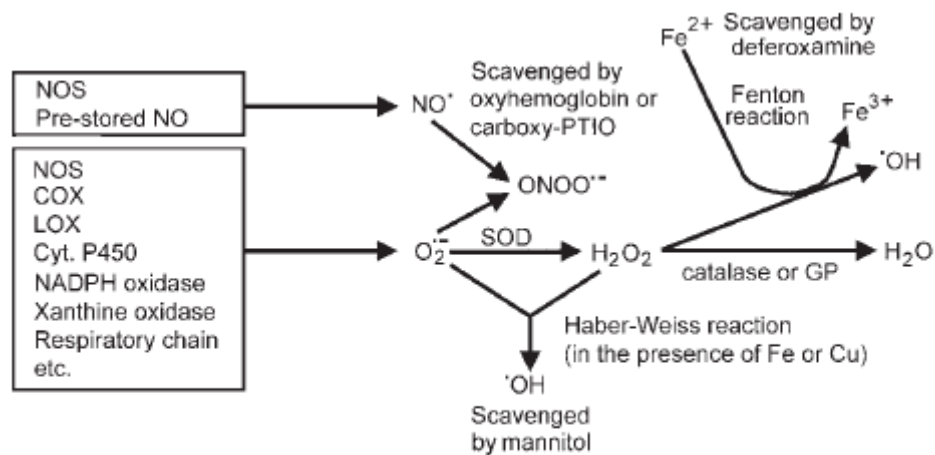


Figure 25 : Les espèces réactives de l'oxygène, synthèse et dégradation.

FAD, flavin adenine dinucleotide; COX, cyclooxygenases; LOX, lipoxygénases; cyt. P450, cytochromeP450 monoxygénases; NOS, NO synthase; NADPH oxydase, nicotinamide adenine dinucleotide oxidase; SOD, superoxyde dismutases; GP, glutathione peroxydase; O₂⁻ anion superoxyde; ONOO⁻, peroxytrite (d'après Féléto et Vanhoutte, 2006).

3.1.2. Les conséquences du stress oxydant

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Les radicaux libres participent au fonctionnement de plusieurs enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certaines structures nerveuses et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la

régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes. Cependant, la production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque.

3.1.2.1. Conséquences biochimiques :

- **Au niveau de l'ADN** : Bien que celui-ci soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Au bas mot, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par $\text{OH}\cdot$ peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (Cadet *et al.*, 2002) (Figure 26). Les bases qui composent l'ADN sont sensibles à l'oxydation. Mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. L'attaque radicalaire des protéines qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), entraîne des pontages des protéines ou des adduits sur des bases. Le rôle des nombreux métaux fixés à l'ADN, qui est un polyanion (Fe, Mg, Zn, Cu, Ni, Cd...), est crucial pour amplifier ou orienter le profil de ces lésions. Il peut y avoir des erreurs de lecture et de synthèse par des ADN polymérases trans-lésionnelles infidèles aboutissant soit à une mutation ponctuelle dans le génome, soit une impossibilité de copie de l'ADN avec pour conséquence l'apoptose. *In fine*, cette modification de l'ADN induit des mutations par transversions GC (guanine/cytosine) vers TA (thymine/adénine) souvent observées spontanément dans les cellules cancéreuses. Ces modifications sont les premières étapes de la carcinogenèse et ce n'est pas une coïncidence si les agents carcinogènes sont tous des générateurs puissants de radicaux libres (radiations ionisantes et UV, fumée, alcool, fibres d'amiante, métaux carcinogènes, hydrocarbures polycycliques).

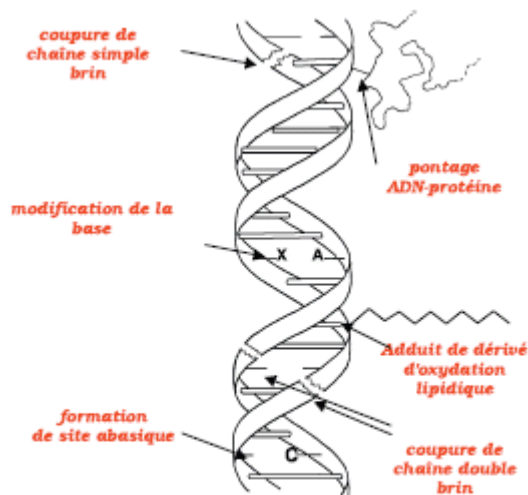


Figure 26 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.

- **Au niveau des lipides, polysaccharides et protéines :** Les composés réactifs carbonés (RCCs), comme par exemple le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (2-HNE), sont formés de façon endogène pendant la peroxydation lipidique et la glycoxydation des carbohydrates. Ils réagissent alors avec les protéines tissulaires et cellulaires pour former des AGEs (*advanced glycation end products*) et des ALEs (*advanced lipid peroxidation ends products*) et induisant des dysfonctionnements protéiques (pertes d'activité, sensibilité aux protéases) et des dommages dans les réponses cellulaires (Zarkovic, 2003 ; Petersen et Doorn, 2004) notamment dans les réponses inflammatoires et l'apoptose (Dalle-Donne et al., 2003 ; Petersen et Doorn, 2004). Cette oxydation et la formation de RCCs est faible en conditions physiologiques mais peuvent être augmentées durant le vieillissement et les maladies chroniques (Dalle-Donne et al., 2003 ; Smit et Lutgers, 2004). Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Ce dernier se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (Esterbauer *et al.*, 1992). Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. L'oxydation des lipoprotéines athérogènes telles que les LDL (Beaudeau, 1999) a été proposée au cours des années 1980. L'oxydation des LDL est l'un des processus de modification des LDL, avec la glycation ou l'agrégation par exemple, permettant leur fixation au niveau intrapariétal vasculaire, et finalement leur action toxique vis-à-vis des cellules environnantes. *In vivo*, différents ROS

peuvent permettre l'oxydation des LDL (oxLDL), qui génère de nombreuses modifications à la fois des lipides et de la capsule protéique (apolipoprotéine B, apo B) de la lipoparticule (Steinberg *et al.*, 1989 ; Heinecke, 1997). Le pouvoir athérogène des LDL ainsi oxydés résulte de l'action de lipides oxydés pro-inflammatoires ou de l'apo B modifiée (favorisant leur captation par des récepteurs non conventionnels) à la fois sur les monocytes-macrophages, sur les cellules endothéliales et sur les cellules musculaires lisses (Palinski *et al.*, 1989 ; Steinberg, 1997 ; Peynet, 2005). Ces dérivés sont souvent hydrophobes et vont donc former des amas anormaux dans et autour des cellules endothéliales. Ainsi, l'accumulation du MDA, associé aux lipides, va former des dépôts d'un pigment fluorescent de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés (Chowdhury *et al.*, 2004). Ces RCCs, le MDA, le 4-HNE ou les LDL-oxydés sont retrouvés en grandes quantités lors des différents stades de l'athérosclérose, lors d'atteinte chronique rénale chez le diabétique de cataracte, chez les obèses et les insulino-résistants lors d'atteinte rénale chronique et de cirrhose biliaire primaire et chez les patients dialysés (Palinski *et al.*, 1989 ; Torzewski *et al.*, 1998 ; Makita *et al.*, 1996 ; Fraley et Tsimikas, 2006 ; Marsili *et al.*, 2004 ; Grimsrud *et al.*, 2007 ; Siems *et al.*, 2002 ; Tsuneyama *et al.*, 2002 ; Carluccio *et al.*, 2002). Ces marqueurs sont retrouvés aussi chez les patients atteints de maladies chroniques inflammatoires telles que le lupus (Morgan *et al.*, 2005), l'asthme, les inflammations chroniques des poumons et allergies respiratoires (Boldogh *et al.*, 2005 ; Castro *et al.*, 2006) mais aussi dans les pathologies dégénératives telles que Alzheimer (Sayre *et al.*, 1997 ; Smith *et al.*, 1998), Parkinson (Yoritaka *et al.*, 1996) et Creutzfeld-Jakob (Andreoletti *et al.*, 2002).

3.1.2.2. ROS et conséquences vasculaires

Les ROS sont capables de modifier la balance relaxation/contraction vers la contraction, jouant un rôle primordial dans les pathologies vasculaires (Griendling et Fitzgerald, 2003a). En effet, les ROS sont capables de diminuer les effets des trois facteurs vasorelaxants endothéliaux ou de promouvoir la formation des facteurs contractants (figures 27 et 28).

- **ROS et NO** : Nous avons déjà vu que les O_2^- diminuent la biodisponibilité du NO en formant les peroxy-nitrites mais ils ont aussi une action directe sur la GCs en inhibant son activité et en diminuant son expression (Rubanyi et Vanhoutte, 1986 ; Price *et al.*, 2000 ; Munzel *et al.*, 2005 ; Gerassimou *et al.*, 2007). Les peroxy-nitrites sont eux même capables, à forte concentration, d'inhiber la GCs, d'inactiver la synthèse de la PGI_2 par nitration de la prostacycline synthase, d'inhiber la SOD (Price *et al.*, 2000 ; Zou *et al.*, 2004) et de découpler la NO synthase

qui va alors former des O_2^- au lieu du NO [voir paragraphe 2.3]. Compte tenu des effets multiples du NO, l'altération du fonctionnement de la voie du NO va conduire à :

- * l'apparition d'une surface pro-thrombotique, puisque le NO n'exerce plus son action anti-agrégant plaquettaire et n'inhibe plus l'expression de la E-sélectine, la P-sélectine, ICAM-1 ou VCAM-1, intervenant dans l'adhésion des plaquettes et des leucocytes (Ross, 1999 ; Cai et Harrison, 2000).

- * d'où l'augmentation de la perméabilité de l'endothélium facilitant ainsi l'infiltration, le dépôt et l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) et donnant l'accès à la paroi vasculaire par les monocytes. Des lymphocytes T sont également recrutés et pouvant entraîner des effets importants sur le devenir de plaques précoces, ainsi que sur la pathogenèse des complications des plaques d'athérosclérose (Cai *et al.*, 2000 ; Caligiuri, 2004 ; Lusis, 2000 ; Packham *et al.*, 1986).

- * la prolifération des cellules musculaires lisses conduisant à l'épaississement de la paroi vasculaire et au développement de pathologies vasculaires occlusives telle que l'athérosclérose.

- * l'altération des relaxations endothélium-dépendantes observées dans les pathologies vasculaires telles que l'hypertension artérielle (Huang *et al.*, 1995 ; Lin *et al.*, 1997a, b ; Ohashi *et al.*, 1998), l'athérosclérose (Hodgson *et al.*, 1989 ; Ludmer *et al.*, 1986 ; Mombouli *et al.*, 1999 ; Vanhoutte, 1997), l'hypercholestérolémie (Eizawa *et al.*, 1995 ; Nevala *et al.*, 2000 ; Seppo *et al.*, 2000 ; Vidla *et al.*, 1998), le diabète (Akbari *et al.*, 1999 ; Wolff *et al.*, 1987) ou des évolutions physiologiques tel que le vieillissement vasculaire (Luscher *et al.*, 1992 ; Matz *et al.*, 2000).

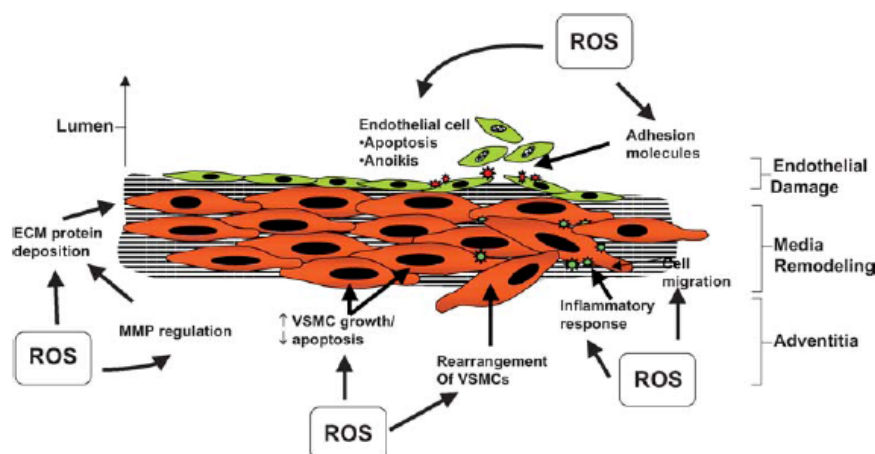


Figure 27 : Effets vasculaires des espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'augmentation de la biodisponibilité des ROS influence les processus cellulaires aboutissant à la croissance, l'inflammation, la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs), et à l'apparition de protéines de la matrice extracellulaire (ECM). MMPs : métalloprotéines de la matrice. (d'après Touyz et Schiffrin, 2004).

- **ROS et EDHF** : Des altérations de la voie d'EDHF ont été montrées tant chez l'animal que chez l'Homme. Le vieillissement, l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle essentielle

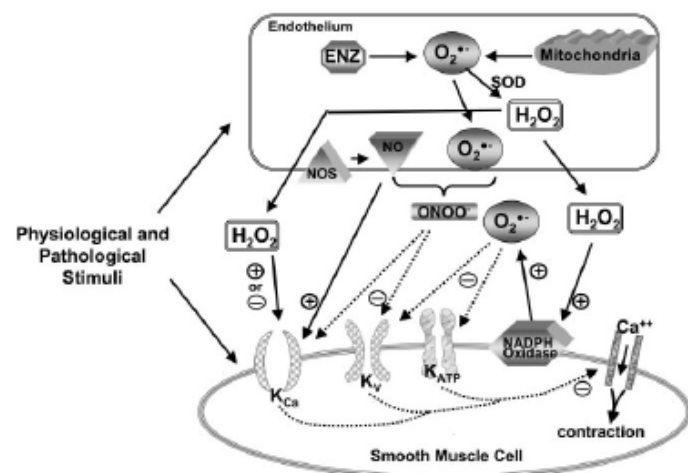
ainsi que l'éclampsie gravidique diminuent les réponses attribués à EDHF dans les artères humaines (Féléto *et al.*, 2004) ainsi que dans divers modèles expérimentaux d'hypertension artérielle, de diabète, d'athérosclérose ou de choc septique (Féléto *et al.*, 2004 ; Urakami-Harasawa *et al.*, 1997). Les O_2^- diminuent la vasodilatation due à EDHF et induite par le flux dans les artères coronaires de souris (Liu *et al.*, 2005), en diminuant l'activité des canaux potassiques dépendants du calcium (SK_{Ca} et IK_{Ca}) (Kusama *et al.*, 2005). Le stress oxydant modifie aussi le passage de l'hyperpolarisation des cellules endothéliales aux cellules musculaires lisses sous jacentes par les jonctions myoendothéliales (Griffith *et al.*, 2005). H_2O_2 possède certes des propriétés vasodilatatrices par son action sur les cellules musculaires lisses vasculaires au niveau de la GCs ou des canaux BK_{Ca} conduisant ainsi à une relaxation par augmentation de $GMPc$ ou à une hyperpolarisation (Vanhoutte, 2001 ; Miura *et al.*, 2003). Cependant, H_2O_2 n'est pas seulement un facteur hyperpolarisant et relaxant (Ellis *et al.*, 2003 ; Shimokawa et Matoba, 2004.), il peut aussi devenir dépolarisant et donc provoquer une contraction (dépendant de l'espèce, type de vaisseaux et concentration ; figure 29) (Féléto et Vanhoutte, 2006).

- **ROS et vasoconstriction** : Des espèces réactives de l'oxygène et plus particulièrement les anions superoxydes sont formés lors de l'activation des cyclooxygénases (Vanhoutte et Katusic, 1988) pouvant être à l'origine d'une contraction dépendante de l'endothélium (Katusic et Vanhoutte, 1989). Les O_2^- peuvent être transformés en OH^{\cdot} , qui vont agir au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires et conduire à la production de prostanoides vasoconstricteurs comme les endoperoxydes, les prostaglandines...(Vanhoutte *et al.*, 2005). Ces derniers peuvent agir directement sur la cellule musculaire et induire une contraction via les récepteurs TP (Auch-Schwelk *et al.*, 1989 ; Vanhoutte, 2001) [Voir paragraphe 1.6]. H_2O_2 induit la contraction des artères par un mécanisme dépendant de l'acide arachidonique, car celle-ci est inhibée par les inhibiteurs des COXs (Gao et Vanhoutte, 1993 ; Gao et Lee, 2001 ; Yang *et al.*, 2003) et par des antagonistes des récepteurs au TXA_2 (Gao et Lee, 2001). Ces contractions induites par H_2O_2 impliqueraient les isoprostanes (Sametz *et al.*, 2000), formées lors de la peroxydation lipidique par les ROS en activant les récepteurs aux prostanoides (Morrow *et al.*, 1992 ; Hoffman *et al.*, 1997 ; Janssen *et al.*, 2000b).

- **ROS et canaux potassiques**: Les effets des ROS sur les canaux potassiques dépendants du calcium, dépendent du type de canaux et de ROS étudiés. H_2O_2 peut affecter les canaux potassiques au niveau des cellules musculaires, activant les canaux dépendants du calcium (K_{Ca}) et les canaux dépendants de l'ATP (K_{ATP}) mais inhibant les canaux voltage dépendants (K_V). Comme nous l'avons vu précédemment, H_2O_2 peut promouvoir la formation d'acide arachidonique

qui peut directement ouvrir les canaux K_{Ca} . L'inhibition des SERCAs augmente la $[Ca^{2+}]$ cytosolique ouvrant ainsi les canaux K_{Ca} et fermant les K_V (Figure 28). Dans certains lits vasculaires, la situation est compliquée par le fait que le NO, une espèce réactive de l'oxygène, peut activer directement les K_{Ca} (Brakemeier *et al.*, 2003 ; Ahern *et al.*, 1999). En revanche, les mécanismes d'altération de l'activité de ces canaux par le stress oxydant ne sont pas encore élucidés. Il existe des hypothèses quand à l'implication de l'oxydation et la nitrosation des protéines. En effet, les ROS pourraient moduler la structure des canaux par une altération des groupements tyrosines, cystéines et méthionine jouant un rôle important dans la formation des pores ou dans les régions de sensibilité au calcium. Wang *et al.* (1997) ont effectivement démontré qu'une modification d'un groupement thiol d'une cystéine sur un domaine cytosolique pouvait inhiber l'ouverture du canal BK_{Ca} .

Figure 28 : Résumé des différentes interactions entre les ROS et les canaux potassiques. ENZ : sources enzymatiques (cytochrome P_{450} , cyclooxygénase, lipoxygénase, xanthine oxydase, NADPH oxydase (d'après Gutterman *et al.*, 2005).



K channels	Artery and (or) cell type	$[H_2O_2]$	Channel effect	Reference
K_{Ca}	KSbIIC transfected cells	0.5–0.8 mmol/L	Activation*	Vega-Saenz de Miera and Rudy 1992
	A549 cells	3 mmol/L	Activation†	Kuo <i>et al.</i> 1993
	Rat cerebral artery	10–100 μ mol/L	Activation‡	Sobey <i>et al.</i> 1997
	Mouse mesenteric artery	0.01–100 μ mol/L	Activation‡	Matoba <i>et al.</i> 2000
	Canine cerebral artery	1–100 μ mol/L	Activation‡	Ida and Katusic 2000
	Porcine coronary myocytes	300 μ mol/L	Increased P_o	Barlow and White 1998
	hS/o transfected cells	0.3%	Decreased P_o	DiChiara and Reinhart 1997
	BAECs	5 mmol/L	Inhibition	Cai and Sauvé 1997
	hS/o-incorporated membranes	4–23 mmol/L	Inhibition	Soto <i>et al.</i> 2002
	HUVECs	0.1–2 mmol/L	Activation	Bychkov <i>et al.</i> 1999
K_{ATP}	Human coronary artery	0.1–300 μ mol/L	Activation‡	Miura <i>et al.</i> 2003
	Feline cerebral artery	0.01–0.1 μ mol/L	Activation‡	Wei <i>et al.</i> 1996
	Renal epithelial LLC-PK1 cells	5 mmol/L	Activation	Filipovic and Reeves 1997
	Mouse pancreatic β cells	1 mmol/L	Activation	Krippeit-Drews <i>et al.</i> 1994
K_{Tp}	Rat pancreatic β cells	100 μ mol/L	Activation	Nakazaki <i>et al.</i> 1995
	Guinea-pig ventricular myocytes	5 mmol/L	Activation	Ichinari <i>et al.</i> 1996
K_V	HUVECs	0.01–1 mmol/L	Inhibition	Bychkov <i>et al.</i> 1999
	Rat hippocampal neurones	0.8–8 mmol/L	Inhibition‡	Muller and Bitner 2002
	Rabbit SA node cells	200 μ mol/L	No effect	Guo <i>et al.</i> 2000

Figure 29 : Résumé des effets de H_2O_2 sur les canaux potassiques dans différents lits vasculaires et préparation (d'après Ellis et Triggle, 2003).

3.2 Rôle de la NADPH oxydase comme source d'anions superoxydes

C'est en 1989 que la NADPH oxydase a été mise en évidence dans les cellules endothéliales vasculaires puis dans les cellules musculaires et dans les fibroblastes de l'adventice (Meier *et al.*, 1989). La NADPH oxydase est un complexe enzymatique multiprotéique, appartenant aux phagocytes (polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, monocytes et macrophages) et aux lymphocytes B. Elle catalyse le transfert d'électrons de son substrat, le NADPH à l'accepteur final l'oxygène, entraînant la production d'anions superoxyde et ses dérivés réduits : le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et l'oxygène singulet. Ces composés oxydants sont capables de tuer les micro-organismes préalablement endocytés.

Cette enzyme est constitué au repos de protéines membranaires (gp91^{phox} ou Nox-2 et p22^{phox}, formant le cytochrome b₅₅₈ et d'une petite protéine G Rap1A) et de protéines cytosoliques (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} et une petite protéine G Rac2). L'activation de la NADPH oxydase met en jeu différentes voies de signalisation aboutissant à la phosphorylation des sous-unités cytosoliques p47^{phox} et p67^{phox} et conduit à un regroupement des différents composants à la membrane des granulations et à la membrane plasmique des phagocytes (Figure 30) (Clark *et al.*, 1999 ; Babior *et al.*, 1999 ; Wientjes *et al.*, 1997 ; DeLeo *et al.*, 1996 ; 1994). Le cytochrome b₅₅₈ est le composant central sur lequel se fixent les sous-unités de la NADPH oxydase après stimulation. Il intervient dans l'organisation du complexe oxydasique actif par interaction des domaines cytoplasmiques carboxy-terminaux avec les facteurs cytosoliques. La liaison de la sous-unité p67^{phox} avec le cytochrome b₅₅₈ induit la transition d'une conformation inactive à active de ce dernier, permettant ainsi le transfert d'électrons (Paclet *et al.*, 2000). Le cytochrome b₅₅₈ fixe du NADPH et du FAD et contient deux hèmes qui lui permettent de réduire directement l'oxygène de l'air. Il se forme ainsi une chaîne de transport d'électrons depuis le NADPH vers l'O₂ moléculaire : NADPH, FAD, hèmes, O₂. Récemment, de nouvelles NADPH oxydases, appelées Nox (NADPH oxydase), ont été caractérisées sur la base de leur homologie de séquence avec la sous-unité catalytique Nox-2. Six homologues ont été ainsi identifiés et répartis en trois groupes à partir de critères évolutifs : le groupe proche de Nox-2 rassemblant Nox-1, Nox-3, Nox-4, le groupe des Duox (*dual oxidase*), Duox-1 et Duox-2, et Nox-5 (Banfi *et al.*, 2000 ; Cheng *et al.*, 2001 ; Geiszt *et al.*, 2000 ; Lambeth, 2004 ; Suh *et al.*, 1999).

Le premier homologue de Nox-2 décrit, Nox-1, a été cloné à partir d'une banque d'ADNc issue de cellules épithéliales de côlon (Suh *et al.*, 1999). Sa surexpression a permis de mettre en évidence une activité oxydase productrice de faibles concentrations de ROS. Sa co-expression avec des sous-unités régulatrices homologues de la p47^{phox} et de la p67^{phox}, augmente

considérablement la production de ROS. La distribution tissulaire de Nox-1 concerne principalement le colon, l'estomac, l'utérus, la prostate et les cellules musculaires lisses des artères (Krause, 2004).

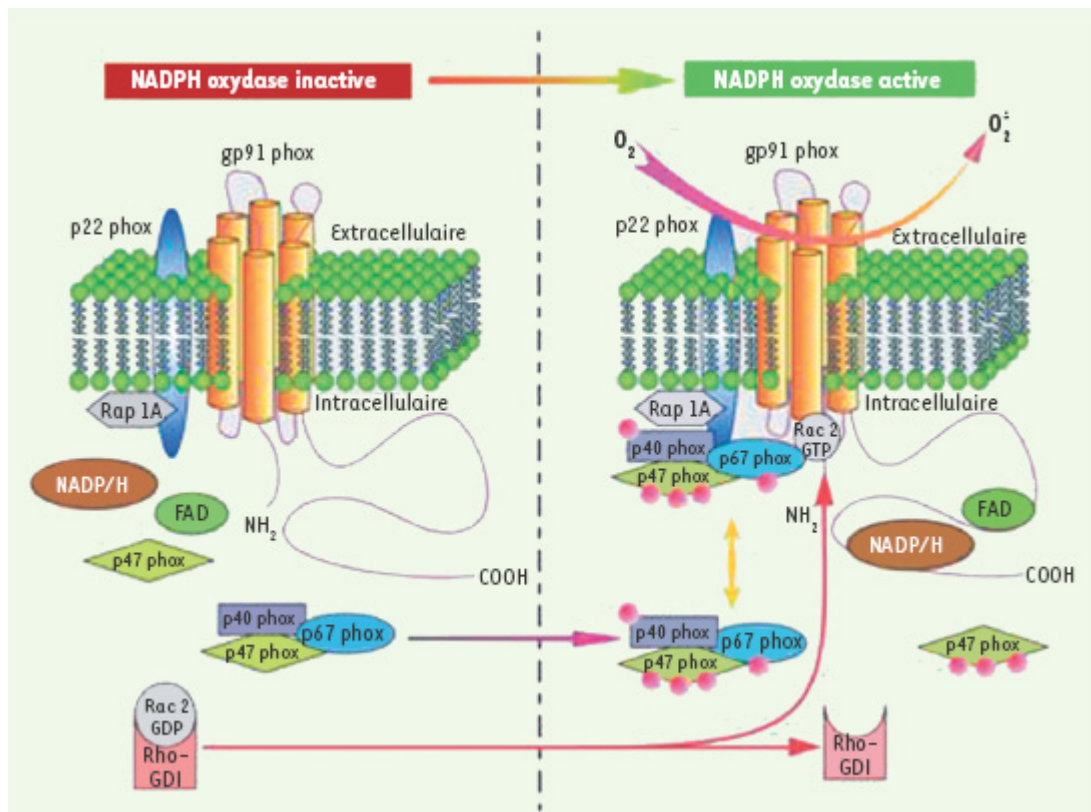


Figure 16 : Représentation schématique de l'activation de la NADPH oxydase.

Rho GDI : *Rho GDP-dissociation inhibitor*; FAD : flavine adénine dinucléotide; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit; cercle rouge : groupement phosphate (d'après DeLeo et Quinn, 1996).

Comme nous l'avons vu précédemment l'athérosclérose, l'hypertension artérielle, le diabète, le vieillissement sont associés à une dysfonction endothéliale en partie due à la production de ROS (Cai et Harrison, 2000). De nombreuses études ont montré une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase associée à une diminution des relaxations endothélium-dépendante due au NO dans chacune de ces pathologies (Li et Shah, 2004 ; Lassegue et Clempus, 2003 ; Warnholtz *et al.*, 1999). D'autres études ont montré, que la NADPH oxydase est une source importante d'anions superoxydes aussi bien au niveau de vaisseaux humains que dans des modèles animaux associés à des pathologies vasculaires (Rajagopalan *et al.*, 1996 ; Griending *et al.*, 2000b) et corrélé au degré de sévérité de la dysfonction endothéliale (Guzik *et al.*, 2000), appuyant ainsi son rôle important dans la pathogenèse.

3.4 Rôle de la chaîne respiratoire mitochondriale comme source d'anion superoxyde :

La chaîne respiratoire mitochondriale est un événement physiologique correspondant à une fuite d'électrons au niveau des complexes I et III, qui ne dépasse pas 3 à 5 % de la production mitochondriale. En revanche, l'activation métabolique de la chaîne respiratoire (par de fortes concentrations en glucose par exemple, qui favorisent la glycolyse et le cycle des acides tricarboxyliques et fournissent ainsi des substrats à la mitochondrie) va conduire à une production accrue d' O_2^- , également à l'origine d'un stress oxydant vasculaire (Ballinger, 2005). Ce mécanisme est d'ailleurs la principale cause de cette production élevée d' O_2^- par les mitochondries des cellules de la paroi vasculaire est une concentration élevée de glucose comme nous avons pu le montrer sur des cellules endothéliales en culture (Ouslimani, 2005). Elle semble être le premier événement de l'activation de différentes voies impliquées dans la pathogenèse des complications vasculaires du diabète dont la macroangiopathie. Par exemple, la surproduction mitochondriale d' O_2^- induite par le glucose dans les cellules endothéliales engendre une activation de la protéine kinase (PKC) et celle du facteur de transcription (NF- κ B) ainsi que la formation de produits avancés de la glycation (AGE) (Nishikawa, 2000).

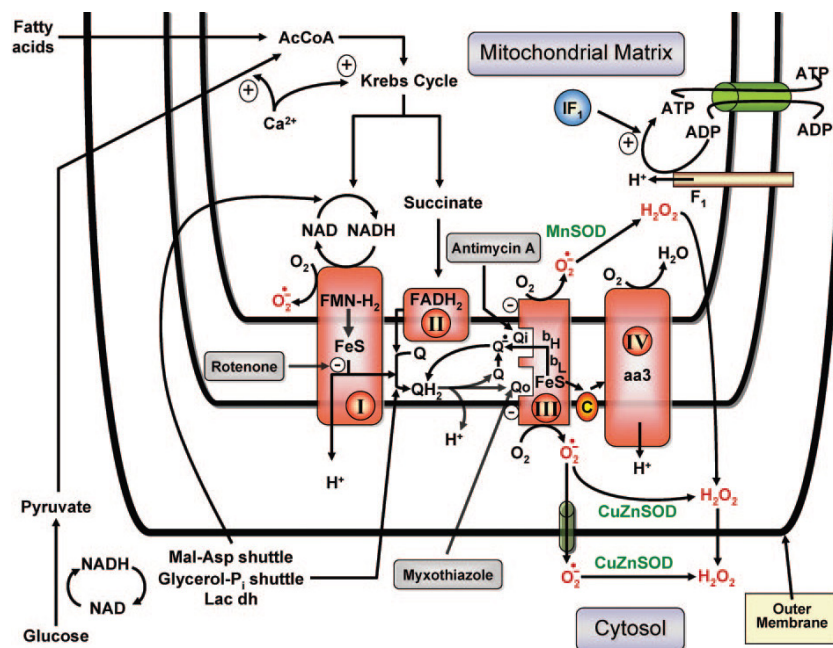


Figure 33 : Représentation schématique du transfert d'électron dans la mitochondrie et la formation d'anions superoxyde. Les différents complexes mitochondriaux sont représentés en rouge, FMN-H₂, FADH₂ : flavines, Fe-S : centres Fer-Soufre, Q-QH₂ : coenzyme Q, bH, bL c, aa3 : cytochromes, O₂ : oxygène, O₂⁻ : anions superoxyde, Mal-Asp : malate-aspartate, glycerol-Pi : glycerol phosphate, lac dh : lactate déhydrogénase, AcCoA : acétyl coenzyme A, F₁ : site de l'ATP synthase, IF₁ : inhibiteur de l'ATPase, Mn-SOD : manganèse superoxyde dismutase, CuZn-SOD : cuivre-zinc superoxyde dysmutase. Les inhibiteurs de ces différents complexes sont en gris (D'après Michaelis *et al.*, 2005).

CHAPITRE 4 :

LES POLYPHENOLS VEGETAUX : PROTECTEURS CARDIOVASCULAIRES

« Le vin est une chose convenable pour l'homme, tant pour l'homme sain que pour l'homme malade, il doit être consommé et administré au moment opportun et dans une juste proportion suivant la constitution individuelle. »

Hippocrate, il y a plus de 2000 ans

CHAPITRE 4: LES POLYPHENOLS VEGETAUX : PROTECTEURS CARDIOVASCULAIRES

De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'une consommation modérée et régulière de vin, et en particulier le vin rouge, est associée à un risque moins élevé de mortalité. Ces effets sont dus à une réduction de la mortalité par maladies cardiovasculaires et les cancers (St Leger *et al.*, 1979 ; Renaud *et al.*, 1998) (Figure 34). Certes l'alcool peut contribuer à ces effets protecteurs en augmentant la concentration de HDL (*high density lipoproteins*) et en diminuant le taux de fibrinogène et la réactivité des plaquettes par exemple (Wollny *et al.*, 1999 ; Rimm *et al.*, 1999 ; Pellegrini *et al.*, 1996), mais des études relativement récentes ont permis de suggérer le rôle important des composés polyphénoliques contenus entre autres dans le vin (Dell'Agli *et al.*, 2004 ; Stoclet *et al.*, 2004) (figure 35).

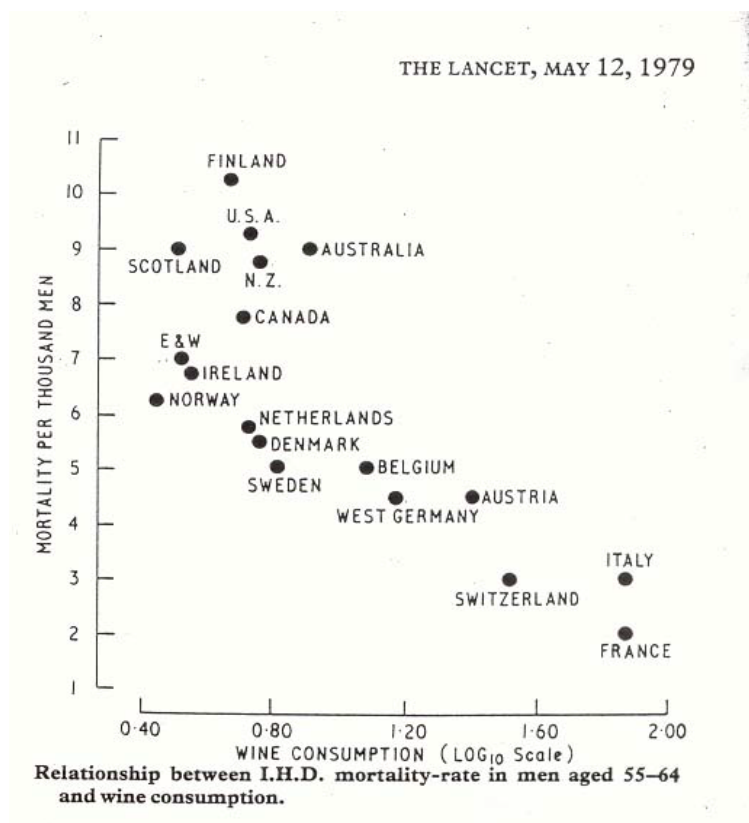
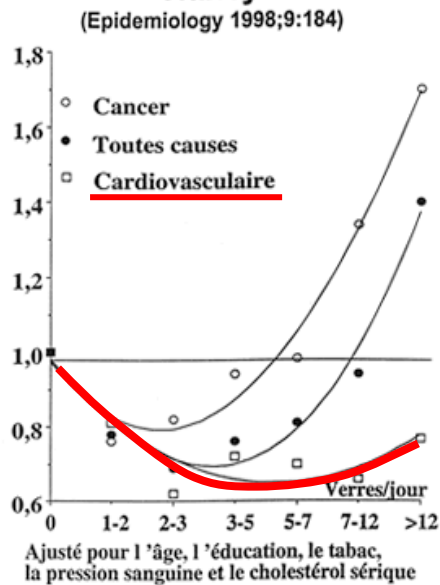


Figure 34 : Taux de mortalité par pays en fonction de la consommation de vin (d'après St Leger *et al.*, 1979).

Mortalité et consommation de vin chez 34000 hommes de Nancy



Mortalité de toutes causes chez 36250 hommes de l'Est de la France en fonction de l'alcool consommé

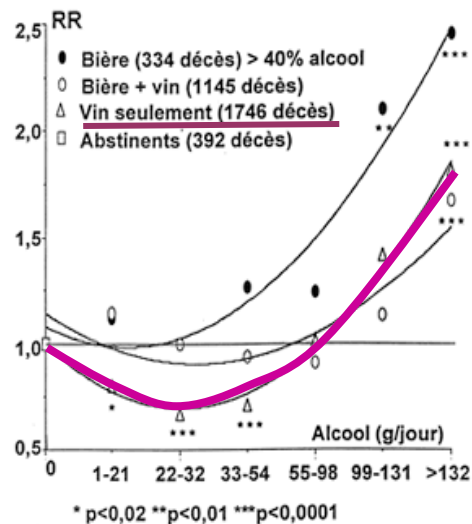


Figure 35 : Taux de mortalité par pathologies en fonction de la consommation de vin et d'autre alcool (d'après Renaud *et al.*, 1998).

4.1 Les polyphénols : généralités

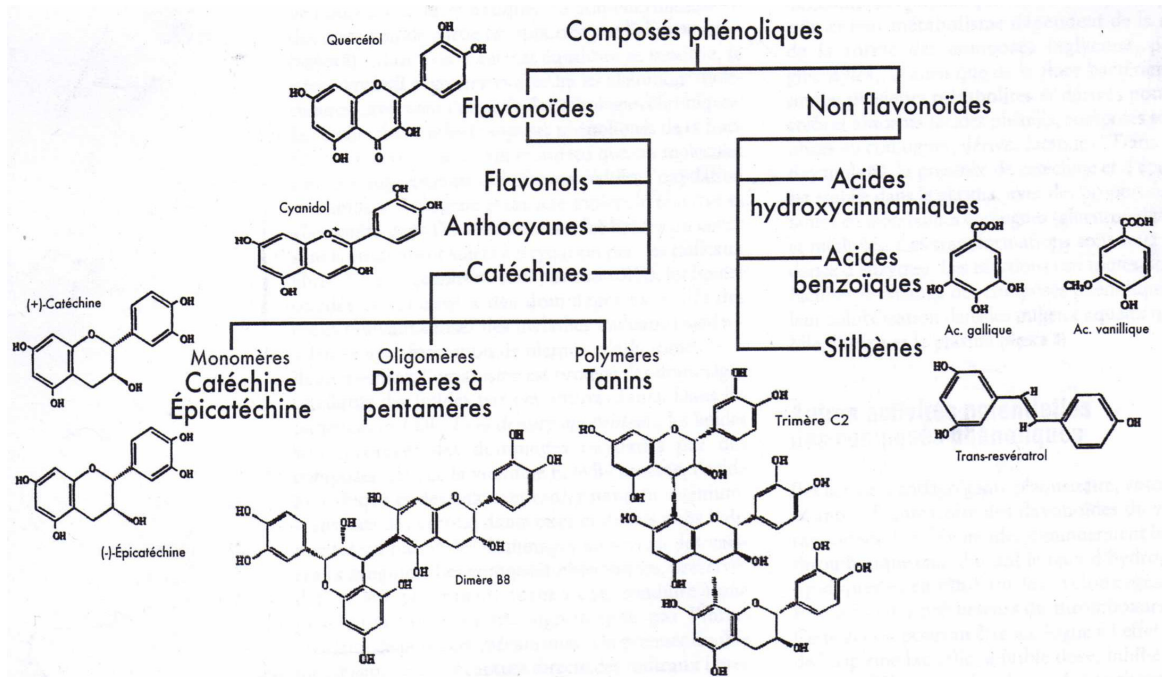
4.1.1. Définitions :

Les polyphénols constituent un groupe de substances naturelles, issues du métabolisme secondaire des plantes, avec des structures chimiques variables. L'élément structural fondamental, qui les caractérise, est la présence d'au moins un noyau benzoïque auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : ester, éther ou hétéroside.

Ils sont très répandus dans le règne végétal et font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale. On les retrouve en grande quantité dans le vin rouge mais beaucoup moins dans les vins blancs. Les polyphénols sont apportés également par les fruits (peaux et grains), les céréales, le chocolat, les légumes, les boissons telles que le thé, le café et par le bois des fûts de chênes (Bravo, 1998).

4.1.2. Classification :

La classe des polyphénols végétaux comprend plus de 8000 composés décrits avec une grande variété structurale allant d'un simple noyau aromatique jusqu'aux tannins complexes. Ils sont classiquement divisés en deux familles : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (Figure 36). 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 que leurs propriétés anticancéreuses, antivirales ou antiallergiques ont été rapportées au cours de nombreuses expérimentations (Middleton *et al.*, 2000). Les principaux groupes de phénols dans le raisin et le vin sont les phénols simples (non-flavonoïde), les flavonoïdes et les tanins (Cheynier *et al.*, 1997).



(Figure 36) : Classification sommaire des composés phénoliques présents dans le raisin et le vin (d'après Teissedre, 2008).

4.1.2.1. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes représentent le groupe le plus répandu parmi les polyphénols. Ils sont présents dans tout le règne végétal et sont les plus abondants parmi les composés polyphénoliques. Dans les vins rouges, ils constituent plus de 85% du contenu en phénols (> 1 g/L), alors qu'ils représentent moins de 20% du contenu en phénols dans les vins blancs (< 50 mg/L) (Singleton, 1982 ; Soleas *et al.*, 1997). Ils comprennent 15 atomes de carbone formant une structure C6-C3-C6 soient deux noyaux aromatiques reliés par un pont de 3 carbones. Leurs

rôles sont variés dans les plantes en tant que métabolites secondaires, étant impliqués dans les processus de défenses contre les UV, la pigmentation, et la résistance contre les agresseurs bactériens et fongiques comme le mildiou ou certains produits phytosanitaires (Langcake et Pryce, 1976 ; Coulomb et al. 1999).

Six grandes classes de flavonoïdes peuvent être mentionnées : les flavonols, les flavanones, les flavones, les anthocyanidines, les isoflavones et les flavan-3-ols (Figure 37).

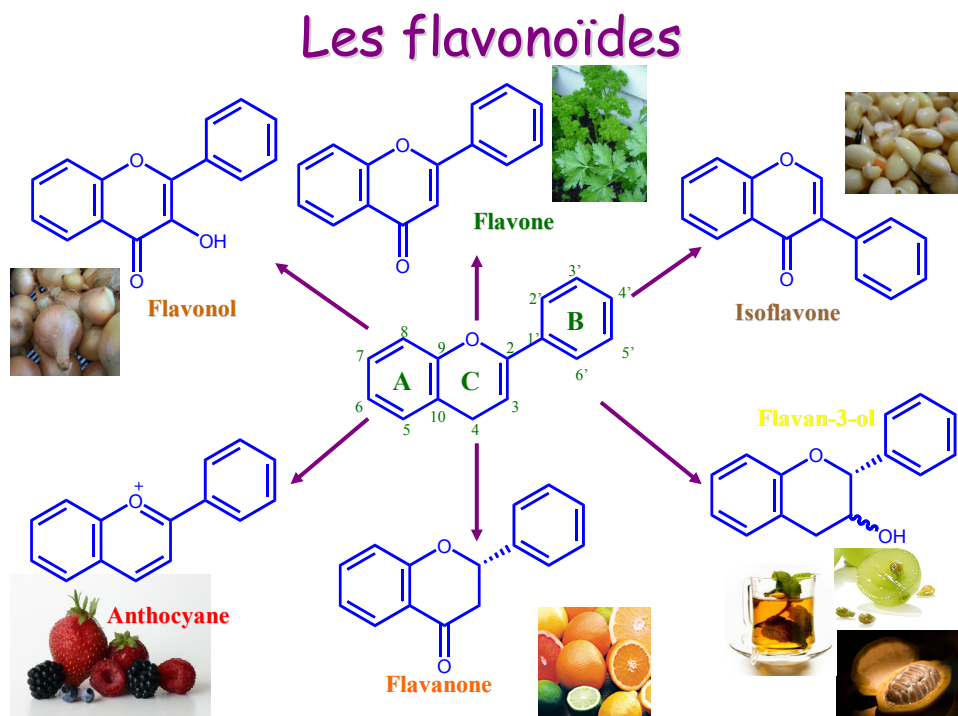


Figure 37 : Représentation des familles de flavonoïdes et leurs principales sources alimentaires. A, B, C : hétérocycles comprenant la numérotation des différents carbones.

- * Les **flavones** sont présents dans les plantes aromatiques (persil), le céleri, l'aubépine, les pommes et la menthe.
- * Les **isoflavones** sont présents dans les légumineuses et le soja. Ils ont une structure proche des œstrogènes et sont classés dans les phytoœstrogènes et ont des propriétés « pseudo-hormonales »
- * Les **flavan-3-ols** peuvent exister sous forme de monomère (**catéchine**, **épicatéchine**), sous forme d'oligomères de procyanidines (dimères à pentamères) ou polymères de procyanidines (**les tannins condensés**). On retrouve les catéchines dans un grand nombre de fruits (notamment les abricots), le vin rouge mais surtout dans le thé vert et le chocolat où ils sont présents en grande

quantité. Les tannins sont responsables de l'astringence de certains fruits (raisins, pommes...) et de certaines boissons (vin, cidre, thé, bière) et de l'amertume du chocolat.

* Les **flavanones** sont présents essentiellement dans les agrumes et notamment dans la peau.

* Les **anthocyanes** sont présents dans les fruits rouges et les fleurs dont ils sont responsables de leur couleur (bleu, rouge, mauve, rose ou orange). Le vin rouge est une source importante d'anthocyanes.

* Les **flavonols** sont présents dans les oignons, le chou, le ginkgo, poireau et la moutarde. Les flavonols sont concentrés au niveau périphérique de ces plantes c'est-à-dire au niveau des feuilles et de la peau des fruits car leur biosynthèse nécessite de la lumière.

4.1.2.2. Les non-flavonoïdes :

* Les **phénols simples** sont des dérivés à 6 carbones du noyau benzénique sur lequel sont greffés un ou plusieurs groupements hydroxyles. Ils sont rares à l'état naturel. On trouve parmi les phénols l'hydroquinol, le crésol et l'acide shikimique (Figure 38).

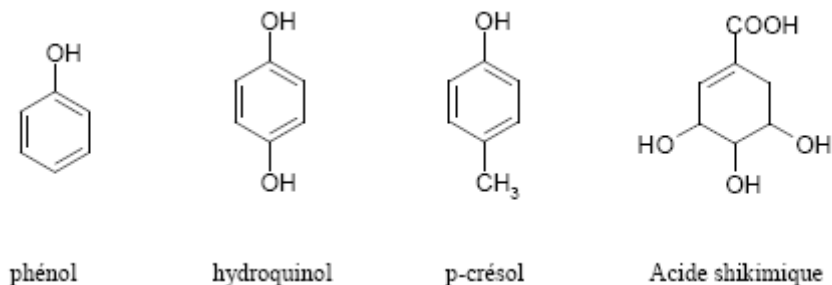
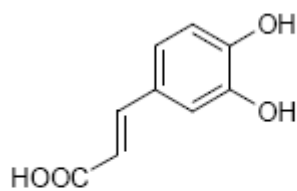
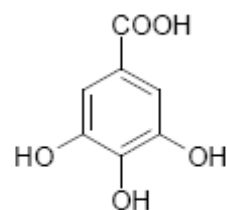


Figure 38 : Représentation des phénols simples.

* Les **acides phénoliques** comportent deux classes : les acides hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques. Les dérivés de l'acide cinnamique (acide coumarique, caféique) sont rarement retrouvés sous forme libre à l'état naturel mais plutôt sous forme combinée (acide caféique+acide quinique=acide chlorogénique, présent dans des fruits et le café). Les dérivés de l'acide benzoïques (acide gallique, vanillique) sont présents en grandes quantités dans le vin blanc par exemple. Ils font aussi partie des structures complexes des tanins (hydrolysables et complexes).



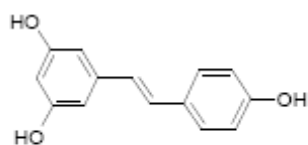
Acide caféique



Acide gallique

Figure 39 : Exemples de structures des acides hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques respectivement.

* **Les stilbènes** : cette famille de polyphénols naturels est constituée de dérivés hydroxy-, méthoxy- du stilbène simple, ainsi que leurs formes hétérosidiques ou polymériques. On les trouve chez de nombreuses plantes supérieures. En réponse à des attaques de pathogènes extérieurs (insectes, micro-organismes), les plantes se protègent en produisant des composés toxiques contribuant au blocage local des attaquants. Certaines de ces substances, comme les alcaloïdes (nicotine), les terpénoïdes (pyréthrine) ou les isoflavones (roténoïdes) ont été très étudiées. D'autres comme les stilbènes sont beaucoup moins connues. Pezet *et al.*, (2004) ont montré que les feuilles de vignes inoculées par le mildiou (*Plasmopara viticola*) vont au bout de quelques heures produire localement des stilbènes. Le resvératrol est le chef de file des stilbènes (Figure 40). On le retrouve en très petites quantités dans le vin rouge (0,3 à 7 mg d'aglycones/L et 15 mg de glycosides/L) (Bertelli *et al.*, 1998). D'une manière générale, les stilbènes sont présents à de très faibles concentrations dans l'alimentation.



Resvératrol

Figure 40 : Représentation de stilbène majeur, le resvératrol.

4.1.3. Les polyphénols au centre de notre alimentation :

Les polyphénols sont présents dans de nombreux aliments d'origine végétale, tels que les légumes, les fruits, les céréales ou les fruits secs, ainsi que dans les boissons, comme le vin, le cidre, la bière ou le thé.

Groupes	Composés	Origines
FLAVONES	Apigénine	Pomme
	Chrysin	Baies
	Kaempférol	Broccoli
	Lutéoline	Céleri
	Myricétine	Pelure de fruit
	Rutine	Canneberge
	Sigéline	Raisin
	Quercétine	Laitue, oignons, persil et olives
FLAVANONES	Fisétine	Fruits et zeste d'agrumes
	Hespéridine	
	Naringine	
	Naringénine	
	Taxifoline	
CATECHINES	Catéchine	Vin rouge
	Epicatéchine	Thé vert
	Epigallocatechine gallate	
	Procyanidines	
ANTHOCYANES	Cyanidine	Baies
	Delphinidine	Cerise
	Malvidine	Raisin
	Pélagonidine	Framboise
	Péonidine	Raisin rouge
	Pétunidine	Thé, Vin rouge, fraises, peau des fruits avec des pigments foncés

Figure 41 : Principaux groupes de polyphénols et leurs principales sources alimentaires. (d'après Nijveldt *et al.*, 2001)

L'estimation de l'apport alimentaire en composés phénoliques reste difficile du fait de la vaste diversité des composés présents, à laquelle s'ajoutent les multiples possibilités de conjugaison, notamment de glycosylation. De plus, les teneurs sont variables pour un même aliment en fonction de la variété, du lieu de culture, et de la saison considérée. De même, les différents traitements technologiques et conditions de stockage vont avoir un impact sur la quantité et la qualité des composés phénoliques présents (Mazza, 1995).

4.2 Les effets cardiovasculaires des polyphénols :

De nombreuses données épidémiologiques, ont confirmé que les populations consommatrices de vin présentaient des taux bas de mortalité pour les maladies cardiovasculaires. De nombreuses études épidémiologiques et scientifiques (Boffet et Garfinkel, 1990 ; Renaud et al., 1998 ; Renaud et Lorgeril, 1992), récoltées dans les pays industrialisés, et portant sur la consommation de vin et la mortalité cardio-vasculaire ont montré qu'une consommation modérée de vin de l'ordre de 1 à 3 verres par jour soit 150 à 300 ml/jour conduisait à une réduction de cette mortalité de l'ordre de 30% à 50% par rapport aux non-consommateurs. Cependant, une consommation importante (plus de 4 à 5 verres par jour) est dommageable et est associée à l'hypertension artérielle, aux attaques cérébro-vasculaires, aux crises cardiaques et donc à une augmentation de la mortalité ! Ainsi un bénéfice en matière de santé ne peut être observé que pour une consommation modérée de vin.

Un des retentissements les plus fameux de ces découvertes fût l'émission « 60 minutes », présentée en novembre 1991 sur la chaîne américaine CBS où Serge Renaud permit de faire découvrir au grand public l'existence du « *French paradox* » (Renaud et De Lorgeril, 1992). Cette dénomination révèle un constat épidémiologique montrant que si, dans la plupart des pays, une consommation élevée de graisses saturées est fortement corrélée avec des mortalités importantes pour les maladies cardiovasculaires, cela n'est pas le cas en France et en plus particulièrement dans la région de Toulouse où la mortalité d'origine coronarienne est faible malgré une consommation conséquente de graisses saturées (Renaud et Gueguen, 1998 ; Renaud et al., 1998 ; Rimm et al., 1999 ; Gronbaek et al., 2000 ; Zenebe et Pechanova, 2002). Parmi les hypothèses avancées pour expliquer ce paradoxe, la consommation régulière et modérée de vin a été émise.

En effet, la consommation d'aliments riches en polyphénols ou de vin rouge réduit le développement de nombreuses pathologies, telles que le cancer, l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension (Bohm et al., 2004 ; de Gaetano et al., 2002 ; Duffy et al., 2003 ; Goldfinger, 2003 ; Hertog et al., 1993a, b ; Maron, 2004 ; Middleton et al., 2000 ; Nijveldt et al., 2001 ; Stocker et al., 2004 ; Tomera, 1999 ; Waddington et al., 2004). Les polyphénols ont aussi des propriétés anti-diabétiques (Al-Awwadi et al., 2004). Ils ont aussi été décrits comme étant des anti-agrégants plaquettaires, des anti-allergènes et des anti-tumoraux (Middleton et al., 2000). Les polyphénols sont en effet capables d'empêcher l'oxydation des LDL (Osakabe et al., 2000), d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (Iijima et al., 2000) d'empêcher l'agrégation plaquettaire (Wollny et al., 1999) et de promouvoir

le relâchement des cellules musculaires lisses vasculaires (Andriambelason *et al.*, 1997 ; Zenebe *et al.*, 2003). 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 (Stoclet *et al.*, 2004) ainsi que leurs effets in vivo sur la prévention du développement de l'hypertension chez le rat (Sarr *et al.*, 2006).

4.2.1. Les polyphénols, une activité anti- et pro-oxydantes

Ce sont les propriétés anti-oxydantes des composés polyphénoliques qui ont été les plus décrites. Ils peuvent ainsi avoir un effet additionnel au système endogène régulant la balance oxydative. Plusieurs études ont montrés que les composés polyphénoliques, et l'alcool, contenu dans le vin pouvaient contribuer à ce effet protecteur (Frankel *et al.*, 1993 ; Fuhrman *et al.*, 1995 ; Serafini *et al.*, 1998 ; Senault *et al.*, 2000). Des études réalisées chez l'Homme ont permis de montrer que l'ingestion de vin rouge augmentait l'activité antioxydante dans le sang, en comparaison avec d'autres boissons (Maxwell *et al.*, 1994, Fuhrman *et al.*, 1995 ; Whitehead *et al.*, 1995). Une augmentation de la capacité anti-oxydante du plasma est également observée lors d'une supplémentation en polyphénols du vin rouge (Carbonneau *et al.*, 1997 ; Day *et al.*, 1997 ; Rive -Evans *et al.*, 1997). Les polyphénols du vin rouge sont capables de piéger les radicaux oxygénés (Robak *et al.*, 1988 ; Stupans *et al.*, 2002), d'inhiber l'oxydation des LDL (Frankel *et al.*, 1993 ; Fuhrman *et al.*, 1995 ; Kondo *et al.*, 1994 ; Senault *et al.*, 2000 ; Serafini *et al.*, 1998), d'inhiber l'expression et l'activité d'enzymes pro-oxydantes telles que la NADPH oxydase et la xanthine oxydase et d'augmenter celles d'enzymes anti-oxydantes telle que la catalase (Chang *et al.*, 1993 ; Johnson *et al.*, 2002 ; Orallo *et al.*, 2002 ; Ying *et al.*, 2003).

Des travaux récents montrent que certains polyphénols peuvent induire dans certaines conditions, la formation de ROS. En effet, les flavonoïdes induisent une apoptose cellulaire par perte du potentiel transmembranaire mitochondrial, une augmentation de la production de ROS et la libération du cytochrome c mitochondrial dans le cytoplasme (Wang *et al.*, 1999). Les polyphénols de l'alimentation ayant un noyau phénolique dans leur structure sont métabolisés par les peroxydases pour former un radical phénoxy pro-oxydant, qui est suffisamment réactif pour oxyder le glutathione réduit (GSH) ou la NADH, s'accompagnant d'une forte consommation d'oxygène et la formation de ROS (Galati *et al.*, 1999, 2002). Au niveau vasculaire (voir paragraphe 4.2.2), les polyphénols du vin rouge et du jus de raisin induisent une relaxation des artères coronaires de porcs et mésentériques de rats par la formation de ROS au niveau

endothéliale, formation nécessaire pour l'activation de la synthèse des facteurs vasorelaxants (Anselm *et al.*, 2007 ; Ndiaye *et al.*, 2003, 2004, 2005).

4.2.2. Les polyphénols, acteurs dans le contrôle de la vasomotricité

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 (Stoclet *et al.*, 2004). Les polyphénols du vin rouge ont des propriétés anti-angiogéniques, anti-athérosclérotiques (voir paragraphes 4.2.3 et 4.2.4) (Oak *et al.*, 2003, 2004 ; Walter *et al.*, 2008) et vasorelaxantes. Cette dernière propriété implique la production par les cellules endothéliales de NO (Andriambelason *et al.*, 1997; Stoclet *et al.*, 1999) et d'un facteur hyperpolarisant de type EDHF (Ndiaye *et al.*, 2003, 2004).

4.2.2.1. Stimulation de la formation du NO :

De nombreuses études indiquent que les composés polyphénoliques de vin constituent une nouvelle classe de stimuli pour la formation endothéliale du NO. La capacité d'extraits de peau, de pulpe, de jus de raisin et de vins rouges et blancs à induire des relaxations dépendantes de l'endothélium et médiées par NO a été examinée initialement sur des anneaux d'aorte de rat isolés (Fitzpatrick *et al.*, 1993). En effet, les polyphénols du vin rouge et du jus de raisin sont capables d'induire l'activation de la eNOS par deux mécanismes (voir figure 42). La première est indépendante de la $[Ca^{2+}]_i$ et fait intervenir la voie phosphoinositide-3 kinase (PI3-Kinase)/Akt, aboutissant à la phosphorylation de la eNOS sur le résidu sérine 1177. Cette voie PI3-Kinase/Akt peut être aussi stimulée par les forces de cisaillement (Dimmeler *et al.*, 1999), les œstrogènes et le VEGF. La seconde est mineure et activée à forte concentration en polyphénols ($10^{-2}M$). Elle implique l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ aboutissant à la formation du NO (Stoclet *et al.*, 1999 ; Martin *et al.*, 2003). Il faut noter que ces effets aigus sont accompagnés par des effets à plus long termes des polyphénols du vin rouge, puisqu'ils sont capables de moduler l'expression de la eNOS (Wallerath *et al.*, 2002, 2003 ; Leikert *et al.*, 2002) par une augmentation de l'activité du promoteur de la eNOS et une stabilisation de son ARN messenger (Wallerath *et al.*, 2002). L'ensemble de ces effets sur la eNOS aboutit ainsi à la formation accrue et soutenue de NO endothélial.

4.2.2.2. Stimulation de la formation d'EDHF :

Les études réalisées dans le laboratoire ont permis de montrer que les polyphénols du vin rouge sont aussi capables d'induire la formation d'EDHF dans l'artère coronaires de porc (Ndiaye *et al.*, 2001). De plus ces relaxations sont associées à une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses vasculaires sensibles à la combinaison de CTX et APA, donc attribuable à EDHF (Ndiaye *et al.*, 2001). D'autres études ont permis de mettre en avant l'importance de la voie PI3kinase/Akt ainsi que de la formation des ROS, étape crucial dans la formation d'EDHF (et de NO) par les polyphénols du vin rouge et du jus de raisin, dans l'artère coronaire de porc (Ndiaye *et al.*, 2003, 2005 ; Anselm *et al.*, 2007). Les canaux potassiques endothéliaux seraient une cible potentielle de cette voie de signalisation mais il manque encore des preuves dans la littérature. Une étude réalisée *in vitro* sur des lignées de cellules endothéliales a démontré une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux IK_{Ca} par action directe du resvératrol (Li *et al.*, 2000).

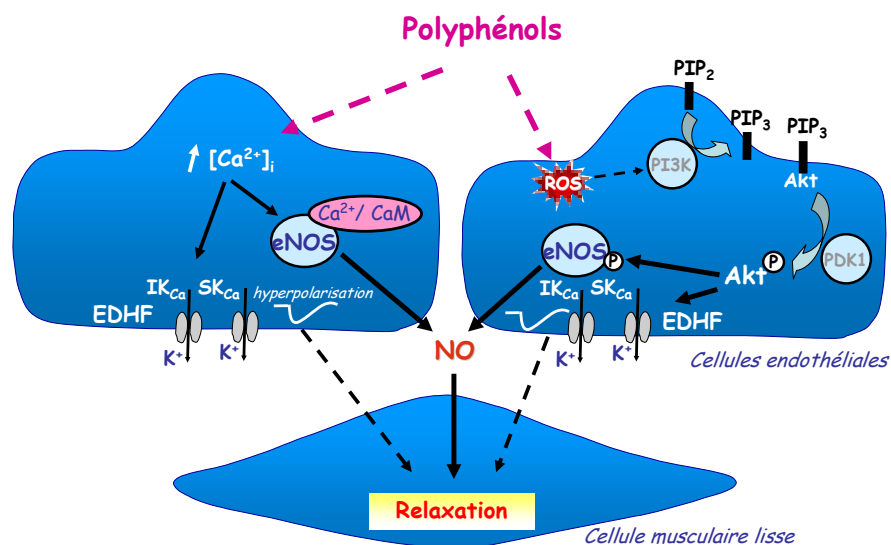


Figure 42 : Voies d'activation des facteurs vasorelaxants NO et EDHF par les polyphénols. $[Ca^{2+}]_i$: concentration en calcium intracellulaire ; CaM : calmoduline, eNOS : NO synthase endothéliale ; PIP_2 : lipides membranaires phosphatidylinositol-4,5-biphosphates ; PIP_3 : phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate ; PI3K : PI3-kinase ; PDK1 : protéine kinase 1 dépendante des phosphoinositides ; P : site phosphorylé ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; IK_{Ca} et SK_{Ca} : canaux potassiques dépendants du calcium d'intermédiaire et de faible conductance.

4.2.3. Les polyphénols, des anti-thrombotiques

L'agrégation plaquettaire constitue l'étape préalable à la coagulation sanguine lorsqu'un vaisseau est lésé. Elle peut aussi avoir des effets indésirables lorsqu'elle se produit sur une plaque d'athérome : elle favorise alors la constitution d'un thrombus (caillot), qui se détache et

obstrue les petits vaisseaux. Il a été montré que les polyphénols du thé peuvent induire l'augmentation de la fibrinolyse, empêcher l'adhésion et l'agrégation plaquettaire et peuvent diminuer le taux de cholestérol au niveau de la paroi aortique (Lou *et al.*, 1989). Chez l'Homme, la quercétine, les catéchines et le resvératrol inhibent la synthèse du TXA₂ dans les plaquettes et les leukotriènes dans les neutrophiles (Pace-Asciak *et al.*, 1995). La consommation de vin rouge chez l'Homme diminue *ex vivo* l'induction par l'ADP de l'agrégation plaquettaire chez l'Homme (Demrow *et al.*, 1995). L'activité plaquettaire peut aussi être réduite par les polyphénols du vin en stimulant la synthèse du NO (Ruf *et al.*, 1999). Les polyphénols peuvent aussi induire l'expression de l'activateur tissulaire de plasminogène (t-PA) et de l'urokinase (u-PA), responsables de la fibrinolyse (Abou-Agag *et al.*, 2001 ; Zhao *et al.*, 1999). En accord avec tous ces effets anti-thrombotique, Wollny *et al.*, (1999) a démontré qu'une consommation de vin rouge pendant 10 jours permettait une diminution de 58% de la taille d'un thrombus chez le rat ayant eu une ligature de la veine cave inférieure. Soulat *et al.* (2006) ont confirmé ces résultats avec 12 jours de consommation de polyphénols du vin rouge et avec la catéchine purifiée, chez la souris ApoE^{-/-}.

4.2.4. Les polyphénols, des anti-athérosclérotiques

De par leurs propriétés antioxydantes, les polyphénols ont une influence majeure sur le système cardiovasculaire. Les radicaux libres peuvent oxyder les LDL, modifier la perméabilité membranaire et promouvoir le développement d'un environnement pro-athérosclérotique. De nombreuses études cliniques ont démontrés les effets bénéfiques protecteurs des flavonoïdes dans les maladies coronariennes (Hertog *et al.*, 1993a, 1995). Hertog *et al.*, (1995) proposent alors que la consommation régulière de polyphénols dans notre alimentation pourrait prévenir les risques de décès par maladies coronariennes. De plus au Japon, une étude a montré une corrélation inverse entre la consommation de polyphénols et les concentrations plasmatiques totales de cholestérol (Arai *et al.*, 2000). 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).

4.2.5. Les polyphénols, des anti-inflammatoires

L'inflammation joue un rôle crucial dans le développement de l'athérosclérose et de l'activation de la paroi vasculaire, aboutissant à une thrombose locale et à une vasoconstriction. Les flavonoïdes peuvent inhiber la formation de principaux médiateurs pro-inflammatoires du métabolisme de l'acide arachidonique (Ferrandiz *et al.*, 1990, 1991 ; Laughton *et al.*, 1991 ; Yoshimoto *et al.*, 1983 ; Kim *et al.*, 1998) en inhibant directement l'activité de la PLA₂ (Alcaraz et Houlst, 1985 ; Fawzy *et al.*, 1988), des COXs (Moroney *et al.*, 1988), des lipoxigénases (Yoshimoto *et al.*, 1983 ; Koshuhara *et al.*, 1983 ; Alcaraz et Houlst, 1985 ; Moroney *et al.*, 1988) et en inhibant la peroxydation non-enzymatique des acides gras polyinsaturés nécessaire à l'activation de ces oxygénases (Swain, 1986).

4.2.6. Les polyphénols, des anti-tumoraux

Des études épidémiologiques ont indiqué qu'une consommation modérée de 1 à 3 verres de vin par jour est associée à une diminution de 22% des cancers (Gronbaek *et al.*, 2000). De part leur effet antioxydant, les polyphénols ont des propriétés anti-tumorales. En effet, la formation de ROS serait impliquée dans la carcinogénèse (Loft et Poulsen, 1996). Nous avons vu dans le paragraphe 2.1.2 que les ROS peuvent endommager l'ADN pouvant aboutir à des mutations. Si ces mutations touchent les gènes suppresseurs de tumeurs (p53...) et d'oncogènes (c-myc...), alors il y aura l'initiation et progression du cancer. Les flavonoïdes sont capables d'inhiber la carcinogénèse (Stefani *et al.*, 1999) et l'angiogénèse (Fotsis *et al.*, 1997 ; Walter *et al.*, 2008), qui mal régulée joue un rôle important dans les cancers (Fan *et al.*, 1995).

4.3 Autres propriétés de polyphénols : des anti-ostéoporoses et des anti-viraux :

Une étude anglaise réalisée chez des femmes âgées ayant ou non consommées du thé, a permis de montrer un effet du thé sur la densité osseuse, plus élevée chez les femmes consommatrices de thé. Ainsi les flavonoïdes présents dans le thé permettraient la prévention de l'ostéoporose (Hegarty *et al.*, 2000).

L'activité antivirale des flavonoïdes a été montrée en 1998 par Wang *et al.* Le pouvoir infectieux et / ou la réplication des virus de l'herpès, des virus respiratoires, des adénovirus et des virus influenza sont inhibées par les traitements avec les flavonoïdes. La quercétine notamment a des propriétés anti-infectieuses mais aussi anti-répliquatives (Kaul *et al.*, 1985).

PARTIE 1 :

LES MODELES ANIMAUX

PARTIE 1: LES MODELES ANIMAUX

Toutes les expérimentations ont été conduites avec des rats mâles Wistar maintenus dans des conditions d'élevage standard (rythme nyctéméral de 12h/12h, nourriture et boisson *ad libitum*). Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par un comité d'éthique locale (*CREMEAS*) et conformes au "Guide for the Care and Use of laboratory Animals" publié dans le *US National Institutes of health* (NIH publication no. 85-23, revised 1996).

1.1 Hypertension artérielle : infusion chronique d'angiotensine II : (publications 1 et 2)

1.1.1. Animaux, conditions d'élevage et chirurgie :

28 rats mâles adultes de souche Wistar âgés de 12 semaines et pesant environ 350g, sont placés dans des cages individuelles. Les animaux sont répartis en deux groupes (n = 14), le premier étant un groupe contrôle et le second comprenant les animaux traités avec l'angiotensine II à 0,4 mg/kg/j durant 21 jours à l'aide d'une mini-pompe osmotique ALZET. Pour la mise en place de la mini-pompe osmotique, l'animal est anesthésié avec du pentobarbital sodique en solution (54,7 mg/mL; CEVA Santé Animale), la dose de 50 mg/kg est injectée en intrapéritonéale. L'animal anesthésié est positionné en décubitus ventral, les pattes avant écartées. Les poils du dos au niveau des omoplates sont enlevés et la peau est désinfectée au Bétyle® (polyvinyle iodée à 10%). La pompe utilisée est une pompe ALZET® (Alzet, model 2004) de 200 μ L avec une vitesse de perfusion de 0,25 μ L/h, prévue pour 28 jours. L'angiotensine II est dissoute dans du sérum physiologique (NaCl à 0,9%). Une fois la pompe remplie avec l'angiotensine II, elle est placée dans un sérum physiologique stérile avant d'être introduite chez l'animal. Une incision de 1 cm est réalisée, un « tunnel » sous-cutané en direction caudale est créé afin d'y positionner la pompe. La peau est suturée avec deux agrafes, nettoyées avec du Bétyle®. L'animal est surveillé durant son réveil et les heures suivant l'opération (figure 43).

Minipompe osmotique

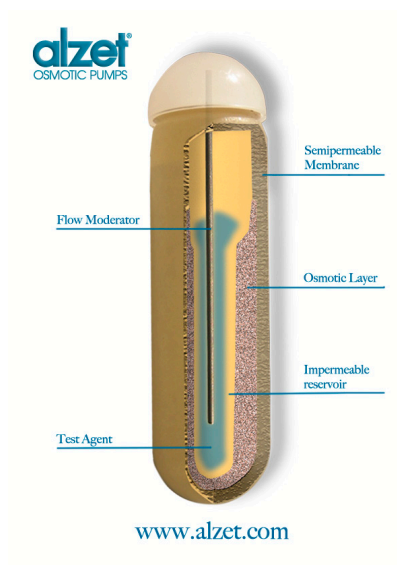


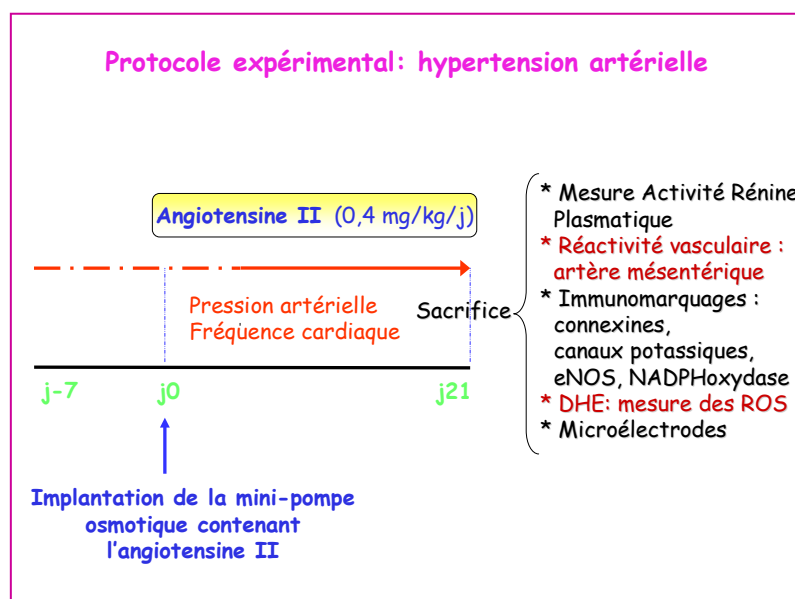
Figure 43 : Mise en place de la mini-pompe osmotique ALZET chez le rat

1.1.2. Protocole expérimental :

Les 7 premiers jours correspondent à l'entraînement de la prise de pression artérielle pour tous les animaux. La suite du protocole varie en fonction des deux groupes.

Au 7^{ème} jour sont placées les pompes ALZET délivrant pour 21 jours de l'angiotensine II continuellement à la même dose. Au 28^{ème} jour les animaux sont sacrifiés, des prélèvements sanguins sont réalisés sur l'animal anesthésié, afin de pouvoir doser la rénine plasmatique. Les artères mésentériques sont prélevées pour réaliser des études immunohistochimiques d'une part et pour la réactivité vasculaire (en chambre à organes isolés), d'autre part (figure 44).

Figure 44 : Protocole expérimental pour l'étude sur l'hypertension artérielle induite par infusion d'angiotensine II durant 21 jours *in vivo* chez le rat.



1.1.3. Mesure de pression artérielle et de fréquence cardiaque :

Les animaux sont entraînés à la prise de pression systolique par pléthysmographie (LE 5002®, BIOSEB, Chaville, France) 5 jours par semaine durant les 7 premiers jours, afin d'éliminer le biais du stress des animaux face au dispositif. Cette prise de pression quotidienne est ensuite effectuée tout au long du protocole expérimental.

L'animal est placé dans une chambre chauffante pendant une vingtaine de minutes puis est disposé dans un tunnel en plexiglas transparent sur une plaque chauffante, avec un chiffon par-dessus pour qu'il ne soit pas perturbé par l'environnement extérieur. Il est maintenu immobile dans le tunnel, la queue placée dans un brassard qui comprime l'artère caudale. La pression systolique est déterminée au moment de la (re)-circulation sanguine permise par un relâchement du manchon. La fréquence cardiaque est aussi mesurée en parallèle (figure 45).

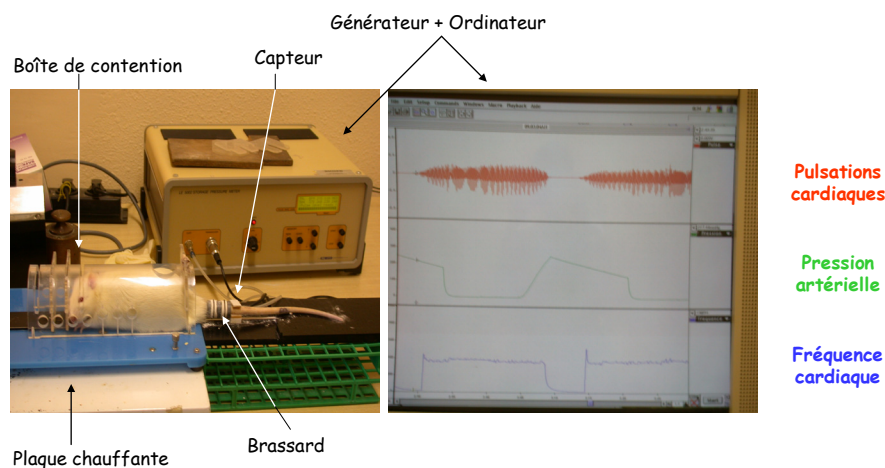


Figure 45 : Appareillage pour la prise de pression artérielle chez le rat par pléthysmographie non invasive.

1.2 Hypertension portale et cirrhose biliaire : ligature de la voie biliaire commune (publication 3) :

1.2.1. Animaux, conditions d'élevage et chirurgie:

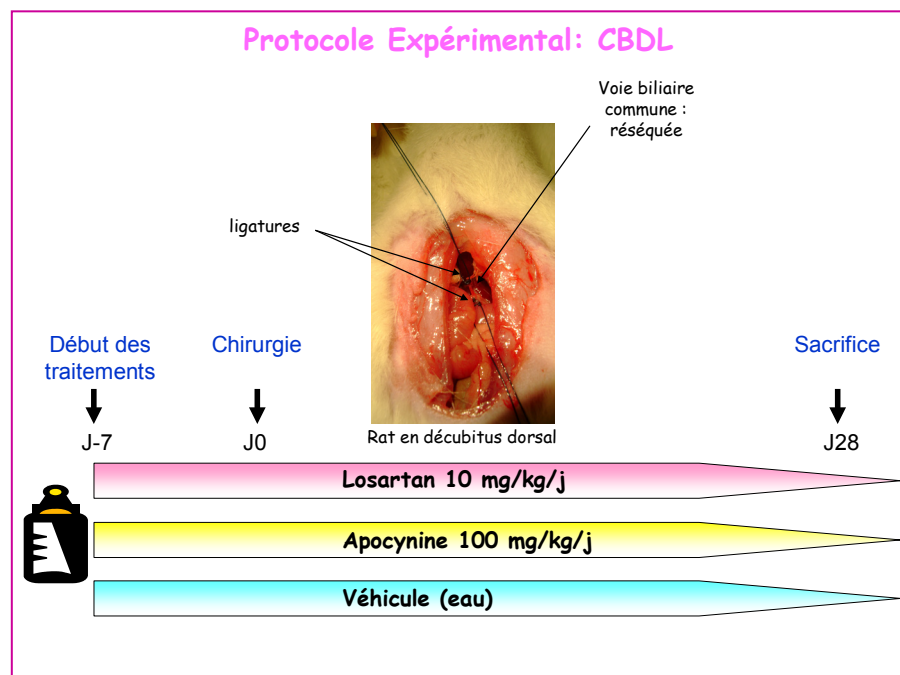
34 rats Wistar mâles âgés de 12-14 semaines au sacrifice sont anesthésiés en intrapéritonéale par un mélange de kétamine (80 mg/kg) et xylasine (4 mg/kg). Nous avons ici

utilisé un anesthésique accompagné d'un antalgique car il s'agit d'une chirurgie abdominale lourde pour l'animal. La cirrhose biliaire est induite par ligature de la voie biliaire commune (CBDL, *ligation of the common bile duct*). Après laparotomie, le canal biliaire est isolé, doublement ligaturé et coupé entre ces deux ligatures. Les animaux contrôles (Sham) ont subis une laparotomie, un isolement du canal biliaire sans ligature. Les animaux sont surveillés après la chirurgie et sont sacrifiés 4 semaines après la chirurgie (figure 46).

1.2.2. Protocole expérimental :

Les animaux sont répartis en 6 groupes: 7 rats CBDL et 5 rats Sham sont traités une semaine avant la chirurgie avec de l'apocynine (100 mg/kg/j ; inhibiteur de la formation des ROS par la NADPH oxydase, antioxydant) ainsi que les 4 semaines suivantes ; 7 rats CBDL et 5 rats Sham sont traités avec du Losartan (10 mg/kg/j ; antagoniste des récepteurs AT1 à l'Ang II) selon le même protocole que précédemment ; 5 rats CBDL et 5 rats Sham vont recevoir uniquement le véhicule (eau) durant toute la durée du protocole. Les animaux sont pesés toutes les semaines pour ajuster les traitements une fois par semaine (figure 46).

Figure 46 :
Protocole expérimental pour l'induction d'une cirrhose biliaire et d'une hypertension portale *in vivo* chez le rat par ligature de la voie biliaire commune (CBDL).



1.3. Vieillessement (publications 4 et 5) :

1.3.1. Animaux, conditions d'élevage et protocoles expérimentaux :

Cette étude a porté sur deux types de traitements, l'un **préventif** et l'autre **curatif** avec d'une part de l'apocynine (100 mg/kg/j) ou bien les polyphénols du vin rouge (RWP 25, 75 ou 100

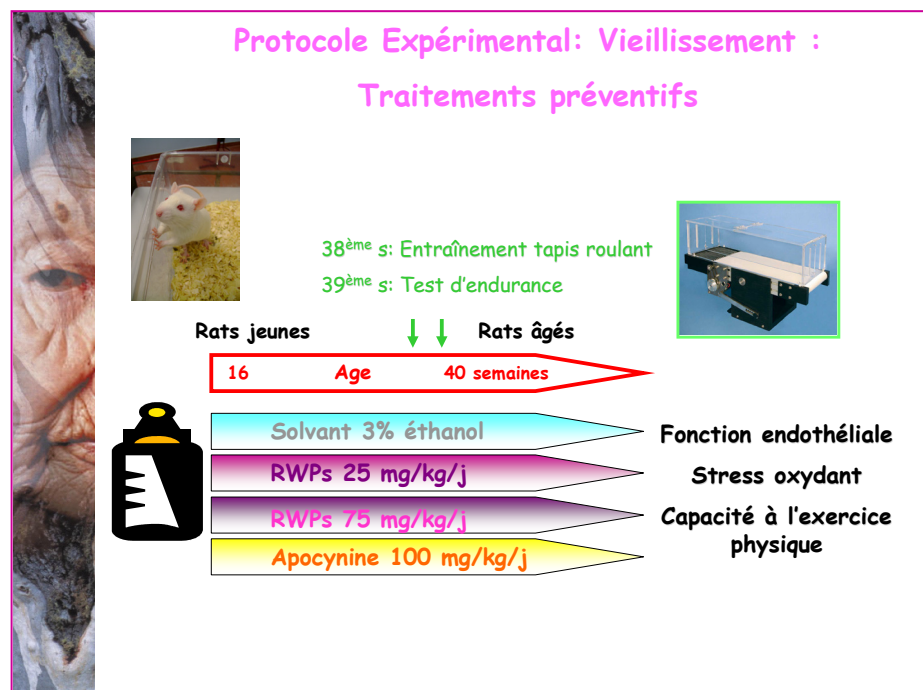
mg/kg/j). Pour ces deux études, les animaux sont pesés toutes les semaines afin de suivre leur prise de poids et de pouvoir ajuster les traitements, les biberons contenant des polyphénols sont changés tous les 2-3 jours à cause de leur photosensibilité et leur instabilité, ceux contenant l'apocynine sont changés une fois par semaine. Les animaux sont considérés comme sédentaire vu leur manque d'activité physique. Dans l'étude préventive, tous les animaux sont soumis à un test d'endurance une semaine avant leur sacrifice. Ce test, réalisé une seule fois, permet de déterminer la capacité des animaux à courir sur un tapis roulant, ceci permettant de révéler la répercussion du vieillissement sur les aptitudes physiques des animaux. Ce test nécessite une semaine préalable d'apprentissage de la tâche.

Une étude préliminaire réalisée avec 3 groupes d'animaux : 9 rats âgés de 12-14 semaines, 9 rats de 20 semaines et 7 rats de 40 semaines a permis de mettre en évidence la présence d'une dysfonction endothéliale (dès 20 semaines) avant de réaliser les études préventive et curative. Les rats âgés de 12-14 semaines servaient de contrôle « jeune » pour ces deux études.

1.3.2. Etude préventive :

4 groupes de 12 rats sont utilisés: le 1^{er} reçoit le solvant (3% éthanol, pH 3,3; rats contrôles); le 2^{ème} reçoit les polyphénols du vin rouge à 25 mg/kg/j (3% éthanol, pH 3,3; rats RWPs25); le 3^{ème} reçoit les polyphénols du vin rouge à 75 mg/kg/j (3% éthanol, pH 3,3; rats RWPs75) et le 4^{ème} reçoit de l'apocynine à 100 mg/kg/j (3% éthanol, pH 3,3; rats apocynine). Les traitements commencent à l'âge de 16 semaines jusqu'au sacrifice à 40 semaines (figure 47).

Figure 47 :
Protocole
expérimental
pour l'étude des
effets
préventifs des
polyphénols du
vin rouge sur le
vieillessement *in vivo* chez le rat.



1.3.3. Etude curative :

3 groupes de 4 à 6 rats âgés sont utilisés : le 1^{er} reçoit le solvant (3% éthanol, pH 3,3; rats contrôles); le 2^{ème} reçoit les polyphénols du vin rouge à 100 mg/kg/j (3% éthanol, pH 3,3; rats RWPs100); le 3^{ème} reçoit de l'apocynine à 100 mg/kg/j (3% éthanol, pH 3,3; rats apocynine). Les traitements commencent à l'âge de 50 semaines jusqu'au sacrifice à 55 semaines (figure 48).

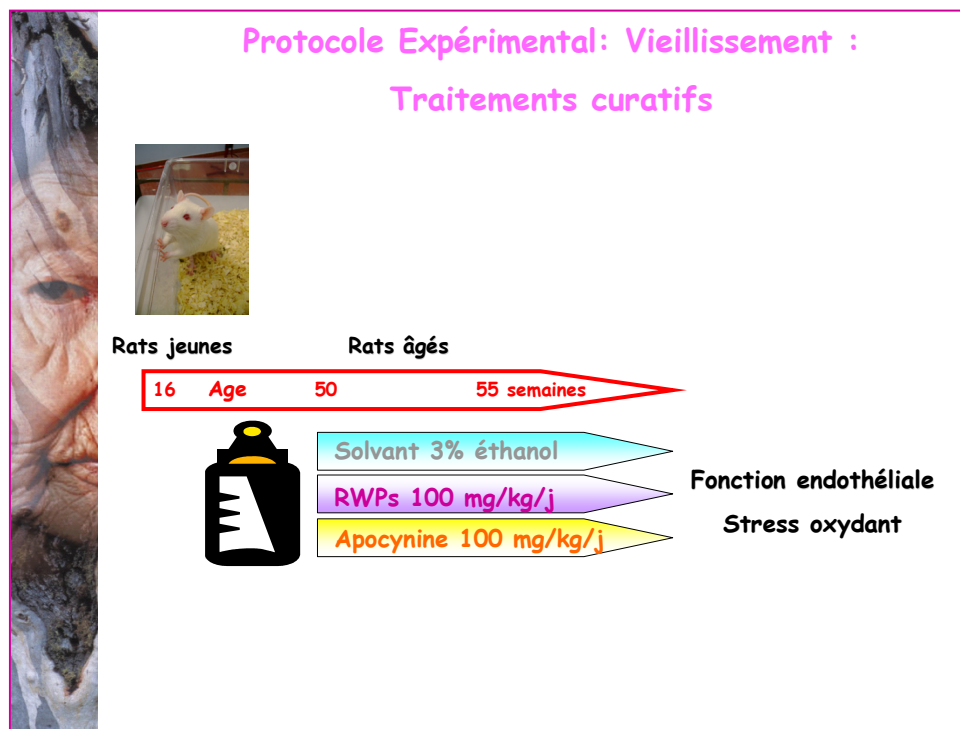


Figure 48 : Protocole expérimental pour l'étude des effets curatifs des polyphénols du vin rouge sur le vieillissement *in vivo* chez le rat.

1.3.4. Composition du vin et de l'extrait de vin de Corbières :

Le vin est constitué d'une solution hydro-alcoolique acide. Il contient en majorité de l'eau, 80 à 90 % et de l'éthanol qui permet entre autres la solubilisation des polyphénols. Il contient ensuite par ordre d'importance décroissante des alcools, des acides organiques, des polyols, des composés azotés et des polyphénols (0,5 à 2,4 %). Les acides organiques sont pour leurs parts présents à des taux de 3 à 10 g/L. La teneur en composés aromatiques comme les alcools supérieurs, les acides volatils et les esters d'acides gras est de l'ordre de 1 g/L. La quantité de composés polyphénoliques présents dans le vin est non négligeable, et elle représente en moyenne 2 grammes par litre de vin rouge. La répartition exacte des différents composés phénoliques est variable selon les vins, les vins rouges contenant d'avantage de polyphénols que les vins blancs.

Composition de l'extrait de polyphénols de vin rouge

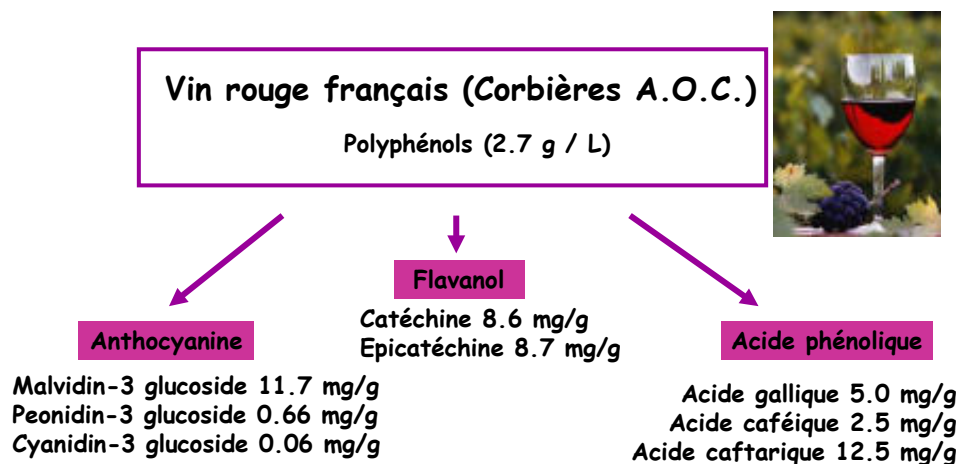


Figure 49 : Composition de l'extrait de polyphénols du vin rouge utilisé.

La dose administrée de 100 mg/kg/jour aux rats correspond à une consommation modérée de vin rouge correspondant à 2 verres de vin par repas pour un homme de 80 kg. Cela représente un apport de 1,46 g de composés polyphénoliques totaux par jour.

1.4 Sacrifices et prélèvements :

1.4.1. Prélèvements sanguins :

Les animaux sont anesthésiés avec du pentobarbital de sodium à 50 mg/kg en i.p. ou un mélange kétamine (80 mg/kg) / xylazine (4 mg/kg). Ils sont placés en décubitus dorsal, après une large incision médiane xypho-pubienne, la bifurcation aorto-iliaque est dégagée des tissus graisseux et conjonctifs environnants. 2-3 mL de sang sont prélevés, centrifugés pendant 20 minutes à 3000 tours/min et le plasma est ainsi recueilli, congelé à -80°C dans des tubes EDTA (Bexon Dickinson®) afin de réaliser des dosages de rénine angiotensine plasmatique, de nitrites, nitrates et d'hormones.

1.4.2. Prélèvements d'organes :

Selon les études, le mésentère ou l'artère pulmonaire sont prélevés, isolés et placés dans une solution physiologique de Krebs à 37° (pH 7,4 ; de composition en mM : 118 NaCl ; 4,7 KCl ; 1,18 KH₂PO₄ ; 1,17 MgSO₄ ; 1,25 CaCl₂ ; 25 NaHCO₂, 11 Glucose), avant d'être nettoyés délicatement de tous tissus conjonctifs et adipeux sous une loupe binoculaire, afin de préserver l'endothélium. Des anneaux de 2-3 mm sont coupés pour des mesures de réactivité vasculaire, le reste des artères ainsi que les organes tels que le foie, les reins, les poumons sont congelés soit à sec soit dans une colle physiologique (Tissue-Tek® O.C.T) dans l'azote liquide et conservé à -80°C pour les expériences d'immunomarquages et pour des études quantitatives par RT-PCR et Western-blot. Pour les organes destinés à l'histochimie, ils sont placés immédiatement après dissection dans des cassettes d'inclusion pour être ensuite fixés dans une solution de Bouin (mélange de formaline, acide picrique et d'acide acétique) pendant 24 heures à température ambiante.

Partie 2: ETUDE DE LA FONCTION ENDOTHELIALE

PARTIE 2 : ETUDE DE LA FONCTION ENDOTHELIALE : LA REACTIVITE VASCULAIRE EN CHAMBRES A ORGANES ISOLES

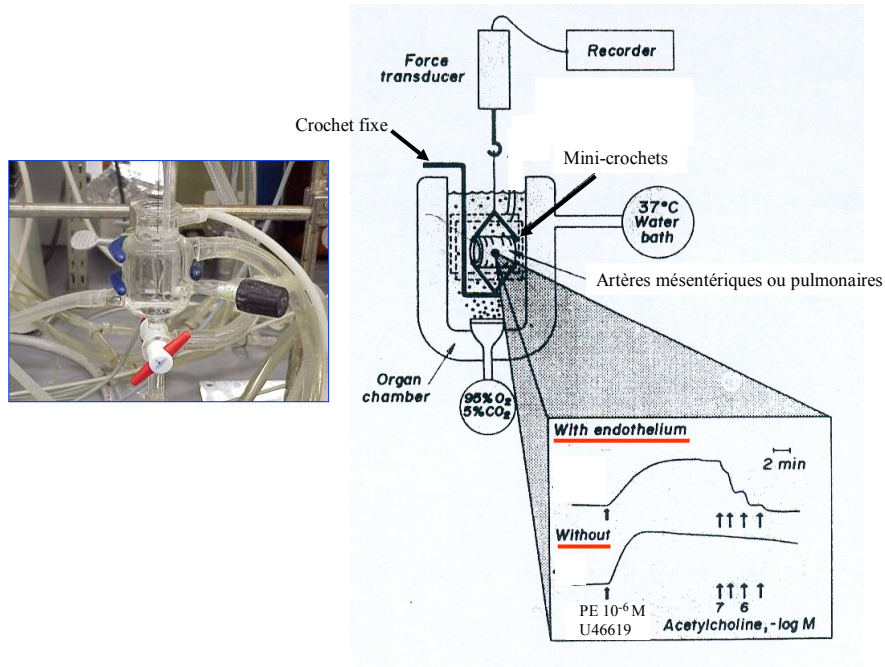


Figure 50 : Représentation et fonctionnement des chambres à organes isolés (Lüscher et Vanhoutte, CRC Press, 1990).

Les anneaux sont montés entre deux mini crochets eux-mêmes montés sur deux crochets, le premier étant fixe et le second relié à un capteur de tension lui-même relié à un amplificateur et à un ordinateur permettant la visualisation et l'enregistrement des variations de tensions isométriques. Le tout est placé dans des cuves à organes isolés contenant 10 ml de solution de Krebs bicarbonate à 37°C et oxygénée par un mélange 95% O₂ et 5% CO₂. Après avoir équilibré les anneaux pendant 45 minutes à une tension de 1g les anneaux d'artères mésentériques et pulmonaires sont contractés de façon répétitive avec une solution de KCl (80 mM), permettant par une dépolarisation maximale de tester la réactivité du muscle lisse vasculaire. Après obtention de l'effet maximal, trois lavages successifs sont effectués. Afin de tester l'intégrité de l'endothélium, les anneaux sont contractés à la phényléphrine (1 μM) ou avec le U46619 (un analogue du TXA₂) et au plateau de contraction l'acétylcholine (1 μM) est ensuite ajoutée. Lorsque l'endothélium est présent et surtout fonctionnel alors l'acétylcholine va induire une relaxation des anneaux. En revanche, lorsque pour les besoins, expérimentaux on enlève

mécaniquement l'endothélium ou bien dans le cas de pathologies associées à une dysfonction endothéliale, cette relaxation sera partiellement ou totalement inhibée. Après trois lavages successifs, suit une phase de stabilisation de 45 minutes.

* Durant cette phase différents inhibiteurs sont ajoutés au Krebs afin d'étudier l'implication des différentes composantes de la relaxation :

a) de l'indométacine (10^{-5} M) afin de s'affranchir de la production de prostanoïdes vasoactifs, notamment de la prostacycline : révélant la « **composante NO+EDHF** »

b) d'une combinaison Indométacine + N^w-nitro-L-arginine (L-NA, 10^{-4} M) un inhibiteur de la NO synthase : révélant la « **composante EDHF** » seule

c) d'une combinaison Indométacine + charybdotoxine (CTX, 10^{-7} M) + apamine (APA, 10^{-7} M) deux inhibiteurs des canaux potassiques calcium-dépendants de moyenne et de faible conductance (IK_{Ca} et SK_{Ca} respectivement) : révélant la « **composante NO** » seule

d) d'une combinaison de tous les inhibiteurs

e) ainsi qu'une condition contrôle ne contenant aucun inhibiteur.

* Pour caractériser différentes voies d'activation des facteurs endothéliaux relaxants nous avons utilisés différents inhibiteurs :

a) un peptide mimétique des jonctions communicantes gap, l'**acide 18α glycyrrhétinique** (18 α-GA) est utilisé afin d'étudier l'implication des jonctions gap dans la réponse relaxante endothélium-dépendante médiée par EDHF

b) un analogue perméant membranaire de la superoxyde dismutase le **MnTMPyP** est utilisé afin de déterminer le rôle des anions superoxyde

c) un inhibiteur de la voie PI3-kinase/Akt le **Wortmanine** est utilisé afin de déterminer l'implication de cette voie notamment dans la synthèse du facteur EDHF par les polyphénols du vin rouge (voir paragraphe 4.2.2.1).

Après 45 minutes les anneaux sont contractés avec la phényléphrine ou au U46619 avant d'appliquer une gamme croissante et cumulative d'acétylcholine (ACh, 10^{-10} M à 10^{-5} M) afin de déterminer sa capacité à relâcher les artères saines et pathologiques. Les anneaux sont à nouveaux lavés avec du Krebs, remis en présence d'inhibiteurs pendant 45 minutes, re-contractés à la phényléphrine ou au U46619 avant l'application d'une gamme croissante et cumulative de

polyphénols du vin rouge (RWPs : 10^{-4} g/L à 10^{-1} g/L) afin de tester leur capacité à induire une relaxation dans les artères saines ou pathologiques.

Afin de pouvoir tester l'intégrité du muscle lisse vasculaire deux approches sont utilisées sur des anneaux dépourvus d'endothélium de manière mécanique. La 1^{ère} consiste à réaliser une gamme de nitroprussiate de sodium (donneur exogène de NO, SNP 10^{-10} M- 10^{-5} M) pour tester la capacité du muscle à se relâcher tout en s'affranchissant de la synthèse endothéliale de NO ; la 2nde est une gamme de Levromakalime (activateur de canaux potassiques dépendant de l'ATP, LEV 10^{-10} M- 10^{-5} M) pour vérifier que les cellules musculaires lisses vasculaires n'ont pas perdu la capacité à s'hyperpolariser et par conséquent à se relâcher, tout en s'affranchissant de la formation endothéliale d'EDHF. Ces deux tests sont nécessaires avant de pouvoir conclure à la présence d'une dysfonction au niveau endothéliale dans le cadre des études de pathologies.

Partie 3:
ANALYSES BIOCHIMIQUES ET
STATISTIQUES

3.1 Immunomarquages et microscopie confocale :

Des sections transversales de 7 à 14 μm d'épaisseur sont obtenus à l'aide d'un cryostat à -20°C puis récoltées sur des lames silanisées. Les lames sont ensuite placées à température ambiante dans une chambre humide (20 min) et fixées avec du paraformaldéhyde à 4% (30 min) puis lavées avec du PBS (*phosphate buffered saline*). Les différents tampons de blocage (5% sérum, 10% lait) sont appliqués 1 à 2 heures, puis les lames lavés pour appliquer les différents anticorps primaires pour une nuit à 4°C en chambre humide. Les anti-corps secondaires sont appliqués durant 2 heures à température ambiante à l'abri de la lumière, après 3 lavages successifs au PBS1x. Les sections sont montées avec du Vectashield et examinées avec un microscope confocal (1024 MRC, Biorad) avec différents objectifs (Nikon, Tokyo, Japon). Après l'excitation à 488 nm avec un Laser Krypton/Argon, le signal d'émission est enregistré à l'aide d'un filtre 515-565 nm. Les quantifications sont réalisées avec le logiciel *Sharp 2000*, et sont exprimés en pourcentage de fluorescence par rapport au contrôle.

3.2 Mesures de la formation d'espèces réactives de l'oxygène :

Des sections transversales de 25 μm d'épaisseur sont récoltées sur les lames silanisées à l'aide du cryostat à -20°C à partir des segments d'artères congelés. Les lames sont ensuite placées à température ambiante dans une chambre humide (20 min). La sonde fluorescente dihydroéthidine (DHE) à $2,5 \cdot 10^{-6}$ M est appliquée durant 30 min à 37°C .

Afin de caractériser la nature des ROS nous avons utilisé différents inhibiteurs, avec un temps de préincubations de 30 minutes, avant l'application de la DHE :

- le MnTMPyP à 10^{-4} M, un analogue perméant membranaire de la superoxyde dismutase, permet de mettre en évidence la présence d'anions superoxydes
- la PEG-Catalase, un analogue perméant membranaire de la catalase, permet de mettre en évidence la présence de peroxyde d'hydrogène

Afin de caractériser les sources potentielles des ROS nous avons utilisé différents inhibiteurs 30 minutes avant et durant l'application de la DHE :

- le diphénylèneiodonium, DPI, un inhibiteur non spécifique des enzymes à flavines, permettant de mettre en évidence le rôle de la NADPH oxydase
- l'apocynine, inhibiteur de la NADPH oxydase permettra de confirmer l'implication de celle-ci dans la formation des ROS
- le L-NA, inhibiteur de la NOS permettra aussi de confirmer l'implication de cette enzyme dans la formation des ROS.

Après lavages, les lames sont montées avec du *Vectashield*[®] et examinées avec un microscope confocal. L'excitation de l'échantillon est réalisée à 488 nm avec un laser Krypton/Argon et le signal d'émission est enregistré à l'aide d'un filtre 565-610 nm. Les quantifications sont réalisées avec le logiciel *Sharp 2000* et les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence par rapport au contrôle.

3.3 Immunohistochimie :

Dans le cadre de l'étude de l'hypertension portale associée à une cirrhose biliaire, nous avons réalisé des immunohistomarquages des canaux biliaires, pour déterminer la densité biliaire au niveau du foie (marqueur de cirrhose) et du CD31 (marqueurs spécifiques des cellules endothéliales, permettant de localiser les vaisseaux sanguins). Les organes prélevés sont fixés dans des cassettes avec du boiun. Les coupes de 5 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome et transférées sur des lames gélatinées et séchées avant utilisation.

L'activité peroxydase endogène est inhibée avec une solution à 70% de méthanol et 3% de peroxyde d'hydrogène. Puis les sites non spécifiques sont bloqués avec une solution de sérum à 5% pendant une heure à température ambiante. L'anticorps primaire est incubé toute la nuit à 4°C. Après lavage l'anticorps secondaire biotinylé est ajouté pendant une heure à température ambiante. Le complexe anticorps est révélé par l'ajout du substrat de la peroxydase qui transforme son substrat en un chromogène marron.

Les marquages sont complétés par une coloration à l'hématoxyline/éosine, une coloration de routine pour les coupes paraffinées. Les noyaux sont colorés en violet, tandis que le cytoplasme, les muscles, les fibres de collagène et les érythrocytes sont colorés en rose.

3.4 Mesure de l'activité rénine-plasmatique :

L'activité rénine plasmatique a été mesurée par radioimmunoessai en déterminant le taux d'angiotensine I produite dans le plasma en 30 minutes à 37°C en présence de 8-hydroxyquinoline.

3.5 Analyses statistiques :

Toutes les résultats sont représentés en valeurs moyennes \pm l'écart standard à la moyenne (SEM). L'analyse statistique consiste en une analyse de la variance (ANOVA) suivi d'un test de Fischer. La différence entre deux groupes est déterminée par le test t de Student pour des valeurs appariées ou non-appariées. Une valeur de $P \leq 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

Objectifs des études expérimentales

Nous avons vu à travers ce travail bibliographique que la fonction endothéliale est au cœur de la recherche sur les pathologies cardiovasculaires. Il est donc indispensable de connaître les mécanismes de régulation du tonus vasculaire afin de mieux comprendre les états pathologiques liés à une dysfonction endothéliale.

Ainsi l'objectif général de ce travail de thèse a été d'étudier la fonction endothéliale dans différents modèles expérimentaux de pathologies cardiovasculaires chez l'animal et plus particulièrement d'analyser le rôle du stress oxydant dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle, du syndrome hépatopulmonaire et du vieillissement « naturel ».

Nous avons vu à l'aide du chapitre « approches expérimentales » les différents modèles animaux et les techniques utilisées afin de répondre aux objectifs plus spécifiques :

- 1) déterminer s'il y avait ou non présence d'une dysfonction endothéliale dans les modèles animaux d'hypertension artérielle, de SHP, de vieillissement physiologique dans l'artère mésentérique de rats ;
- 2) déterminer les caractéristiques et les mécanismes sous jacents, notamment au niveau de la formation des facteurs vasorelaxants NO et EDHF;
- 3) mettre en évidence le rôle primordial du stress oxydant dans la dysfonction endothéliale.

Nous avons vu à travers la dernière partie de la bibliographie que les polyphénols végétaux possèdent un potentiel thérapeutique considérable dans le domaine cardiovasculaire. Leurs effets bénéfiques ont été largement décrits depuis ces dix dernières années aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Les études épidémiologiques ont joué un rôle important dans la découverte des propriétés protectrices des polyphénols. Dans la dernière partie de mon doctorat je me suis attachée à déterminer 1) si les polyphénols du vin rouge étaient aussi capables d'induire des relaxations endothélium-dépendantes dans l'artère mésentérique de rats sains et pathologiques ; 2) dans le cadre du vieillissement naturel, si les polyphénols du vin rouge étaient capables de prévenir l'apparition d'une dysfonction endothéliale et / ou de l'améliorer chez les animaux âgés et de comprendre les mécanismes impliqués.

Résultats Expérimentaux

Publications 1 et 2:

Etude de la fonction endothéliale dans
un modèle expérimental d'hypertension
artérielle *in vivo* chez le rat

Publication 1 :

Angiotensin II-induced Hypertension is associated with a selective inhibition of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-mediated responses in the rat mesenteric artery.

The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 328:478-486, 2009

Publication 2 :

Small and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels are impaired in small mesenteric arteries from rat infused with Angiotensin II.

En préparation, 2009

Dans les conditions physiologiques normales, les cellules endothéliales contribuent au maintien de l'homéostasie vasculaire par la formation de puissants facteurs vasodilatateurs tels que le NO, la PGI₂ et EDHF. Par le biais de ces facteurs, les cellules endothéliales maintiennent une surface non thrombogénique pour le flux sanguin, contribuent au contrôle de la prolifération des cellules musculaires lisses dans la paroi vasculaire et permettent la vasodilatation. Le NO reste le facteur vasoactif le plus étudié et nous avons vu qu'à l'heure actuelle la nature d'EDHF ainsi que son mode d'action sont encore controversés. L'hyperpolarisation endothéliale semble être un pré requis pour l'hyperpolarisation et la relaxation des cellules musculaires lisses sous-jacentes dans la signalisation d'EDHF (Komori *et al.*, 1988 ; Nagao et Vanhoutte, 1992 ; Garland et McPherson, 1992 ; Doughty *et al.*, 1999 ; Ohashi *et al.*, 1999). La transmission de l'hyperpolarisation nécessiterait l'implication des jonctions gap myoendothéliales composées de connexines (Cx37, Cx40 et Cx43). De plus, les canaux responsables de l'hyperpolarisation des cellules endothéliales sont des canaux potassiques dépendants du calcium de moyenne (IK_{Ca}) et faible conductance (SK_{Ca}), et sont activés par une augmentation de calcium intracellulaire stimulée par les agonistes vasodilatateurs (Ghisal et Morel, 2001). Dans pratiquement tous les vaisseaux, les réponses médiées par EDHF sont supprimées par une combinaison de deux toxines, la charybdotoxine et l'apamine, inhibant les canaux potassiques endothéliaux IK_{Ca} et SK_{Ca}, respectivement (Corriu *et al.*, 1996 ; Chataigneau *et al.*, 1998 a, b). La voie de signalisation EDHF

joue donc un rôle physiologique crucial en promouvant la vasodilatation des artères et artérioles (Shimokawa *et al.*, 1996 ; Kohler *et al.*, 2001), et apparaît comme étant un vasodilatateur majoritaire dans les artères coronaires et les artères de résistance (Suzuki et Chen, 1990 ; Busse *et al.*, 2002), alors que sa participation est faible dans les vaisseaux de conductance. Les mécanismes vasodilatateurs varient en fonction du lit vasculaire, et en fonction du degré d'implication des différents facteurs endothéliaux dans un même lit vasculaire. Dans l'artère coronaire (Félétou et Vanhoutte, 1988, 1989) et dans l'artère mésentérique de rat (Shimokawa *et al.*, 1996) il a été mis en évidence l'augmentation de l'importance du facteur EDHF (par rapport au NO) dans les relaxations endothélium-dépendantes lorsque la taille du vaisseau est moins importante (proximale/distale). Sandow et Hill ont montré par microscopie électronique, un nombre plus conséquent de jonctions gap myoendothéliales (MEGJ) par cellules musculaires lisses dans l'artère mésentérique distale (3^{ème} ordre) de rat que dans la proximale (1^{er} ordre) (Sandow et Hill, 2000). La corrélation entre l'incidence des MEGJs et l'importance d'EDHF au lieu de NO pour les réponses vasodilatatrices suggère que les MEGJs permettent le couplage avec l'activité d'EDHF, couplage électrique ou le transfert de petites molécules (Sandow et Hill, 2000). Ces deux études montrent une réponse graduelle de la contribution d'EDHF par rapport au NO qui serait en partie due à l'augmentation des MEGJ.

Chez l'homme, l'hypertension est associée à un stress oxydant, à une diminution de l'activité antioxydante et à une capacité réduite de piéger les radicaux libres (Touyz, 2004). La vasodilatation endothélium-dépendante induite par le cisaillement « shear stress » et/ou par des outils pharmacologiques (acétylcholine, bradykinine, substance P) est diminuée dans l'artère brachiale, les coronaires, les vaisseaux sanguins rénaux et dans les lits microvasculaires des patients atteints d'hypertension essentielle et secondaire (Linder *et al.*, 1990 ; Panza *et al.*, 1990 ; Taddei *et al.*, 1993, 1995, 1997b, 2000). Seuls, chez les patients atteints d'hypertension essentielle, des inhibiteurs non-spécifiques des cyclooxygénases sont capables de restaurer partiellement les vasodilatations induites par l'acétylcholine dans l'artère brachiale, suggérant le relargage d'EDCFs (Taddei *et al.*, 1993, 1997a). Ces vasodilatations sont normalisées par la vitamine C au niveau de l'artère brachiale et dans la circulation coronarienne de patients atteints d'hypertension essentielle, indiquant que la formation de ROS est responsable de la diminution de la biodisponibilité du NO (Solzbach *et al.*, 1997; Taddei *et al.*, 1998). De plus, nous avons vu dans l'introduction de ce mémoire qu'il existait un lien étroit entre le SRAA, le stress oxydant et l'hypertension artérielle (Touyz et Schiffrin, 2004). Dans les artères mésentériques des rats

SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*), l'hyperpolarisation et la relaxation médiées par EDHF sont inhibées et les traitements avec des inhibiteurs du SRAA ou des antagonistes des récepteurs AT1 sont capables de restaurer d'une part l'hyperpolarisation et la relaxations, et d'autre part l'expression des connexines (Gustafsson *et al.*, 2003 ; Kansui *et al.*, 2004). Ces traitements antihypertenseurs permettent aussi une restauration du niveau d'expression des connexines Cx37, Cx40 et Cx43 dans les artères mésentériques de rats SHR similaire à celui des rats contrôles. Ces travaux suggèrent que la dysfonction endothéliale affectant la composante EDHF chez ces animaux pourrait s'expliquer par une altération de l'expression des connexines Cx37, Cx40 et Cx43 en réponses à l'angiotensine II.

Ainsi l'objectif de ce premier projet a été dans un premier temps de caractériser la nature d'EDHF dans les artères mésentériques de rats Wistar mâles en mettant en avant le rôle majeur des canaux potassiques endothéliaux IK_{Ca} et Sk_{Ca} ainsi que le rôle primordial des jonctions gap myoendothéliales dans la transmission de l'hyperpolarisation des cellules endothéliales aux cellules musculaires lisses vasculaires sous-jacentes. Nous avons aussi caractérisé différentes voies d'activation de la formation du facteur EDHF dans l'artère mésentérique de rats.

Le second objectif a été d'étudier les effets d'une administration chronique d'angiotensine II *in vivo* chez le rat, modèle validé dans notre laboratoire (Sarr *et al.*, 2006) d'une part sur les relaxations endothélium-dépendantes *ex vivo*, et d'autre part sur l'expression des canaux potassiques endothéliaux et des connexines. Les études réalisées dans notre laboratoire ont déjà mis en évidence la présence d'une dysfonction endothéliale au niveau de l'aorte de rat, caractérisée par d'une part par une diminution des relaxations médiées par le NO (Sarr *et al.*, 2006) et d'autre part par l'apparition du facteur contractant dérivé de l'endothélium EDCF (Kane *et al.*, 2009). En revanche, aucune donnée n'a été récoltée au niveau des artères de résistances et pourtant ces artères jouent un rôle important dans la régulation de la pression artérielle contrairement aux artères de conductance. C'est pourquoi la présente étude a été réalisée sur l'artère mésentérique principale de rats.

Ces deux études nous permettront de mieux comprendre 1) la nature et voies d'activation de la formation d'EDHF, 2) de déterminer s'il existe une dysfonction endothéliale au niveau de l'artère mésentérique de rats hypertendus, 3) de mieux comprendre la physiopathologie de cette pathologie, permettant ainsi d'offrir de nouveaux axes de recherche.

Signalement bibliographique ajouté par :

L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Angiotensin II-Induced Hypertension Is Associated with a Selective Inhibition of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Responses in the Rat Mesenteric Artery

Stéphanie DAL-ROS, Christian BRONNER, Christa SCHOTT, Modou O. KANE, Marta CHATAIGNEAU, Valerie B. SCHINI-KERTH and Thierry CHATAIGNEAU

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2009, Volume 328, N° 2, Pages 478-486

Copyright © 2009 by the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics

Publication n° 1 : p. 121-129

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1124/jpet.108.145326>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

Small and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels are improved in small mesenteric arteries from rat infused with Angiotensin II

Short title:

Stephanie DAL-ROS, Christian BRONNER, Christa SCHOTT, Modou O. KANE, Valerie B. SCHINI-KERTH, Thierry CHATAIGNEAU

UMR CNRS 7213, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France

Address for correspondence:

Schini-Kerth Valérie B.

UMR CNRS 7213

Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie

Université de Strasbourg

Faculté de Pharmacie

74, route du Rhin

BP 60024

67401 ILLKIRCH, France

Phone: +33 3 90 24 41 27 ; Fax: +33 3 90 24 43 13

Email: valerie.schini-kerth@pharma.u-strasbg.fr

WordCount: calcium-activated potassium channels, endothelium, angiotensin II, EDHF, oxidative stress

Abstract:

Introduction: Endothelial dysfunction, a hallmark of most types of cardiovascular diseases is mostly due to a reduced bioavailability of endothelium-derived nitric oxide (NO) and often also to a reduced endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-mediated relaxation. The objective of the present study was (1) to determine the role of endothelial SK_{Ca} and IK_{Ca} in EDHF-mediated responses in the rat mesenteric artery, and (2) to examine whether these responses are altered in angiotensin II-induced hypertension.

Methods: Male Wistar rats were treated with angiotensin II (Ang II, 0.4 mg/kg/day) during 21 days using osmotic minipumps. Arterial pressure was measured by tail-cuff plethysmography. Reactivity of isolated mesenteric arteries was measured in organ chambers and the EDHF-mediated component of the relaxation was assessed in the presence of N^w-nitro-L-arginine and indomethacin. The expression level of IK_{Ca} and SK_{Ca}, eNOS, NADPH oxidase were assessed by immunohistochemistry in mesenteric arteries.

Results: In mesenteric arteries from control rats, EDHF-mediated relaxations to acetylcholine were abolished by charybdotoxin (CTX) or TRAM-34 plus apamin (APA) (blockers of IK_{Ca} and SK_{Ca}, respectively). Ang II increased significantly blood pressure. In isolated mesenteric arteries from Ang II-treated rats, EDHF-mediated responses to acetylcholine were significantly reduced whereas the global and the NO-mediated (assessed in the presence of indomethacin, CTX+APA) relaxations were not affected. The expression of the SK_{Ca} and IK_{Ca} were significantly decreased, eNOS and NADPH oxidase expression are upregulated and associated with oxidative stress in mesenteric arteries from Ang II-treated rats.

Conclusion: These findings indicate that Ang II-induced hypertension is associated with blunted EDHF-mediated responses in the mesenteric artery most likely due to a reduced expression of SK_{Ca} and IK_{Ca} channels and oxidative stress.

Introduction:

The endothelium is a monocellular layer that covers all the inner surface of blood vessels, separating the circulating blood from the tissues. Far from being an inactive organ, the endothelium, through the release of various mediators, actively regulates vascular processes such as haemostasis and coagulation, vascular wall growth and angiogenesis, inflammation and vasomotor tone (Pries *et al.*, 2000). Endothelial cells secrete various substances, which can either facilitate contractile tone (endothelin, thromboxane, prostaglandins, isoprostanes, superoxide anions) or mediate relaxation mainly nitrite oxide (NO), prostacyclin (PGI₂), endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) (Furchgott *et al.*, 1989). EDHF has been observed in numerous blood vessels from different species, including the human (Urakami-Harasawa *et al.*, 1997) but its nature remain controversial. The most explanation for EDHF *in vitro* and *in vivo* in small vessels is that it arises from the activation of small- and intermediate- conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (SK_{Ca} and IK_{Ca} respectively) but not of large- conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (BK_{Ca}) in endothelial cells. The resulting endothelial hyperpolarization spread via myoendothelial gap junctions to lead in the EDHF attributed hyperpolarization and relaxation of the smooth muscle cells (Ohashi *et al.*, 1999). In fact, the toxins apamin (a selective inhibitor of the SK_{Ca} channel) (Castle *et al.*, 1999) and charybdotoxin (an inhibitor of the IK_{Ca}, BK_{Ca} channels and some voltage-dependent potassium channel K_v) (Garcia *et al.*, 1991), but not apamin and iberiotoxin (Garcia *et al.*, 1991) (a scorpion venom-derived peptides selective for BK_{Ca} channel) (Chataigneau *et al.*, 1998) inhibited EDHF-relaxation and -hyperpolarization.

Despite numerous studies indicating that EDHF is capable of evoking considerable relaxation in small vessels *in vitro*, an important consideration is whether EDHF is functionally important *in vivo* (Urakami-Harasawa *et al.*, 1997). Cardiovascular diseases such as atherosclerosis and hypertension are characterized by an endothelial dysfunction which is an

impairment of the endothelium-dependent relaxation in both animals and humans (Mombouli *et al.*, 1999). Moreover, EDHF responses are diminished and abolished in some diseases including preclampsia, type I diabetes (streptozotocin-induced diabetes in rats), type II diabetes (obese Zucker rats) and in various models of hypertensive rats (spontaneously hypertensive rats, SHR (Onaka *et al.*, 1998) and angiotensin II-induced hypertension (Dal-Ros *et al.*, 2009). Particular interest in endothelial SK_{Ca} channel has been heightened by recent observations that the vascular dysfunction resulting from balloon catheter injury (Kohler *et al.*, 2001) and cirrhosis (Barriere *et al.*, 2001) are associated with changes in endothelial SK_{Ca} (SK3) expression. Moreover, with the use of transgenic mouse (SK3^{T/T}) in which SK3 channels expression levels can be manipulated with dietary doxycycline, the authors indicate that the suppression of endothelial SK3 channel with doxycycline increased pressure-induced tone. Endothelial SK3 channels exert a profound, tonic hyperpolarizing influence in resistance arteries and suggest that the level of SK3 channels expression in endothelial cells is a key of vascular tone and blood pressure (Taylor *et al.*, 2003). Similarly, disruption of KCa_{3.1} gene (IK_{Ca}) abolished endothelial IK_{Ca} currents and significantly diminished overall current through IK_{Ca} channels. As a consequence, endothelial and smooth muscle hyperpolarization in response to acetylcholine was reduced, as well as EDHF-mediated dilatation in conducting and resistance vessels. In addition, systemic blood pressure was elevated in KCa_{3.1}^{-/-} mice (Si *et al.*, 2006) For the first time, the authors show that target disruption of a crucial endothelial component of EDHF-signalling pathway, i.e, IK_{Ca} channels, has an impact on systemic blood pressure regulation. All together, these two approach suggest that IK_{Ca} and SK_{Ca} channels contribute to endothelial hyperpolarization and the lack of each one is not compensated for by a higher activity and/or expression level of the other (Taylor *et al.*, 2003 ; Si *et al.*, 2006). Although endothelium dysfunction occurs in many different diseases processes, oxidative stress can be identified as a common denominator (Griendling *et al.*, 2003 ; Griendling and

Fitzgerald, 2003). Reactive oxygen species (ROS) play a crucial role in vascular physiology and pathophysiology, in particular superoxide anions, which reduced the bioavailability of nitric oxide (NO) (Rajagopalan *et al.*, 1996 ; Miller *et al.*, 1998 ; Pagano *et al.*, 1997). Gutterman and collaborators review the effects of ROS on potassium channels function in the vasculature. These effects on K_{Ca} responses depend on the specific K_{Ca} and the ROS species studied. Moreover, the mechanisms by which K_{Ca} activity is altered by redox state are not well understood. There are numerous potential ways oxidative or nitrosative stress can influence K_{Ca} channels activity (Gutterman *et al.*, 2005). Altogether, these observations strongly suggest that there is a close association between altered small- and intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels (IK_{Ca} and SK_{Ca} respectively) expression in the arterial wall and hypertension-induced endothelial dysfunction and oxidative stress production. However, up to now, a clear demonstration of this hypothesis on vascular IK_{Ca} and SK_{Ca} channels expression is still missing. Therefore, our study aimed to determine whether or not there is a relationship between experimental hypertension-induced by Angiotensin II treatment, altered EDHF-mediated responses and modification of IK_{Ca} and SK_{Ca} channels expression in the arterial wall.

Methods

In vivo treatment of rats with angiotensin II

This study has been approved by the local ethics committee of animal experimentation (CREMEAS).

Male Wistar rats (12 weeks-old) were anesthetized with intraperitoneal administration of ketamine (80 mg/kg) and xylamine (10 mg/kg). A 1 cm-long incision was made in the midscapular region and an osmotic minipump (Alzet, model 2004) was implanted. Angiotensin II, contained in the osmotic minipumps, was dissolved in 0.15 mol/L NaCl

containing 0.01 N acetic acid as previously described (Sarr *et al.*, 2006). The infusion rate was 0.4 mg/kg per day. Control rats were age-matched animals which underwent an identical surgical procedure without pump implantation. After 21 days of angiotensin II administration, rats were sacrificed and thereafter blood was taken into EDTA-containing tubes from the abdominal aorta. Blood was centrifuged at 4°C for 10 min at 2,000 g. Plasma samples were then frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before determination of the plasma renin activity. The main superior mesenteric artery was excised and bathed in Krebs bicarbonate solution (in mmol/L: NaCl 119, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.18, MgSO₄ 1.18, CaCl₂ 1.25, NaHCO₃ 25 and D-glucose 11, pH 7.4, 37°C) for dissection.

Blood pressure measurement

Systolic blood pressure and heart rate were measured in both conscious control rats and angiotensin II-treated rats by tail-cuff plethysmography connected to a computerized system (LE 5002[®], BIOSEB, Chaville France). The rats were trained in the blood pressure device to accustom them to the procedure for 3 days before the osmotic minipump implantation. On each day of blood pressure determination, 10 measurements were obtained and averaged for each rat.

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 mmol/L). Angiotensin I was measured by radioimmunoassay as previously described [Ingers *et al.*, 2002].

Vascular reactivity studies

The main superior mesenteric artery was cleaned of connective tissue and cut into rings (2-3 mm in length). Rings were suspended in organ baths containing oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) Krebs bicarbonate solution for the determination of changes in isometric tension. All the protocol is previous described (Dal-Ros *et al.*, 2009). Briefly, the rings were stretched step by step until an optimal resting tension of 1 g was reached and then allowed to equilibrate for at least 60 min. After the equilibration period, the rings were exposed to high K⁺-containing KR bicarbonate solution (80 mmol/L) until reproducible contractile responses were obtained. Thereafter, the rings were precontracted with phenylephrine (PE) (1 μmol/L) to about 80% of the maximal contraction by high K⁺ solution before addition of acetylcholine (ACh) (1 μmol/L) to check the presence of a functional endothelium. After washout and a further 30-min equilibration period, rings were again contracted with PE before the construction of a concentration-relaxation curve to either ACh (0.1 nmol/L to 10 μmol/L), red wine polyphenols (RWPs, 0.1 to 300 μg/mL), sodium nitroprusside (an exogenous NO donor, 0.1 nmol/L to 10 μmol/L) or levcromakalim (an ATP-sensitive K⁺ channel opener, 0.1 nmol/L to 10 μmol/L). Sodium nitroprusside- and levcromakalim-induced relaxations were examined in endothelium-denuded rings of mesenteric artery. In some experiments, rings were exposed to an inhibitor for 30 min before contraction with PE. The global relaxation was defined as the relaxation obtained in the absence of inhibitors. The NO-mediated component of relaxation was recorded in the presence of indomethacin (10 μmol/L) and charybdotoxin (CTX) plus apamin (APA) (100 nmol/L each) to inhibit the formation of prostanoids and EDHF, respectively. The EDHF-mediated component of relaxation was studied in the presence of indomethacin (10 μmol/L) and N^ω-nitro-L-arginine (L-NA, 100 μmol/L) to inhibit the formation of prostanoids and NO, respectively. Relaxations were expressed as percentage of the reversal of the contraction induced by phenylephrine.

Membrane potential measurement

Segments of the main superior mesenteric artery were slit open longitudinally and pinned to the sylgard base of a heated (37°C) organ chamber with the luminal side (endothelial layer) upward and superfused (5 mL/min) with heated (37°C) Krebs bicarbonate solution containing indomethacin (10 µmol/L) and N^o-nitro-L-arginine (100 µmol/L) to rule out the formation of vasoactive prostanoids and NO, respectively. The membrane potential of smooth muscle cells was recorded with glass capillary microelectrodes (tip resistance of 40 to 80 MΩ) filled with KCl (3 mol/L) and connected to the headstage of a high impedance amplifier (intra 767, World Precision Instruments, Sarasota, Florida) as described previously (Chataigneau *et al.*, 1998); an Ag/AgCl pellet, in contact with the bathing solution and directly connected to the amplifier, served as the reference electrode. Impalement of smooth muscle cells was performed from the intimal side and successful impalements were signaled by a sudden negative drop in potential from the baseline (zero potential reference) to a stable negative potential for at least two minutes. The preparations were superfused for at least 60 min prior to any recording. All drugs were applied by continuous superfusion.

Immunohistochemical determination of calcium dependent potassium channels, NADPH oxidase subunit and eNOS expression in the mesenteric arterial wall

The main mesenteric artery was removed, embedded in OCT compound and snap-frozen. Frozen arteries were cryosectioned at 14 µm. Sections were air-dried for 1 hour and stored at -80°C until use. The slides were first fixed with paraformaldehyde at 4%, washed and treated with 10% milk in PBS 2 hours or 5% goat serum in PBS containing 0.1% Triton X100 for 1 hour at room temperature to block any non-specific binding. The sections were then incubated overnight at 4°C with the antibodies directed against calcium dependent potassium channels, nox1 or p22phox and eNOS (dilution 1:100). Sections were then washed with PBS, incubated

with the secondary antibody (Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG or donkey anti-goat Alexa fluor 567-conjugated, dilution 1:200) diluted in the same buffer for 2h at room temperature in the dark, and washed before being mounted and cover slipped. For negative controls, primary antibodies were omitted. The samples were observed using a confocal laser-scanning microscope (Bio-Rad MRC-1024) equipped with a krypton/argon laser and fitted with the appropriate filters for the detection of Alexa 488 and 567 fluorescence. Quantification of connexin expression was performed using *Sharp 2000* software.

Determination of vascular reactive oxygen species formation

The redox-sensitive fluorescent dye dihydroethidine was used to evaluate in situ formation of reactive oxygen species by use of a method described by Sarr *et al.* (2006). Mesenteric rings (3 to 4 mm length) from the control group and the Ang II group, were embedded in OCT compound (Tissue-Tek), and frozen in nitrogen for cryostat sections. Dihydroethidine (2.5 μ M, Sigma) was applied onto 25 μ m unfixed cryosections of mesenteric arteries for 30 min at 37°C in a light-protected humidified chamber to determine the in situ ROS formation. In addition, rings were also incubated with inhibitors (PEG-Catalase (500UI/mL), MnTMPyP (100 μ mol/L), diphenyliodonium (30 μ mol/L) for 30 min at 37°C before add dihydroethidine in order to determine the nature and sources of ROS. Images were obtained with a BioRad MRC-1024 laser scanning confocal microscope.

Materials

Antibodies were purchased as indicated: Anti-KCa3.1 (Intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel 4, IKCa, SK4) and Anti-KCa2.3 (Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel 3, SK3) (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) and Alexa fluor-488 or fluor-567 labelled to goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Antibodies directed

against either nox-1 or p22phox NADPH oxidase proteins were obtained from Santa Cruz and eNOS from BD Biosciences.

Chemicals: apamin and charybdotoxin were obtained from Latoxan (Valence, France). N^o-nitro-L-arginine, indomethacin, acetylcholine, sodium nitroprusside, levcromakalim, wortmannin, 18 α -glycyrrhetic acid and angiotensin II acetate Human were all obtained from Sigma-Aldrich. Alzet osmotic minipumps were purchased from Charles River Laboratories International (Witmington, MA, USA).

Preparation of Red Wine Polyphenolic Extract. Red wine phenolic extract dry powder was obtained from French red wine (Corbières A.O.C.) and provided by Pr. M. Moutounet (Institut National de la Recherche Agronomique, Montpellier, France) and analyzed by Pr. P.-L. Teissedre (Département d'Oenologie, Bordeaux, France). Briefly, phenolic compounds were adsorbed on a preparative column, then alcohol desorbed; the alcoholic eluent was gently evaporated, and the concentrated residue was lyophilized and finely sprayed to obtain the phenolic extract dry powder. One liter of red wine produced 2.9 g of phenolic extract, which contained 471 mg/g of total phenolic compounds expressed as gallic acid. Phenolic levels in phenolic extract were measured by HPLC. The extract contained 8.6 mg/g catechin, 8.7 mg/g epicatechin, dimers (B1: 6.9 mg/g; B2: 8.0 mg/g; B3: 20.7 mg/g, and B4: 0.7 mg/g), anthocyanins (malvidin-3-glucoside: 11.7 mg/g; peonidin-3-glucoside: 0.66 mg/g, and cyanidin-3-glucoside: 0.06 mg/g) and phenolic acids (gallic acid: 5.0 mg/g; caffeic acid: 2.5 mg/g, and caftaric acid: 12.5 mg/g).

Statistical analysis

Values are expressed as means \pm SEM. n indicates the number of animals. Statistical analysis was performed with Student's t -test for paired data or with ANOVA followed by Fischer's protected least significant difference test to compare two treatments where appropriate (SAS Institute Inc., USA). Values of $P < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Results:

Involvement of small- and intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ -channels (SK_{Ca} and IK_{Ca}) in EDHF-mediated hyperpolarization

Smooth muscle cell of rat mesenteric artery were impaled with sharp microelectrodes and a membrane potential of -52.3 ± 1.6 mV ($n=7$) was observed in control mesenteric artery. In the presence of indomethacin and L-NA to rule out the formation of vasoactive prostanoids and NO; acetylcholine ($1 \mu\text{M}$) induced robust hyperpolarization (-18.250 ± 2.462 mV; $n=4$). Supplementing the bathing solution with 100 nM charybdotoxine and 100 nM apamin abolished the response to acetylcholine (-0.5 ± 2.327 mV; $n=4$) (Figure 1A,B). Neither the hyperpolarization to the ATP-sensitive K^+ channel opener, levcromakalim, nor the resting membrane potential was affected by either of these toxins (data not shown).

Inhibition of EDHF-mediated vasorelaxations by blockade of endothelial K_{Ca} channels in rat mesenteric artery.

In order to investigate the effect of K^+ channel blockers on relaxation evoked by acetylcholine and red wine polyphenols in mesenteric artery, we performed a series of experiments where acetylcholine (10^{-10} M to 10^{-5} M) or RWPs ($0.1 \mu\text{M}$ to $300 \mu\text{M}$) were added cumulatively on the vessels pre-contracted by phenylephrine. The phenylephrine concentration (10^{-6} M) was adapted to produce a contraction equivalent to 80% of those evoked by a 80 mM KCl

solution. Under control condition, without inhibitor, acetylcholine and RWPs caused concentration-dependant relaxations about $103,51 \pm 2,89\%$ ($n = 8$) and $87,68 \pm 4,24\%$ ($n = 8$) respectively (Figure 2A, B). In the presence of L-NA ($100 \mu\text{M}$) and indomethacin ($10 \mu\text{M}$), maximum relaxation to acetylcholine and RWPs reach $56,38 \pm 11,40\%$ ($n=8$) and $27,88 \pm 12,86$ ($n=9$) of the contraction (Figure 2A, B). The association of charybdotoxine (CTX, $0.1 \mu\text{M}$) plus apamin (APA, $0.1 \mu\text{M}$), which block respectively IK_{Ca} , but not only and SK_{Ca} channels, abolished the relaxation induced by the two vasodilators (Figure 2A, B). 4-aminopyridine (4-AP, 5mM), an inhibitor of voltage-gated K^+ channels (K_{v}) in combination with apamin had moderate effects on EDHF-mediated relaxation (Figure 2A, B), whereas each one alone didn't modified these relaxations (data not shown).

The selective IK_{Ca} inhibitor alone, TRAM-34, had a partially inhibitor effect on EDHF-mediated relaxation (Figure 3A, B) whereas combination of TRAM-34 with apamin, abolished this response (Figure 3A, B). So, abolition of EDHF-mediated relaxation requires the simultaneous presence of small- and intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ -channels inhibitors.

Increased blood pressure in angiotensin II-treated rats.

Systolic blood pressure was elevated in angiotensin II-treated rats with 0.4mg/kg/d during 21 days compared to control-rats. The systolic blood pressure increase gradually from a resting value of $124.2 \pm 2.2 \text{ mmHg}$ to a steady state value of $178.2 \pm 3.8 \text{ mmHg}$ (Figure 4A). There was no significant changes on heart beat rate (data not shown). The angiotensin II- induced increased systolic blood pressure was associated with a pronounced reduction of the plasma rennin activity (Figure 4B). These datas have been published in JPET in 2009 (Dal-Ros *et al.*, 2009).

Acetylcholine and RWPs- induced EDHF-mediated relaxations were abolished in angiotensin II-treated rats.

Phenylephrine (10^{-6} M) induce a stable contraction in mesenteric arteries. NO-mediated relaxation, observed in the presence of indomethacin and charybdotoxine plus apamine, was not significantly different in the vessels from the two groups of rats (Table 1), whereas EDHF-mediated relaxation, recorded with indomethacin and L-NA, was completely abolished in angiotensin II-treated rats (Table 1). The same results were obtained with RWPs (Table 2), indicating a strong impairment in EDHF-mediated relaxation not in relation with acetylcholine-induced relaxation pathway. These data have been published in JPET in 2009 (Dal-Ros *et al.*, JPET, 2009).

Chronic treatment with angiotensin II is associated with a reduced expression of small- and intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels (SK_{Ca} and IK_{Ca}) in the rat mesenteric arterial wall.

Ca^{2+} - activated K^{+} - channels, in particular the small- and intermediate- channels are key players in the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-mediated relaxation in small arteries. We have determined whether the expression of these two channels is altered in the mesenteric arteries from angiotensin II-treated rats. As shown in Figure 5A, SK_{Ca} Channel was observed throughout the arterial wall in mesenteric from control rats whereas IK_{Ca} was mainly detected in the endothelial layer. The expression of these two potassium channels was significantly reduced to $76.83 \pm 10.27\%$ (n=4) for IK_{Ca} and to $33.40 \pm 6.85\%$ (n=4) for SK_{Ca} in the mesenteric arteries from angiotensin II-treated rats (Figure 5B).

Chronic treatment with angiotensin II induce vascular formation of reactive oxygen species in the rat mesenteric arterial wall.

Many cardiovascular diseases are characterized by an increased oxidative stress and formation of reactive oxygen species. In your study, angiotensin II treatment caused a marked increase of the low basal fluorescence signal throughout the entire mesenteric arterial wall and the formation of peroxynitrite as assessed by nitrotyrosine fluorescence (Figure 6A, B). In order to determine the nature and source of these reactive oxygen species, we treated vessels with different inhibitors and look at ROS formation by fluorescence. The stimulatory effect was markedly reduced by the membrane permeant mimetic of superoxide dismutase MnTMPyP and the inhibitor of flavin-dependent enzymes including the NADPH oxidase, diphenyliodonium DPI (Figure 7) whereas the membrane permeant analogue of catalase, polyethyleneglycol-catalase had not effect on ROS formation (Figure 7). These results indicated a potential role of uncoupled eNOS and NADPH oxidase in the formation of superoxide anions in mesenteric from angiotensin II-treated rats.

Chronic treatment with angiotensin induce vascular formation of reactive oxygen species in the rat mesenteric arterial wall explained by an up regulation of eNOS and of NADPH oxidase sub-units.

Previous studies have indicated that the angiotensin II-induced endothelial dysfunction is associated with an excessive NADPH oxidase-dependent vascular formation of ROS [Rajagopalan *et al.*, 1996]. Moreover, angiotensin II is able to upregulate several NADPH oxidase subunits, namely p22phox, nox1, p40phox, p47phox and p67phox in aorta wall (Sarr *et al.*, 2006). In our study, a low fluorescence signal for nox1 and p22phox subunits was detected throughout the mesenteric arterial wall in the control group (Figure 8A, B). Both of these signals were significantly increased in rings from angiotensin II-treated rats.

Besides increase in superoxide anions production, impairment of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) enzymatic activity or reduced antioxidant defense capacity of endothelium may also contribute to elevation of O_2^- concentration and subsequent endothelial dysfunction (Csiszar *et al.*, 2002). So we looked at eNOS expression in mesenteric arteries from control and angiotensin II-treated rats. Our experiments show that eNOS is upregulated in rats treated with angiotensin II during 21 days (Figure 8C).

Discussion:

The present findings demonstrate that chronic administration of angiotensin II induces hypertension in rats in association with blunted EDHF-mediated relaxation in mesenteric arteries possibly due to a reduced expression of several connexins and potassium channels. Moreover, this effect involves an excessive vascular oxidative stress.

In normal vessels, EDHF is characterized by an hyperpolarizing factor formed by the activation of small- and intermediate- conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (SK_{Ca} and IK_{Ca} respectively) with myoendothelial gap junctions (formed by connexins Cx37, Cx40, Cx 43) playing a major role in the hyperpolarization transmission to smooth muscle cells in order to relax them. Involvement of K_{Ca} channels in the EDHF-mediated relaxation has been suggested by the effect of the combination of the selective SK_{Ca} inhibitor apamin and the non-selective IK_{Ca} , BK_{Ca} and voltage-dependent- K^+ -channel blocker charybdotoxine, which abolish EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in several arteries (Zygmunt and Högestätt, 1996 ; Corriu *et al.*, 1996 ; Prieto *et al.*, 1998). In fact, the present results showed that, in the mean mesenteric artery from rats, charybdotoxine and apamin completely inhibited the hyperpolarization and the EDHF-mediated relaxation induced by ACh and RWPs. Moreover, the combination of apamin and the more selective inhibitor of IK_{Ca} TRAM-34, also abolished EDHF-mediated relaxation. These results provide more convincing evidence

that SK_{Ca} and IK_{Ca} channels are responsible for EDHF responses in the mean mesenteric artery. Our immunohistochemical data shows that SK_{Ca} are found both in the media and the intima, whereas IK_{Ca} is mostly localized to the intima of mesenteric arteries from normotensive control rats (Crane *et al.*, 2003).

Our present findings demonstrate that angiotensin II-induced hypertension in rats down-regulate by about 25 to 65% the expression of the two potassium channels IK_{Ca} and SK_{Ca} in addition to the reduced vascular connexins (Cx37, Cx40, Cx43) expression shown in our first study (Dal-Ros *et al.*, 2009). These results are in the same range than those of Hilgers and Webb (2007) who have observed a significant decrease in SK3 channels and almost significant decrease in IK1 channel. Our data suggest that a concomitant decrease in the expression of all the potassium channels and all the connexins leads to a significant inhibition of EDHF-mediated responses in the artery of angiotensin II-treated rats. Moreover, it is noteworthy that the decreased EDHF-mediated relaxation was observed both with ACh and RWPs suggesting that the modifications induced by angiotensin II-induced hypertension is probably an alteration of potassium channels expression and an alteration of the intercellular coupling by gap junctions rather than an abnormal function of the calcium and PI₃-kinase/Akt endothelial pathways. One of the mechanisms leading to impaired K_{Ca} channels function (Gutterman *et al.*, 2005) and gap junction communication may be an excessive oxidative stress (Griffith *et al.*, 2005). The mechanisms leading to an alteration in K_{Ca} activity by oxidative stress are not well understood, numerous oxidative or nitrosative stress pathways influencing K_{Ca} channels activity (Gutterman *et al.*, 2005). The results of our study suggest that decrease in EDHF-mediated relaxation and oxidative stress may be related. So, in order to clarify this angiotensin II-induced endothelial dysfunction, we assessed ROS formation and expression of eNOS which can be uncoupled and produces superoxides anions rather than NO. Consistent with such a hypothesis are the present findings that angiotensin II-induced

hypertension is associated with an excessive formation of ROS throughout the arterial wall, an upregulation of eNOS and an increased vascular formation of peroxynitrite, as indicated indirectly by the increased level of nitrated proteins. Moreover, using different enzyme inhibitors, we determine that NADPH oxidase and uncoupled eNOS may be implicated in superoxides anions formation in angiotensin II-treated rats, as indicated indirectly by the inhibition of ROS fluorescence with diphenyleneiodinium (an inhibitor of flavin enzymes). All these data indicate that angiotensin II-induced hypertension induces an endothelial dysfunction by decreased EDHF-mediated relaxation, which is associated with increased superoxide formation, upregulation of eNOS and peroxynitrite formation. These data are in agreement with previous studies indicating that ROS in angiotensin-II treated rats decrease the bioavailability of NO (Sarr *et al.*, 2006 ; Walter *et al.*, 2008). Moreover, upregulation of the expression of eNOS may be explained by a compensatory mechanism for maintaining the production of bioactive NO (Piech *et al.*, 2003 ; Lopez-Sepulveda *et al.*, 2008) and it has been shown that angiotensin II upregulates eNOS protein expression and thus stimulates NO release from the endothelial cells (Hennington *et al.*, 1998 ; Moreno *et al.*, 2002)

Moreover, angiotensin II is known to increase membrane-bound NADH/NADPH oxidase activity and to upregulate the expression of several NADPH oxidase subunits including nox1, nox4 and p22phox in the arterial wall (Rajagopalan *et al.*, 1996 ; Sarr *et al.*, 2006). In our study, we observed an upregulation in NADPH oxidase subunits nox1 and p22phox in mesenteric arterial walls of angiotensin II-treated rats.

In conclusion, our study highlights a close relationship between chronic exposure to angiotensin II, the abolition of EDHF-mediated relaxations, the decrease in endothelium potassium channels and the increased oxidative stress in mesenteric arteries. Because EDHF is the predominant endothelial factor in small arteries, it is proposed that these latter modifications could contribute to maintain and/or worsen hypertension.

References

- Barriere E, Tazi KA, Pessione F, Hiller J, Poirel O, Lebrec D, Moreau R. Role of small-conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channels in *in vitro* NO-mediated aortic hyporeactivity to α -adrenergic vasoconstriction in rats with cirrhosis. *J. Hepatol.* 2001;35:350-357.
- Castle NA. Recent advances in the biology of small conductance calcium-activated potassium channel. *Perspect. Drug. Discov.* 1999; 15/16,131-154.
- Chataigneau T, Félétou M, Duhault J and Vanhoutte PM. Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelial dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *Br J. Pharmacol.* 1998;123,574-580.
- Chataigneau T, Feletou M, Thollon C, Villeneuve N, Vilaine JP, Duhault J, Vanhoutte PM. Cannabinoid CB1 receptor and endothelium-dependent hyperpolarization in guinea-pig carotid, rat mesenteric and porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 1998; 123:968-974.
- Corriu C, Félétou M, Canet E, Vanhoutte PM. Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol.* 1996 Nov;119(5):959-64.
- Crane G.J., Gallagher N., Dora K.A and Garland C.J.. Small- and intermediated-conductance calcium-activated K^{+} channels provide different facets of endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery, 2003, *J Physiol*, 553.1, 183-189.
- Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, Kaley G. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res.* 2002;90:1159–1166.
- Dal-Ros S, Bronner C, Schott C, Kane MO, Chataigneau M, Schini-Kerth VB, Chataigneau T. Angiotensin II-induced hypertension is associated with a selective inhibition of EDHF-mediated responses in the rat mesenteric artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009 Feb;328(2):478-86.
- Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.*1989;3:2007-2018.
- Garcia ML, Galvez A, Garcia-Calvo M, King VF, Vasquez J and Kaczorowski GJ. Use of toxins to study potassium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1991;23,615-646 Ohashi M, Satoh K and Itoh T. Acetylcholine-induced membrane potential changes in endothelial cells of rabbit aortic valve. *Br. J. Pharmacol.* 1999;126,19-26.
- Gutterman DD, Miura H, Liu Y. Redox modulation of vascular tone. Focus of potassium channel mechanisms of dilatation. *Arteriscler. Throm. Vasc. Biol.*2005;25:671-678.
- Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: Basic mechanisms and *in vivo* monitoring of ROS. *Circulation.* 2003;108:1912-1916.
- Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: Animal and human studies. *Circulation.* 2003; 108:2034-2040.

Griffith TM, Chaytor AT, Bakker LM, Edwards DH. 5-Methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin can modulate electrotonically mediated endothelium-dependent vascular relaxation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102: 7008-7013.

Hennington BS, Zhang H, Miller MT, Granger JP, Reckelhoff JF. Angiotensin II stimulates synthesis of endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension* 1998;31:283-888.

Ingert C, Grima M, Coquard C, Barthelmebs M, Imbs JL. Effects of dietary salt changes on renal renin-angiotensin system in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283:F995-F1002.

Kohler R, Brakemeier S, Kuhn M, Behrens C, Real R, Degenhardt C, Orzechowski HD, Pries AR, Paul M, Hoyer J. Impaired hyperpolarization in regulated endothelium after balloon catheter injury. *Cir Res.* 2001;89:174-179.

López-Sepúlveda R, Jiménez R, Romero M, Zarzuelo MJ, Sánchez M, Gómez-Guzmán M, Vargas F, O'Valle F, Zarzuelo A, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Wine polyphenols improve endothelial function in large vessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2008 Apr;51(4):1088-95.

Miller Jr FJ, Gutterman 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.

Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J. Moll. Cell. Cardiol.* 1999;31:61-74.

Moreno C, López A, Llinás MT, Rodríguez F, López-Farré A, Nava E, et al. Changes in NOS activity and protein expression during acute and prolonged ANG II administration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;282:R31-R37.

Ohashi M, Satoh K and Itoh T. Acetylcholine-induced membrane potential changes in endothelial cells of rabbit aortic valve. *Br. J. Pharmacol.* 1999;126,19-26.

Onaka U, Fujii K, Abe I, Fujishima M. Antihypertensive treatment improves endothelium-dependent hyperpolarization in the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 1998;98:175-82.

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;94:14483–8.

Piech A, Dessy C, Havaux X, Feron O, Balligand JL. Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2003 Feb;57(2):456-67.

Pries AR, Secomb TW and Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch.* 2000;440: 653-666.

Prieto D, Simonsen U, Hernández M, García-Sacristán A. Contribution of K⁺ channels and ouabain-sensitive mechanisms to the endothelium-dependent relaxations of horse penile small arteries. *Br J Pharmacol.* 1998 Apr;123(8):1609-20.

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, et al. 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.

Sarr M, Chataigneau M, Martins S, Schott C, El Bedoui J, Oak MH, et al. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: Role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res* 2006 May 26.

Si H, Heyken WT, Wolfle SE, Tysiac M, Schubert R, Grgic I, Vilianovich L, Giebing G, Maier T, Gross V, Bader M, de Wit C, Hoyer J, Kohler R. Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Circ Res.* 2006 Sep 1;99(5):537-44.

Taylor MS, Bonev AD, Gross TP, Eckman DM, Brayder JE, Bond CT, Adelman JP, Nelson MT. Altered expression of small- conductance Ca²⁺-activated K⁺ (SK3) channels modulated arterial tone and blood pressure. *Cir Res.* 2003; 93:124-131.

Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries *J. Clin. Invest.* 1997;100(11):2793-2799.

Walter A, Etienne-Selloum N, Sarr M, Kane MO, Beretz A, Schini-Kerth VB. Angiotensin II induces the vascular expression of VEGF and MMP-2 in vivo: preventive effect of red wine polyphenols. *J Vasc Res.* 2008;45(5):386-94.

Zygmunt PM, Högestätt ED. Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation resistant to nitroarginine in the rat hepatic artery. *Br J Pharmacol.* 1996 Apr;117(7):1600-6.

Figure 1

A.

B.

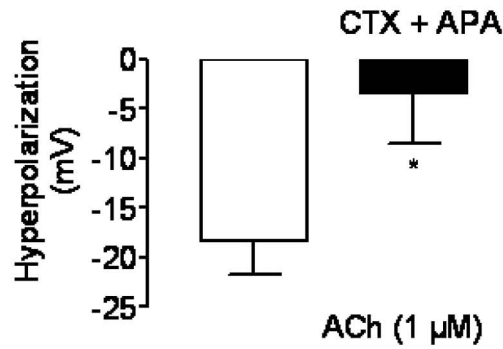


Figure 1: Involvement of small- and intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (SK_{Ca} and IK_{Ca}) in EDHF-mediated hyperpolarization

Membrane potential responses in rat mesenteric artery smooth muscle cell to transient exposure to 10^{-6}M phenylephrine were recorded using sharp micro-electrodes. The addition of 10^{-7}M charybdotoxin (CTX) and 10^{-7}M apamin (APA) to the superfusing bath solution was indicated. A representative trace (**A**) and the data derived from 4 experiments (**B**) columns represent the mean membrane potential (V_m) \pm SEM before and after exposure to hyperpolarizing agent in the absence or presence of the inhibitors as indicated) were shown.

* indicates a significant inhibitory effect ($p < 0.05$).

Figure 2

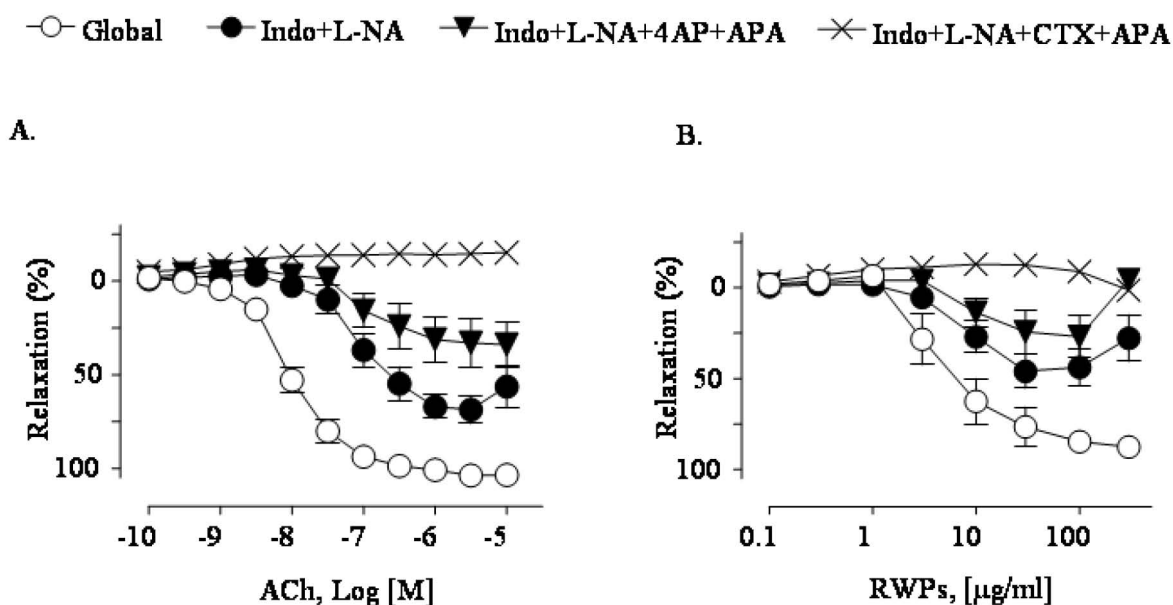


Figure 2: Inhibition of EDHF-mediated vasorelaxations by blockade of endothelial K_{Ca} channels in rat mesenteric artery: effects of apamin, charybdotoxin and 4-aminopyridine

Concentration responses curve for the effects of acetylcholine (ACh) (**A**) and red wine polyphenols (RWPs) (**B**) on the contractile tension of mesenteric arteries stimulated by phenylephrine (10^{-6} M) in the absence (EDHF, $n=9$) and the presence of charybdotoxin and apamin (CTX+APA, 10^{-7} M, $n=3$) or 4-aminopyridine (4-AP, $5 \cdot 10^{-3}$ M, $n=4$).

All experiments were performed in the presence of indomethacin (10^{-5} M) and N^w -nitro-L-arginine (10^{-5} M), excepted for global relaxation (global, $n=9$) and results are shown as mean \pm SEM of 3-9 different rats. * indicates a significant inhibitory effect ($p < 0.05$).

Figure 3

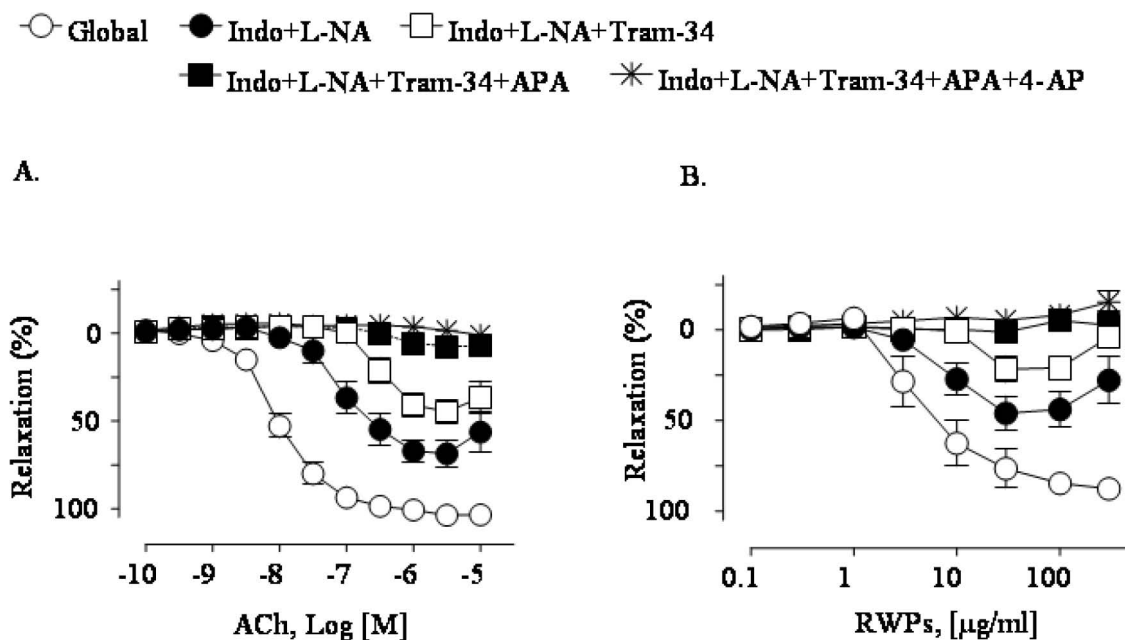


Figure 3: Inhibition of EDHF-mediated vasorelaxations by blockade of endothelial K_{Ca} channels in rat mesenteric artery: effects of apamin, TRAM-34 and 4-aminopyridine

Dose-dependent EDHF-type vasodilators response in response to acetylcholine (ACh) in (A) and red wine polyphenols (RWPs) in (B) were shown. An inhibition by combination of TRAM-34 (10^{-6} M) and apamin (10^{-7} M) \pm 4-aminopyridine (4-AP, $5 \cdot 10^{-6}$ M) are revealed but not by apamin or TRAM-34 alone.

All experiments were performed in the presence of indomethacin (10^{-5} M) and N^w -nitro-L-arginine (10^{-5} M). Results are given as mean \pm SEM of 9 different rats. * indicates a significant inhibitory effect ($p < 0.05$).

Figure 4

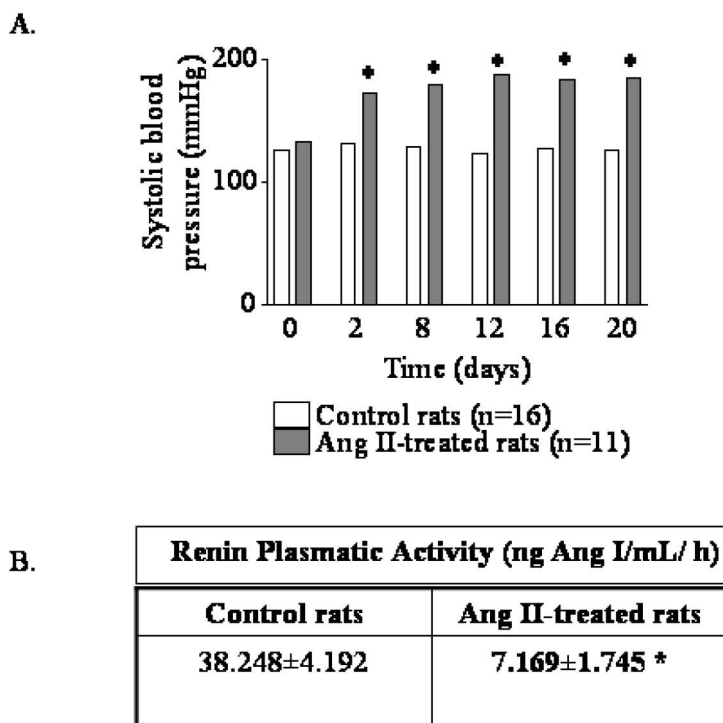


Figure 4: Increased blood pressure in Angiotensin II (Ang II)-treated rats

Effects of a chronic administration of Ang II (0.4mg/kg/day during 21 days with subcutaneous osmotic minipumps) on rat hemodynamic parameters (**A**) and on the renin plasmatic activity at 21 day (**B**). D₀ indicates the initiation of Ang II administration. Results are given as mean ± SEM of 11 to 16 different rats. * indicates a significant effect between Control and Ang II-treated rats, # indicates a significant effect between D₀ and the other days of Ang II-treated rats (p<0.05).

Figure 5

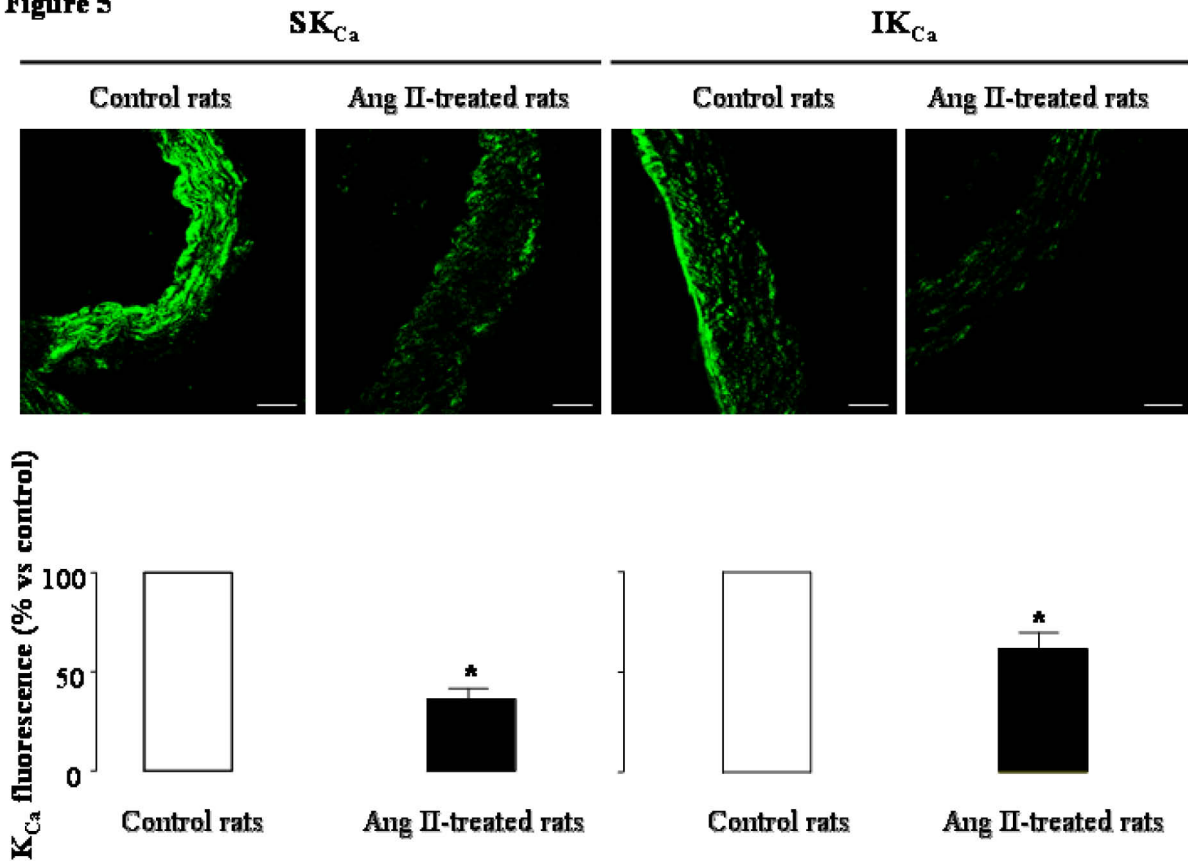


Figure 5: Effects of a chronic treatment with Angiotensin II (Ang II) on distribution and expression of small- and intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (SK_{Ca} and IK_{Ca}) in mesenteric arteries

The distribution of SK_{Ca} and IK_{Ca} was determined in mesenteric arteries sections from normotensive-rats (Control) and Ang II-treated rats (Ang II) using selective antibodies and fluorescence-tagged secondary antibody by confocal microscopy. Upper panel shows representative immunofluorescent staining and corresponding phase contrast; lower panel represents corresponding cumulative data (*n*=5). I: intima, M: media and A: adventitia.

* indicates a significant inhibitory effect (*p*<0.05).

Figure 6

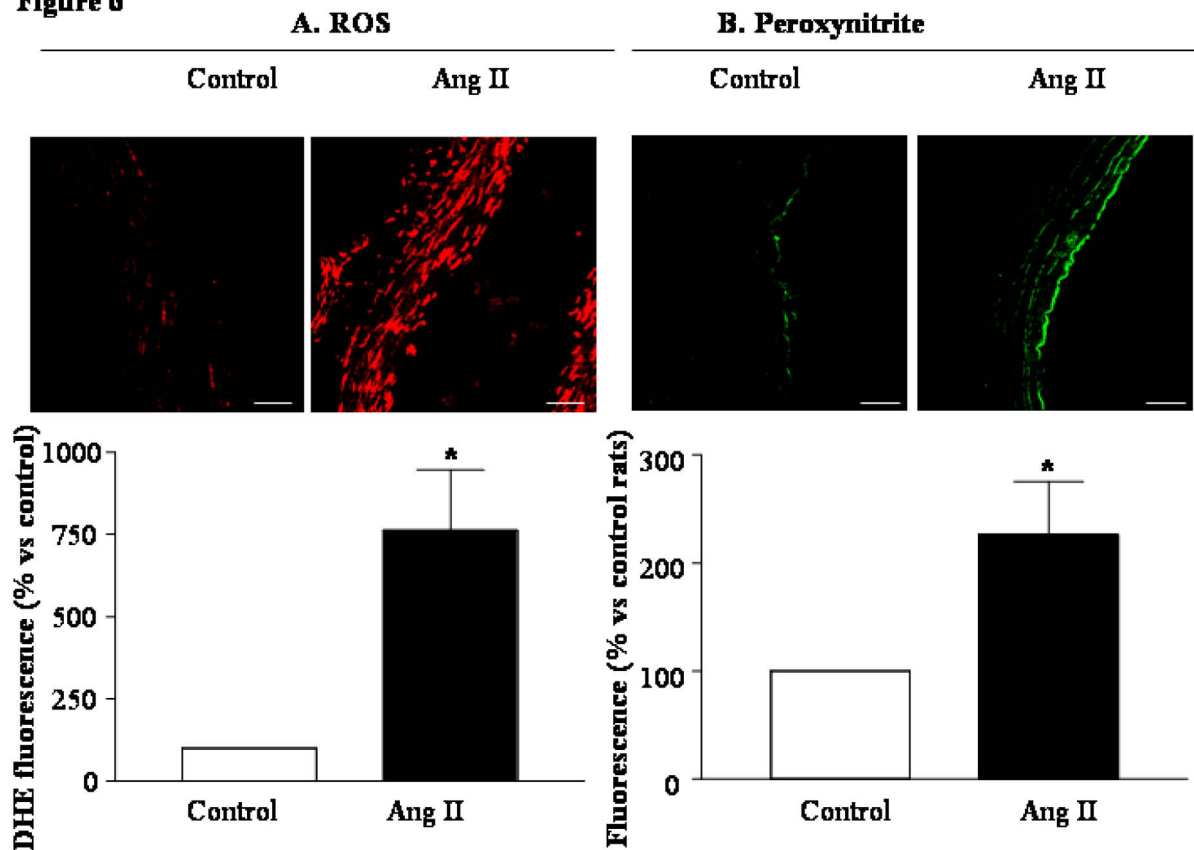


Figure 6: Angiotensin II treatment induce vascular formation of reactive oxygen species and peroxynitrites.

Mesenteric arteries sections in were exposed to (A) the redox-sensitive fluorescent dye dihydroethidine (DHE) or to (B) nitrotyrosine antibody. Upper panel represents ethidium bromide staining and corresponding phase contrast in normotensive-rats (Control) and Ang II-treated rats (Ang II); lower panel represents corresponding cumulative data. Results are given as mean \pm SEM ($n=5$). * indicates a significant stimulatory effect ($p<0.05$). I: intima, M: media and A: adventitia.

Figure 7

DHE (Ang II-treated rats)

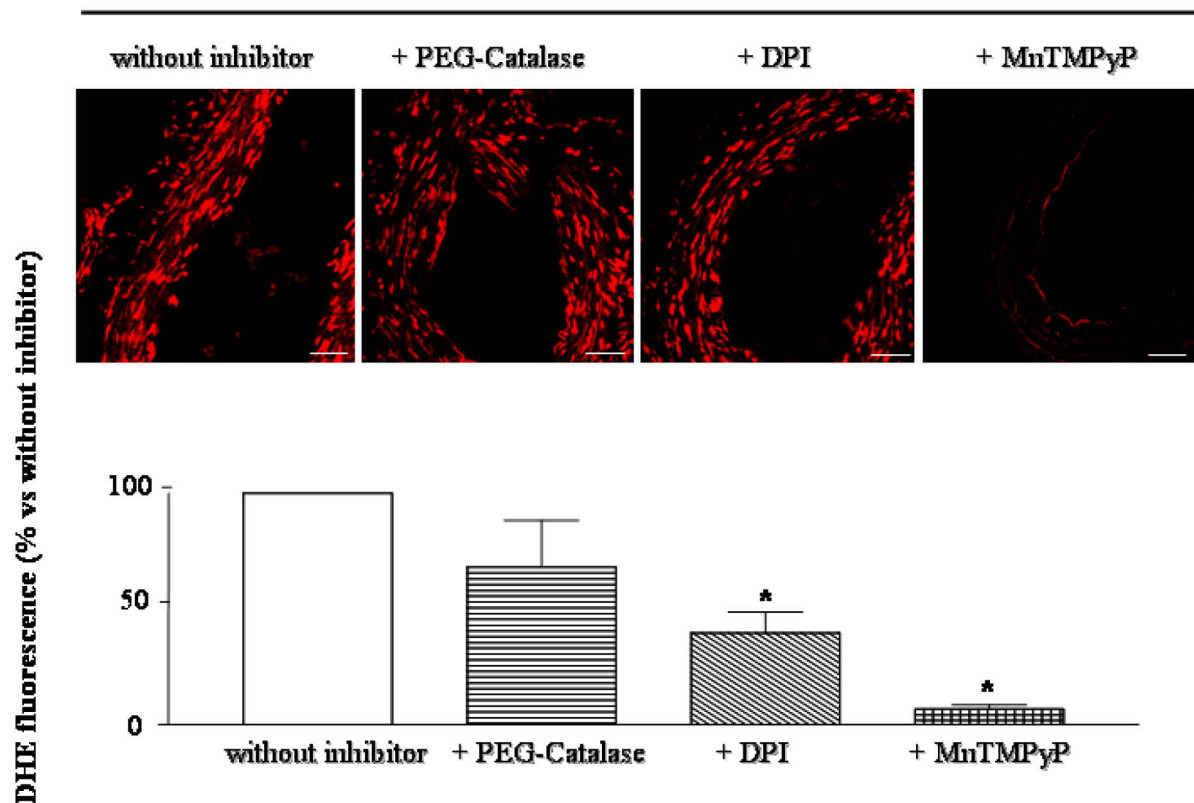


Figure 7: Characterization of the pro-oxidant response induced by Ang II treatment in the rat superior mesenteric artery

Mesenteric arteries sections were exposed to the redox-sensitive fluorescent dye dihydroethidine (DHE) for 30 min at 37°C. Thereafter, ethidium fluorescence was determined by confocal microscopy. The effects of MnTMPyP (a SOD analogue), DPI (an inhibitor of flavin-dependent enzymes) and PEG-Catalase (an permeant catalase) are shown. Upper panel represents ethidium bromide staining and corresponding phase contrast in normotensive-rats (Control) and Ang II-treated rats (Ang II); lower panel represents corresponding cumulative data. Results are given as mean \pm SEM ($n=5$). * indicates a significant stimulatory effect ($p<0.05$). I: intima, M: media and A: adventitia.

Figure 8

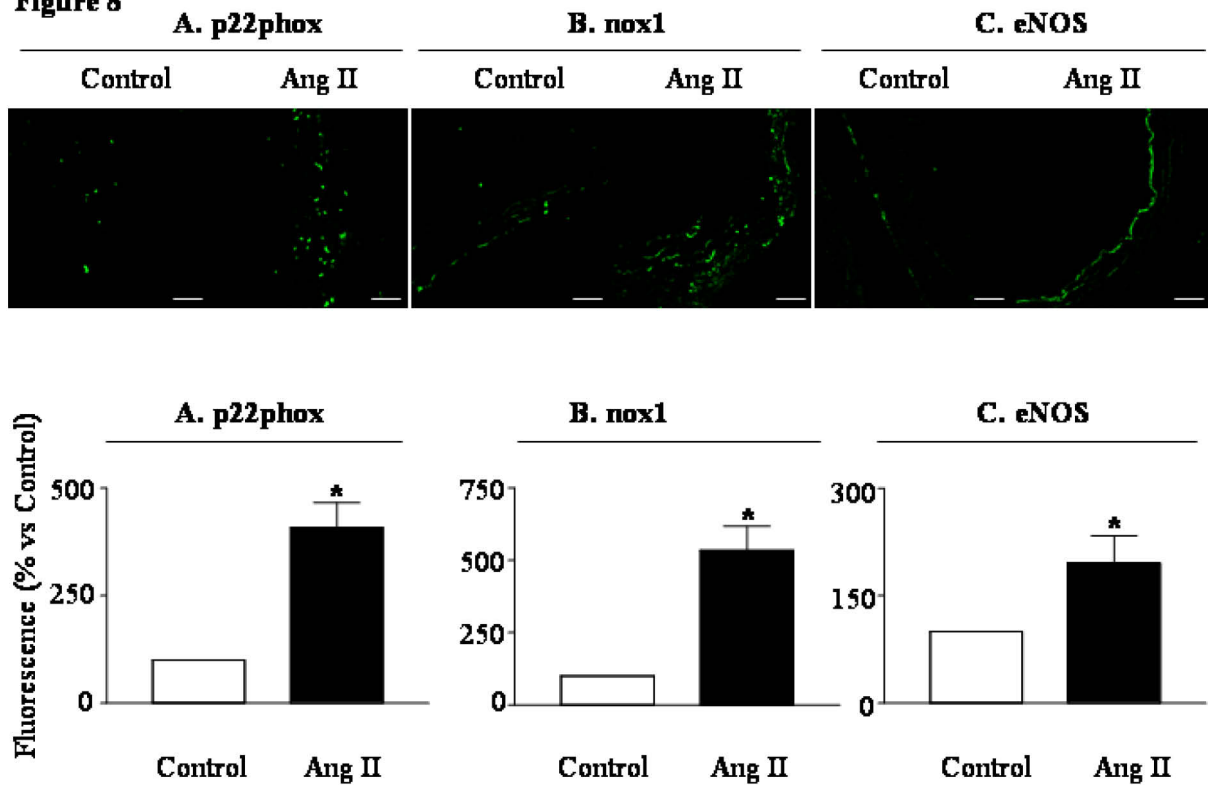


Figure 8: Angiotensin II treatment induce expression of nox1 and p22phox NADPH oxidase subunits and eNOS expression in the rat superior mesenteric arteries.

The expression level of nox1 (A) and p22phox (B) NADPH oxidase subunits and (C) eNOS were determined using a purified polyclonal antibody and a fluorescence-tagged secondary antibody by confocal microscopy. Upper panel shown representative immunofluorescent staining and corresponding phase contrast; lower panel represents corresponding cumulative data. Results are given as mean \pm SEM on 5 different rats. * indicates a significant stimulatory effect ($p < 0.05$). I: intima, M: media and A: adventitia.

Table 1

Ach, -Log [M]	Globle relaxation		(NO+EDHF) relaxation		NO relaxation		EDHF relaxation	
	Control rats	Ang II treated rats	Control rats	Ang II treated rats	Control rats	Ang II treated rats	Control rats	Ang II-treated rats
	N=7	N=7	N=8	N=6	N=7	N=6	N=16	N=9
10	(-)0,81±0.83	(-)2,43±1.00	1,34±1.36	0,54±1.47	(-)1,42±0.49	(-)0,58±0.81	(-)1,19±0.65	(-)3,62±1.08
9.5	(-)0,04±1.18	(-)2,26±1.78	0,63±1.49	(-)0,39±2.84	(-)0,82±1.16	(-)3,97±2.15	(-)2,91±0.64	(-)5,97±1.25
9	0,92±1.93	(-)1,30±2.27	2,01±2.42	(-)1,48±3.39	(-)2,44±1.63	(-)4,49±2.75	(-)4,38±0.86	(-)8,08±1.36
8.5	10,89±4.68	8,62±9.22	7,40±2.45	10,78±12.91	(-)3,77±3.20	(-)4,86±6.63	(-)5,86±1.91	(-)10,10±1.85
8	49,77±8.47	21,06±19.64	45,60±9.21	27,98±14.48	9,26±1.91	6,79±14.25	(-)1,22±2.48	(-)8,78±2.90
7.5	86,06±1.72	75,99±8.55	74,03±8.49	53,11±16.83	32,20±3.68	17,89±14.47	10,33±4.32	(-)8,99±3.81*
7	93,64±1.51	89,20±2.27	89,00±5.58	69,42±12.22	51,87±4.68	30,58±13.08	34,63±6.97	(-)8,80±7.06*
6.5	97,38±0.88	94,45±1.37	93,43±4.32	81,55±8.90	62,62±4.54	40,42±11.55	50,33±7.11	(-)9,81±6.66*
6	97,84±0.98	95,49±1.60	95,24±3.93	86,83±9.36	66,16±4.49	47,33±11.71	52,20±7.71	(-)14,08±6.05*
5.5	99,08±0.80	92,72±5.31	96,00±4.29	87,96±9.15	67,79±4.94	53,15±12.44	47,07±8.86	(-)14,25±4.77*
5	101,25±0.93	91,65±4.63	95,82±4.71	89,31±8.93	70,47±5.07	55,35±12.07	41,40±9.43	(-)14,84±4.37*

Table 1: Acetylcholine-induced vasorelaxations was abolished in Ang II-treated rats

Acetylcholine-induced relaxations were recorded in isolated mesenteric arteries from normotensive-rats (Control) and Ang II-treated rats (Ang II):

- 1st column, **global relaxation**: in absence of inhibitors
- 2nd column, **NO+EDHF relaxation**: in presence of indomethacin (10^{-5} M) to rule out the formation of vasoactive prostanoids
- 3^d column, **NO relaxation**: in presence of indomethacin and charybdotoxin (CTX, 10^{-7} M) + apamin (APA, 10^{-7} M) to rule out the formation of prostanoids and EDHF
- 4th column, **EDHF relaxation**: in presence of indomethacin and N^w-nitro-L-arginine (10^{-5} M) to rule out the formation of vasoactive prostanoids and NO

Results were shown as mean ± SEM of 6-16 different rats. * indicates a significant inhibitory effect between Control and Ang II-treated rats relaxations from each component (p<0.05).

Table 2

RWPs, [µg/ml]	Globle relaxation		(NO+EDHF) relaxation		NO relaxation		EDHF relaxation	
	Control rats	Ang II-treated rats	Control rats	Ang II-treated rats	Control rats	Ang II-treated rats	Control rats	Ang II-treated rats
	N=7	N=6	N=8	N=6	N=7	N=6	N=16	N=9
0.1	(-)1,86±1.12	(-)1,86±2.24	(-)3,57±1.43	(-)3,61±1.93	(-)1,42±0.97	(-)1,89±2.20	(-)2,01±0.64	(-)2,17±0.69
0.3	(-)3,10±1.67	(-)3,10±1.71	(-)1,75±1.23	(-)11,08±5.96	(-)5,55±2.43	(-)4,89±2.77	(-)2,42±0.95	(-)4,65±0.96
1	(-)8,91±5.57	(-)8,91±5.53	34,84±14.09	(-)6,48±14.25*	(-)3,93±5.12	(-)5,37±4.09	(-)3,29±0.11	(-)4,44±1.99
3	28,66±14.68	28,66±16.13	75,25±15.67	27,55±16.18*	11,62±7.92	1,68±9.16	1,96±2.26	(-)7,44±1.49*
10	80,71±14.75	80,71±2.05	85,59±10.76	58,27±13.84*	32,42±11.05	14,01±12.07	26,20±7.26	(-)8,12±3.37*
30	85,74±10.58	85,74±2.85	86,14±9.40	71,42±8.67	33,41±7.33	18,55±10.67	34,29±7.29	(-)9,06±3.30*
100	78,36±8.06	78,36±6.44	79,47±8.45	69,77±7.58	30,55±8.12	22,43±8.26	30,47±6.36	(-)9,57±2.75*
300	51,71±9.50	51,71±20.79	67,59±7.86	64,92±9.10	30,09±8.05	23,77±6.99	18,39±6.51	(-)8,29±2.55*

Table 2: Red wine polyphenols-induced vasorelaxations was abolished in Ang II-treated rats

Red wine polyphenols (RWPs)-induced relaxations were recorded in isolated mesenteric arteries from normotensive-rats (Control) and Ang II-treated rats (Ang II):

- 1st column, **global relaxation**: in absence of inhibitors
- 2nd column, **NO+EDHF relaxation**: in presence of indomethacin (10^{-5} M) to rule out the formation of vasoactive prostanoids
- 3^d column, **NO relaxation**: in presence of indomethacin and charybdotoxin (CTX, 10^{-7} M) + apamin (APA, 10^{-7} M) to rule out the formation of prostanoids and EDHF
- 4th column, **EDHF relaxation**: in presence of indomethacin and N^w-nitro-L-arginine (10^{-5} M) to rule out the formation of vasoactive prostanoids and NO

Results were shown as mean ± SEM of 6-16 different rats. * indicates a significant inhibitory effect between Control and Ang II-treated rats relaxations from each component (p<0.05).

Synthèse des résultats des publications 1 et 2 :

La première partie de ce projet nous a permis de mieux comprendre la nature et les voies d'activation d'EDHF. En effet, dans un premier temps nous avons pu mettre en évidence par microélectrodes la présence d'une hyperpolarisation suite à l'application d'acétylcholine sur des anneaux d'artère mésentérique, celle-ci étant bloquée par une combinaison de charybdotoxine et d'apamine ou le TRAM-34 et l'apamine. Les relaxations induites par l'acétylcholine sont elles aussi inhibées en présence de ces deux toxines (en plus de l'indométacine et du L-NA, permettant de s'affranchir de la présence de prostanoïdes vasoactifs et du NO). Ainsi, cette hyperpolarisation et la relaxation qui en découle sont bien dépendantes de la présence fonctionnelle des canaux IK_{Ca} et SK_{Ca} . Nous avons pu ensuite confirmer l'hypothèse que les jonctions gap myoendothéliales joueraient un rôle primordial dans la transmission de l'hyperpolarisation des cellules endothéliales aux cellules musculaires lisses, car deux inhibiteurs différents de ces jonctions (l'acide 18 α -glycyrhétinique et la carbenoxolone) sont capables de bloquer les relaxations médiées par EDHF et induites par l'acétylcholine.

De plus nous avons mis en évidence la présence d'une seconde voie d'activation du facteur EDHF, différente de la voie calcique impliquée dans les relaxations induit par l'acétylcholine ou la bradykinine : la voie PI3-kinase/Akt stimulée par les polyphénols du vin rouge. En effet, des études antérieures dans le laboratoire avaient souligné la capacité vasodilatatrice des polyphénols du vin rouge dans les artères telles que l'aorte de rat ou la coronaire de porc, mais pas dans les artères de résistance. Nous avons pu montrer que l'application d'une gamme croissante et cumulative de polyphénols du vin rouge était capable d'induire une relaxation et une hyperpolarisation. Celles-ci sont aussi abolies ou diminuées par les inhibiteurs des canaux potassiques et des jonctions gap. De plus, les relaxations sont bloquées par des inhibiteurs de la voie PI3-kinase/Akt et par le MnTMPyP, analogue perméant membranaire de la SOD, mettant en évidence la formation d'anions superoxyde en amont de la cascade PI3-kinase/Akt. La découverte de cette seconde voie d'activation des facteurs vasodilatateurs dans l'artère mésentérique de rat a permis de comparer par la suite les relaxations induites par l'acétylcholine à celles induites par les polyphénols du vin rouge, afin de déterminer si l'une et/ou l'autre des voies est atteinte dans l'hypertension artérielle, le SHP et le vieillissement.

La suite du projet a démontré que l'administration chronique d'angiotensine II à 0,4 mg/kg/j pendant 21 jours, augmente la pression artérielle sans modification de la fréquence

cardiaque. Dans les vaisseaux provenant des deux groupes d'animaux et mis en présence d'indométacine, les gammes croissantes et cumulatives d'acétylcholine et de polyphénols induisent une relaxation qui est significativement inhibée soit par la N^w-nitro-L-arginine soit par les deux toxines, la charybdotoxine et l'apamine ; cet effet relaxant est aboli par la combinaison de tous les inhibiteurs. Ces résultats confirment la participation du NO et d'EDHF dans les mécanismes vasorelaxants dans l'artère mésentérique principale de rat. Le traitement chronique avec l'angiotensine II pendant 21 jours n'altère pas ou peu (dans le cas des relaxations induites par les polyphénols) la composante (NO+EDHF) de la relaxation, ne modifie pas la composante NO, mais par contre abolie spécifiquement la composante EDHF de la relaxation dans ces artères. Ainsi, l'hypertension artérielle induite par l'administration chronique d'angiotensine II est associée à une dysfonction endothéliale touchant spécifiquement la composante EDHF de la relaxation.

De plus, cette dysfonction endothéliale spécifique d'EDHF ne semble pas être sélective des deux voies de signalisations intracellulaires (voie calcique pour l'acétylcholine / voie PI₃-kinase/Akt pour les polyphénols) puisque dans les deux cas une abolition de la vasodilatation est observée chez les animaux traités avec l'angiotensine II. Ces résultats indiquent bien qu'il n'y a pas d'atteinte de voies en amont mais réellement un dysfonctionnement à la genèse et/ou à la transmission d'EDHF.

Cette altération de la vasodilatation des vaisseaux provenant de l'artère mésentérique principale des rats traités avec l'angiotensine II est associée à la diminution de l'hyperpolarisation. Nous avons déjà confirmé l'importance du rôle des canaux potassiques endothéliaux ainsi que celui des jonctions gap myoendothéliales dans la réponse EDHF. Ainsi ces altérations peuvent s'expliquer par la diminution de l'expression des deux canaux potassiques IK_{Ca} et SK_{Ca} ainsi que des connexines Cx37, Cx40 et Cx43, les principales protéines formant ces jonctions gap.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence, la présence d'un stress oxydant chez les animaux traités chroniquement avec l'angiotensine II. Les espèces réactives de l'oxygène présentes sont les anions superoxydes et les sources enzymatiques responsables de leur formation sont la NADPH oxydase et la eNOS découplée, enzymes dont l'expression est fortement augmentée chez les animaux hypertendus.

Nous avons donc par ces deux publications, pu mettre en avant une nouvelle voie d'activation du facteur EDHF, ainsi que le rôle majeur des canaux potassiques IK_{Ca},SK_{Ca} et des jonctions gap myoendothéliales dans l'artère mésentérique de rat. Et nous avons pu montrer que

la diminution de leur expression permettrait d'expliquer la dysfonction endothéliale spécifique à EDHF observée chez les animaux traités chroniquement avec l'angiotensine II. L'ensemble de ces résultats sera discuté dans la partie « Discussion générale ».

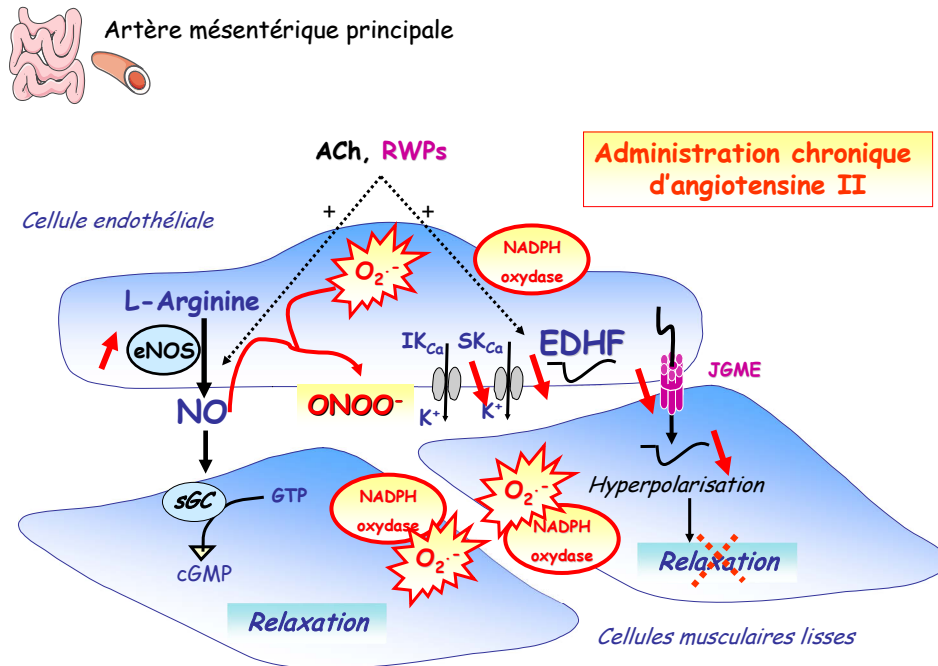


Figure 51 : Schéma récapitulatif des effets d'un traitement chronique avec l'angiotensine II.

ACh : acétylcholine, EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, eNOS : NO synthase endothéliale, IK_{Ca} et SK_{Ca} : canaux potassiques dépendants du calcium de moyenne et de faible conductance, JGME : jonctions gap myoendothéliales, K^+ : potassium, NO : monoxyde d'azote, $ONOO^-$: peroxydites, $O_2^{\cdot-}$: anions superoxydes, RVPs : polyphénols du vin rouge, + : stimule, $\uparrow \downarrow$: effet du traitement, augmentation ou diminution.

Publication 3:

Etude de la fonction endothéliale dans
un modèle expérimental de syndrome
hépatopulmonaire *in vivo* chez le rat :
rôle du stress oxydant et effets
protecteurs du losartan

Publication 3 :

Losartan prevents portal hypertension induced redox-mediated endothelial dysfunction in the mesenteric artery in rats

Gastroenterology, accepted october 2009

Le lien entre le foie et les poumons a été noté pour la première fois il y a plus de 100 ans, par Fluckiger en 1884 sur des femmes cirrhotiques et cyanosées. Pourtant cette relation n'a été officialisée que près d'un siècle plus tard quand Kennedy et Knudson en 1977 ont décrit le syndrome hépatopulmonaire (SHP) comme une pathologie clinique. Il a ainsi été montré que les pathologies chroniques du foie associées à des anomalies vasculaires pulmonaires étaient relativement fréquentes. Deux atteintes ont été observées : le syndrome hépatopulmonaire caractérisé par une hypoxémie et la présence de dilatations vasculaires intrapulmonaires, et l'hypertension portopulmonaire (HPP) caractérisée par une vasoconstriction et un remodelage des artères de résistances. Ces anomalies peuvent participer aux mécanismes pathologiques de la cirrhose en plus des altérations systémiques. La prévalence du SHP varie selon les séries de patients en attente de greffe hépatique, mais est probablement de l'ordre de 5 à 20%, toutes pathologies hépatiques confondues (Rodriguez-Roisin *et al.*, 2004). L'HPP est plus rare touchant sans doute près de 5 % des patients.

Le SHP est défini par une triade associant un défaut d'oxygénation artériel dû à des dilatations vasculaires pulmonaires dans un contexte de maladie hépatique (Krowka, 2000). Il est important d'en faire le diagnostic car c'est un facteur pronostique indépendant de survie qui conditionne aussi la mortalité post-opératoire au cours de la greffe hépatique (Shenk *et al.*, 2003 ; Arguedas *et al.*, 2003). Jusqu'à présent, aucun essai de traitement médical n'a prouvé son efficacité, seule la transplantation hépatique permet une régression du SHP dans environ 80% des cas (Rodriguez-Roisin *et al.*, 2004). Pourtant un traitement efficace est fortement souhaitable car, d'une part, il n'existe pas de corrélation étroite entre la sévérité du SHP et celle de la pathologie hépatique et d'autre part il existe un risque opératoire important dans le cas de SHP sévère (Arguedas *et al.*, 2003). D'après les données de la littérature, des études ont été consacrées à la caractérisation des mécanismes à l'origine de l'apparition du SHP. Le foie a un rôle indéniable dans le contrôle de l'intégrité de la circulation pulmonaire (Hervé *et al.*, 1998 ; Vettukattil *et al.*, 2002). Deux types de perturbations sont mises en avant : une diminution de

facteurs vasoconstricteurs produits normalement par le foie et/ou une production anormale ou non métabolisable de facteurs induisant une vasodilatation pulmonaire, au niveau des petits vaisseaux pré- et post-capillaires (Fallon *et al.*, 1997). Le NO, vasodilatateur bien connue, est la molécule qui a été le plus étudiée. En effet, il a été observé une augmentation du NO exhalé chez les patients présentant un SHP avec une diminution de ce paramètre après transplantation hépatique, concomitamment à une régression du SHP (Cremona *et al.*, 1995 ; Rolla *et al.*, 1998). Chez le rat cette hypothèse a été confirmée par l'observation d'une production anormale de NO par stimulation des récepteurs ETB par l'endothéline-1 (Ling *et al.*, 2004). L'utilisation en expérimentation animale d'un traitement chronique par le N⁶-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME, inhibiteur des NOS) atténue et empêche la survenue du SHP. En revanche, les essais cliniques de traitement par inhalation de L-NAME donnent des résultats contradictoires (Brussino *et al.*, 2003 ; Gómez *et al.*, 2006), mettant en exergue l'importance d'autres facteurs dans la physiopathologie.

Ainsi l'objectif de ce projet a été d'étudier la fonction endothéliale dans un modèle expérimental de cirrhose biliaire associée à une hypertension portale par ligature de la voie biliaire commune *in vivo* chez le rat, modèle de SHP validé dans la littérature (Fallon *et al.*, 1997). De part l'importance de la présence d'un syndrome hyperdynamique et de nombreuses complications dans ces pathologies associées, nous avons choisi d'élargir les lits vasculaires étudiés et ainsi d'avoir l'originalité de montrer des résultats sur l'artère pulmonaire et l'artère mésentérique. Nous nous sommes attachés à la caractérisation des anomalies vasculaires observées et notamment à l'implication de deux paramètres : le rôle du stress oxydant et du système rénine angiotensine. En effet, dans quelques modèles expérimentaux et chez les patients cirrhotiques, il a été mis en évidence une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (Chen *et al.*, 1997 ; Jain *et al.*, 2002 ; Tieppo *et al.*, 2007) associée à une atteinte rénale (Ortiz *et al.*, 2003 ; Alcaraz *et al.*, 2007) et un syndrome hyperdynamique (Fernando *et al.*, 1998). La stimulation chronique du système rénine angiotensine pour compenser la diminution des résistances périphériques vasculaires associée à une hypovolémie est observée chez les patients et dans des modèles expérimentaux d'hypertension portale (Newby *et al.*, 1998 ; Helmy *et al.*, 2003 ; Ubeda *et al.*, 1994 ; Yang *et al.*, 2002). Ainsi, le système rénine angiotensine pourrait jouer un rôle dans la genèse du statut hyperdynamique observée.

L'ensemble de cette étude originale nous permettra de mieux comprendre la physiopathologie et permettront peut être d'offrir de nouvelles voies thérapeutiques notamment pour traiter les complications associées à ces pathologies.

TITLE PAGE**Losartan prevents portal hypertension induced, redox-mediated endothelial dysfunction in the mesenteric artery in rats****Short Title: Losartan effect in cirrhotic rat mesenteric artery**

Stéphanie Dal-Ros^{*1}, Monique Oswald-Mammosser^{*2}, Tatiana Pestrikova², Christa Schott¹, Nelly Boehm³, Christian Bronner¹, Thierry Chataigneau¹, Bernard Génay² and Valérie B. Schini-Kerth¹

¹ UMR CNRS 7213 Laboratoire de Biophotonique et de Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch, France.

² Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Pôle de Pathologie Thoracique, et EA 3072, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France.

³ Institut d'Histologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg and INSERM U666, France

* the two authors have contributed equally

Authors' involvement with the manuscript :

- S. Dal-Ros : acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript
- M. Oswald-Mammosser : acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript, study concept
- T. Pestrikova : acquisition of data
- C. Schott : technical support
- N. Boehm : acquisition and interpretation of data (histology)
- C. Bronner : acquisition of data (real-time RT-PCR), critical revision of the manuscript

- T. Chataigneau : study concept
- B. Geny : critical revision of the manuscript
- V.B. Schini-Kerth : study concept and design, study supervision, critical revision of the manuscript

Grant Support: Stéphanie Dal-Ros is supported in part by a fellowship from Région Alsace (France) and Monique Oswald-Mammoser by a “Contrat de Praticien de Recherche associé au CNRS”.

List of Abbreviations: ACh: acetylcholine, APA: apamin, AT1: type 1 of angiotensin II receptor, CBDL: common bile duct ligation, CTX: charybdotoxine, Cx: connexin, DHE: dihydroethidine, DPI: diphenyleneiodonium, EDHF: endothelium-derived hyperpolarizing factor, eNOS: endothelial nitric oxide synthase, HPS: hepatopulmonary syndrome, KR: Krebs-Ringer, L-NA: N^o-nitro-L-arginine, MnTMPyP: Mn(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin, NO: nitric oxide, O₂⁻: superoxide anions, PE: phenylephrine, RAAS: renin-angiotensin-aldosterone system, ROS: reactive oxygen species, RWPs: red wine polyphenols, SK_{Ca} and IK_{Ca}: small and intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels, SOD: superoxide dismutase, VEGF: vascular endothelial growth factor.

Correspondence: Monique Oswald-Mammoser, Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Pôle de Pathologie Thoracique, et EA 3072, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 1, place de l'Hôpital, BP 426, 67091 Strasbourg Cedex, France
Phone: +33 369550879; Fax: +33 369551826; e-mail: Monique.Oswald@chru-strasbourg.fr

Disclosures : No author has any potential conflicts relevant to the manuscript to disclose

ABSTRACT

Background & Aims: Advanced stages of portal hypertension are characterized by generalized vasodilatation and a hyperdynamic syndrome that leads to complications such as hepatopulmonary syndrome. We assessed the endothelial function—particularly the formation of nitric oxide (NO) and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)—in rats following common bile duct ligation (CBDL) to determine the underlying mechanisms of these processes.

Methods: Reactivity of mesenteric artery rings from male Wistar rats was determined in organ chambers. The expression levels of connexins (Cx37, Cx40, Cx43), potassium channels (IKCa, SKCa), endothelial NO synthase (eNOS), NADPH oxidase subunits and nitrotyrosines were assessed by immunohistochemistry in mesenteric and pulmonary arteries. The vascular formation of reactive oxygen species (ROS) was evaluated using dihydroethidine. Control rats or those that had undergone CBDL were given either the NADPH oxidase inhibitor apocynin or the angiotensin II receptor 1 (AT1) antagonist losartan.

Results: Decreased EDHF-mediated relaxations to acetylcholine and red wine polyphenols were observed in rats that underwent CBDL, compared to control rats, whereas the level of NO-mediated relaxation was similar between groups. Impaired EDHF-mediated relaxations were associated with reduced vascular expression of Cx37, Cx40, Cx43, IKCa, and SKCa; increased expression of eNOS and NADPH oxidase subunits; and increased vascular formation of ROS and peroxynitrites. These effects were prevented by exposure to apocynin or losartan.

Conclusions: CBDL is associated with reduced EDHF-mediated relaxations in the mesenteric

artery whereas NO-mediated relaxations persisted. These findings indicate that impaired EDHF-mediated relaxation involves an excessive vascular oxidative stress, most likely following activation of AT1 receptors.

BACKGROUND & AIMS

Chronic liver diseases are characterized by a progressive vasodilatation, which is especially observed in the splanchnic and the pulmonary beds. The vasodilatation is due to portal hypertension associated either to cirrhosis or to extrahepatic portal venous obstruction without liver cirrhosis¹. In a rat model of partial portal vein ligation, Abraldes *et al*¹ reported that the initial event due to portal hypertension is an upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the intestinal microcirculation. The mechanism involved in the occurrence of the subsequent generalized vasodilatation and hyperdynamic syndrome are incompletely understood, although animal models have led to a number of hypotheses.²⁻⁵ Several lines of evidence support a role for an increased formation of NO in the occurrence of the general vasodilatation in chronic liver diseases in patients and also in the chronic bile duct ligated (CBDL) rat model.^{2-4,6-10}

In addition to vasodilatation, there is a sodium and water retention leading to an increased cardiac output with a hyperdynamic syndrome.^{11,12} Sodium and water retention have been reported to be due to a hepatorenal reflex with stimulation of the renal renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) consecutively to a decreased portal venous blood flow¹³ and/or to the compensatory activation of the sympathetic nervous system and the RAAS due to decreased central blood volume. Chronic activation of the RAAS has been observed in cirrhotic patients^{14,15} and also in experimental portal hypertension.¹⁶

Chronic liver diseases are also characterized by an increased formation of reactive oxygen species (ROS).^{17,18,19} This has been observed in decompensated liver cirrhotic patients¹⁹ as indicated by an increased superoxide anion level in whole blood and also in experimental models of portal hypertension^{17,18} as indicated by an increased urinary F₂-isoprostanes, increased lipoperoxidation and decreased superoxide dismutase (SOD) in lung homogenates.

The generalized vasodilatation leads to complications and especially to a hepatopulmonary syndrome (HPS) in about 10-15% of patients awaiting liver transplantation.²⁰ The HPS is characterized by arterial deoxygenation due to intrapulmonary vascular dilatations in the context of liver disorder. Its occurrence in patients with liver diseases is of prognostic value for their survival before and also after liver transplantation.^{20,21} It resolves in most cases with liver transplantation²¹ but having an efficient approach to improve the hyperdynamic syndrome and especially the HPS is of great clinical importance since this could ameliorate survival or even delay liver transplantation in some cases.

Therefore, the aim of the present study was to investigate the mechanisms underlying vasodilatation of the splanchnic and pulmonary vascular beds with a special attention to oxidative stress and the RAAS in an animal model of biliary cirrhosis with portal hypertension.

METHODS

The study was performed in accordance 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).

Animal models. Male Wistar rats (10-12 weeks old) were anaesthetized with an intraperitoneal mixture of ketamine (80 mg.kg body wt⁻¹) and xylazine (4 mg.kg body wt⁻¹). Biliary cirrhosis was induced by CBDL. After laparotomy, the bile duct was isolated, double ligated and resected between the two ligatures. Sham rats had laparotomy, underwent mobilization of the common bile duct without ligation. After surgery, rats were housed in a thermo-neutral environment, on a 12:12 h photoperiod and were provided food and water at libitum.

Protocols. In a first set of experiments, 7 CBDL rats and 5 sham rats were treated, one week before and 4 weeks following surgery with apocynin (a NADPH oxidase inhibitor) at a dose of 100 mg. body wt⁻¹ daily, given in the drinking water. Five CBDL rats and 5 sham rats served as controls. In the second set of experiments, 7 CBDL rats and 5 sham rats were treated, also one week before and 4 weeks following surgery with the angiotensin II receptor AT1 antagonist losartan at a dose of 10 mg. body wt⁻¹, given in the drinking water.

Studies. Four weeks after surgery the rats were sacrificed. After excision, the mesenteric artery was placed in Krebs-Ringer (KR) bicarbonate solution for the subsequent determination of vascular reactivity using organ chambers. The liver and the spleen were removed and weighted. After excision, heart and lungs were placed in KR solution. Liver (taken from the median lobe) samples from each animal were put in Bouin-Holland fixative and embedded in paraffin for histological analysis. The right pulmonary artery and the main

superior mesenteric artery were cleaned, embedded in Tissu-Tek O.C.T. compound and snap-frozen for immunohistochemistry and measurement of ROS.

Assessment of biliary cirrhosis and portal hypertension. Five μm -thick sections of liver samples were stained with hematoxylin and eosin and evaluated by light microscopy. Ten photographs were taken from each liver sample and the area occupied by the biliary ducts was evaluated from each photograph using the Image-J software (<http://rsweb.nih.gov/ij/>). The final result for each rat was the mean of the 10 evaluations and was expressed in percentage of the whole area of the photographs. Portal hypertension was reflected by an increased spleen weight.

Vascular reactivity studies. The main superior mesenteric artery was cleaned of connective tissue and cut into rings (2-3 mm in length). Rings were suspended in organ baths containing oxygenated (95% O_2 , 5% CO_2) KR bicarbonate solution for the determination of changes in isometric tension as described previously.²² Briefly, the rings were stretched step by step until an optimal resting tension of 1 g was reached and then allowed to equilibrate for at least 60 min. After the equilibration period, the rings were exposed to high K^+ -containing KR bicarbonate solution (80 mmol/L) until reproducible contractile responses were obtained. Thereafter, the rings were precontracted with phenylephrine (PE) (1 $\mu\text{mol/L}$) to about 80% of the maximal contraction by high K^+ solution before addition of acetylcholine (ACh) (1 $\mu\text{mol/L}$) to check the presence of a functional endothelium. After washout and a further 30-min equilibration period, rings were again contracted with PE before the construction of a concentration-relaxation curve to either ACh (0.1 nmol/L to 10 $\mu\text{mol/L}$), red wine polyphenols (RWPs, 0.1 to 300 $\mu\text{g/mL}$), sodium nitroprusside (an exogenous NO donor, 0.1 nmol/L to 10 $\mu\text{mol/L}$) or levcromakalim (an ATP-sensitive K^+ channel opener, 0.1 nmol/L to 10 $\mu\text{mol/L}$). Sodium nitroprusside- and levcromakalim-induced relaxations were examined in

endothelium-denuded rings of mesenteric artery. In some experiments, rings were exposed to an inhibitor for 30 min before contraction with PE. The global relaxation was defined as the relaxation obtained in the absence of inhibitors. The NO-mediated component of relaxation was recorded in the presence of indomethacin (10 $\mu\text{mol/L}$) and charybdotoxin (CTX) plus apamin (APA) (100 nmol/L each) to inhibit the formation of prostanoids and EDHF, respectively. The EDHF-mediated component of relaxation was studied in the presence of indomethacin (10 $\mu\text{mol/L}$) and N^o-nitro-L-arginine (L-NA, 100 $\mu\text{mol/L}$) to inhibit the formation of prostanoids and NO, respectively. Relaxations were expressed as percentage of the reversal of the contraction induced by PE.

Immunohistochemical studies. Frozen mesenteric and pulmonary artery segments were cryosectioned at 14 μm and fixed with 4% paraformaldehyde. Fixed sections were incubated with antibodies directed against either connexins (Cx37, Cx40 and Cx43; 1/100 to 1/200), which form myoendothelial gap junctions transmitting hyperpolarization to the smooth muscle cells, small and intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (SK_{Ca} and IK_{Ca} respectively, 1/100) involved in the EDHF formation, eNOS (1/100), NADPH oxidase subunits (p22phox and nox1, 1/100) or nitrotyrosine (1/100). IgG coupled to Alexa 488 was used as secondary antibody. The level of fluorescence in each section was examined under a confocal laser-scanning microscope (MRC-1024; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) with a 40 \times epifluorescence objective (Nikon, Tokyo, Japan). After excitation at 488 nm with a Krypton/Argon laser, emission signal was recorded with a Zeiss 565-610 nm filter. Images were analysed by the Confocal AssistantTM (Sharp 2000 software, Bio-Rad Laboratories). After a 3-D projection and average each pixel value, the intensity value of fluorescence was recorded considering an intensity level threshold (Minimum, 0; Maximum, 255).

Quantitative Real-Time RT-PCR Analysis. Total RNA was extracted from rat main mesenteric arteries using the RNeasy Micro KIT (QIAGEN S.A., Courtaboeuf, France). One microgram of total RNA was reverse transcribed by a modified Moloney murine leukaemia virus-derived reverse transcriptase using the iScript cDNA synthesis kit according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad). Real-time PCR was performed using the protocol recommended for the iQ SYBR Green Supermix from Bio-Rad in a MyIQ thermocycler (Bio-Rad). Primers (Sigma Proligo; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were designed with the help of the sequences of rat Cx37, potassium channel IK_{Ca} , and r18S deposited in GenBank (Accession nos. M76532, AF190458, NM_213557.1 for Cx37, IK_{Ca} , and r18S, respectively). The sequences of the primers were: Cx37, forward, 5'-TCGAGTGTAACACAGCCAG-3' and reverse, 5'-CGCCGAGACAGGTAAATGA-3'; IK_{Ca} (SK4), forward 5'-GAGAGGCAGGCTGTCAATG-3' and reverse, 5'-GGGATCCTTCCTTCGAGTG-3' and r18S, forward, 5'-TCCCCGAGAAGTTTCAGCACATCC-3' and reverse 5'-CTTCCCATCCTTCACGTCCTTCTG-3'. The cycle conditions comprised a 3-min period of polymerase activation at 95°C and 42 cycles at 95°C for 15 s, 15 s at 60°C, and 15 s at 72°C. Analysis of DNA melting curves demonstrated a single peak for the whole set of primers. Amplification products were size controlled on a 2% gel agarose. Quantitative data were normalized relative to the internal housekeeping control *r18S* gene. Results are expressed as percentage of mRNA of Cx37 and IK_{Ca} in CBDL-rats compared with Sham-rats.

Determination of vascular formation of ROS. The oxidative fluorescent dye dihydroethidine (DHE) was used to evaluate *in situ* formation of ROS by a method described by Sarr et al.²³ Mesenteric and pulmonary arteries were cut into 25 µm thick sections, treated with DHE (2.5 µmol/L) and incubated in a light-protected humidified chamber at 37°C for 30 min. Some rings were treated with a pharmacological modulator before the addition of DHE including the superoxide dismutase (SOD) analogue Mn(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin (MnTMPyP) (100 µmol/L), the inhibitor of flavin-dependent enzymes diphenyleneiodonium (DPI, 30 µmol/L), the NADPH oxidase inhibitor apocynin (300 µmol/L), the eNOS inhibitor N^o-nitro-L-arginine (L-NA, 300 µmol/L). The level of ROS was determined using a confocal laser-scanning microscope (Bio-Rad MRC-1024) and the Confocal AssistantTM (Sharp 2000 software).

Products. Antibodies were purchased as indicated: anti-rat connexin-37 polyclonal antibody (Alpha Diagnostic, San Antonio, USA), anti-mouse connexin-40 polyclonal antibody (Chemicon, Temecula, USA), anti-rat connexin-43 polyclonal antibody (Zymed, San Francisco, USA), anti-K_{Ca}3.1 (Intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel 4, IK_{Ca}) and anti-K_{Ca}2.3 (Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel 3, SK_{Ca}) (Alomone Labs, Jerusalem, Israel), antibody directed against p22phox and nox1 NADPH oxidase proteins (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), purified mouse anti-eNOS (BD Transduction Laboratories TM, San Jose, USA), nitrotyrosine (Millipore, Upstate Cell Signaling, Billerica, USA), Alexa fluo-488 labelled to goat anti-mouse or -rabbit IgG (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, USA).

Chemicals. Apamin (APA) and charybdotoxine (CTX) were from Latoxan (Valence, France). L-NA, indomethacin, ACh, sodium nitroprusside, levromakalim, DPI, apocynin were from Sigma-Aldrich. The SOD mimetic MnTMPyP was provided by Alexis Biochemicals Corporation (San Diego, CA, USA). Losartan was a gift from Laboratory Merck Sharp & Dohme Chibret (Paris).

*Preparation of Red Wine Polyphenols (RWPs).*²³ RWPs dry powder, obtained from French red wine (Corbières A.O.C., France), was 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, Montpellier, France). One liter of red wine produced 2.9 g of RWPs, which contained 471 mg/g total phenolic compounds expressed as gallic acid. The extract contained 8.6 mg/g catechin, 8.7 mg/g epicatechin, dimers (B1, 6.9 mg/g; B2, 8.0 mg/g; B3, 20.7 mg/g; B4, 0.7 mg/g), anthocyanins (malvidin-3-glucoside, 11.7 mg/g; peonidin-3-glucoside, 0.66 mg/g; cyanidin-3-glucoside,

0.06 mg/g), and phenolic acids (gallic acid, 5.0 mg/g; caffeic acid, 2.5 mg/g; caftaric acid, 12.5 mg/g).

Statistical analysis. Values were expressed as means \pm SEM. Statistical evaluation was performed with Student's *t* test for paired data or analysis of variance followed by Fischer's protected least significant difference test to compare two treatments where appropriate using Statview software (SAS Institute Inc., USA). Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

RESULTS

Characteristics and histologic findings. Four weeks after surgery, CBDL rats showed an increase in liver and spleen weight and a clear bile duct proliferation (Table 1).

Selective inhibition of EDHF-mediated relaxation in CBDL rat mesenteric artery rings. The cumulative addition of ACh caused concentration-dependent relaxations in mesenteric artery rings from both control and CBDL rats (Figures 1A, B). The global and the NO-mediated component of the relaxation were not significantly different between the sham and CBDL rats (maximal global relaxation: $97.4 \pm 1.4\%$ vs $94.9 \pm 2.4\%$, respectively, $p=0.7$, data not shown; maximal NO relaxation: $86.7 \pm 8.1\%$ vs $90.9 \pm 2.5\%$, respectively, $p=0.8$; Figure 1A). In contrast, the EDHF-mediated component of relaxation (Figure 1B), was significantly decreased in mesenteric artery rings from CBDL rats (maximal relaxant effect: $56.3 \pm 8.8\%$ vs $22.4 \pm 11.2\%$, in sham vs CBDL, $p=0.001$). Similar results (Figures 1C, D) were observed with RWPs (maximal relaxant effect: $54.8 \pm 8.8\%$ vs $6.4 \pm 6.6\%$ in sham vs CBDL, $p=0.003$; Figure 1D). In addition, CBDL in rats did not affect relaxations evoked by either sodium nitroprusside (0.1 nmol/L to 10 μ mol/L, maximal relaxant effect: $103.0 \pm 1.2\%$ vs $100.5 \pm 4.8\%$ in sham vs CBDL, $p=0.3$), an exogenous donor of NO, or by levcromakalim (0.1 nmol/L to 10 μ mol/L, maximal relaxant effect: $94.5 \pm 7.0\%$ vs $105.8 \pm 5.6\%$ in sham vs CBDL, $p=0.7$), an ATP-sensitive K^+ channel opener (data not shown).

Reduced expression of connexins Cx37, Cx40, Cx43 and potassium channels IK_{Ca} and SK_{Ca} in the CBDL rat mesenteric arterial wall. The expression of connexins Cx37, Cx40, Cx43, which form myoendothelial gap junctions and transmit hyperpolarization to the smooth muscle, and potassium channels IK_{Ca} and SK_{Ca} , involved in EDHF formation, was assessed by immunohistochemistry. Cx37 was observed throughout the arterial wall in

mesenteric arteries from sham rats whereas Cx40 and Cx 43 were mainly detected in the endothelial layer like IK_{Ca} and SK_{Ca} (Figure 2). The expression of all three connexins and that of the two potassium channels was significantly reduced to 61.6±9.8% for Cx37 (p=0.001), 62.2±12.3% for Cx40 (p=0.04), 70.4±3.6% for Cx43 (p=0.004), 65.7±4.6% for IK_{Ca} (p=0.001) and 63.3±9.4% for SK_{Ca} (p=0.01) of control values (100%) in CBDL rats (Figure 2). In addition, quantitative Real-Time RT-PCR indicated that mRNA levels for Cx37 and IK_{Ca} were significantly decreased by 54.4±8.3 and 63.1±18.6%, respectively in the mesenteric artery of CBDL rats compared to control rats (n = 3-7). In contrast, mRNA levels for SK_{Ca} could not be detected due to extremely low levels, and those for Cx40 and Cx43 due to technical problems.

Increased ROS and upregulation of eNOS and NADPH oxidase subunits in CBDL rats. CBDL caused a marked increase of the basal fluorescent DHE signal in the mesenteric arterial wall indicating an increased formation of ROS throughout the arterial wall (3204±669% in CBDL of control values observed in sham rats, p=0.02, Figure 3A). In addition, eNOS expression (Figure 3B) was increased by 265±58.2% (p=0.02) in CBDL rats, and this effect was associated with an enhanced formation of peroxynitrites, as assessed by nitrotyrosine fluorescence (588±101% in CBDL, p= 0.001, Figure 3C).

MnTMPyP (a membrane permeant SOD analogue), DPI (an inhibitor of flavin-dependant enzymes), apocynin (an inhibitor of NADPH oxidase) and L-NA (an inhibitor of eNOS) inhibited the formation of ROS, which was reduced to 43±14%, 228±46%, 161±50% and 98±25% vs 494±77% observed in CBDL rats (p<0.01, Figure 4). Moreover, the expression level of the subunits p22phox and nox1 of NADPH oxidase, the major vascular enzymatic source of ROS, was increased to 215±14% and 439±34% of control values in sham rats (100%), respectively in the CBDL rats (p<0.001, Figure 3D).

In the pulmonary arterial wall, CBDL caused also an increased expression of eNOS (664±101%) and formation of ROS (1596±239%) and nitrotyrosine (1353±190%) (p<0.001; Figures 5A, B, C). The CBDL-induced formation of ROS was inhibited by MnTMPyP and reduced to 29±4% of control value (p<0.001, Figure 5D) indicating a major role of superoxide anions (O₂⁻).

Apocynin and losartan normalised the EDHF-mediated relaxation in CBDL rats.

The inhibitory effect of CBDL on ACh and RWPs-induced EDHF-mediated relaxations was prevented by apocynin and losartan (maximal relaxation to ACh: 56.1±11.6% and 74.4±3.0% vs non-treated CBDL (22.4±11.2%), p<0.001 respectively; maximal relaxation to RWPs: 39.1±14.7% and 55.4±4.7% vs non-treated CBDL (6.4±6.6%), p<0.001 respectively, Figure 6). Apocynin and losartan in sham rats did not affect relaxations to ACh or RWPs (maximal relaxation to ACh: 41.8±10.9% vs 56.3±8% for apocynin, p=0.4 and 68.6±14.7% vs 56.3±8% for losartan, p=0.4; maximal relaxation to RWPs: 45.4±11.8% vs 54.8±8.8% for apocynin, p=0.5, and 72.5±7.2% vs 54.8±8.8% for losartan, p=0.2; data not shown). The possibility that apocynin and/or losartan are able to prevent the CBDL-induced decreased vascular expression of connexins and potassium channels was assessed by immunohistochemistry. Both treatments prevented the downregulation of connexins and potassium channels induced by CBDL (Figure 2). Treatments respectively maintain the expression to 113±10% and 123±11% for Cx37 (p<0.01); 105±25% and 121±17% for Cx40 (p<0.03); 126±7% and 121±7% for Cx43 (p<0.001); 140±12% and 127±18% for IK_{Ca} (p<0.01); 120±7% and 114±10% for SK_{Ca} (p<0.01) of control values observed in Sham rats, in CBDL mesenteric artery.

Apocynin and losartan prevented the overexpression of eNOS and the formation of ROS and peroxynitrite in CBDL rats. Apocynin and losartan treatments prevented the CBDL formation of ROS, peroxynitrite and also the overexpression of eNOS in mesenteric arteries

(respectively, $141 \pm 8\%$ and $120 \pm 10\%$ for ROS, $p < 0.04$; $111 \pm 8\%$ and $108 \pm 7\%$ for peroxynitrite, $p < 0.001$; $99 \pm 13\%$ and $113 \pm 15\%$ for eNOS, $p < 0.04$; Figure 3) and pulmonary arteries (respectively, $354 \pm 50\%$ and $199 \pm 34\%$ for ROS; $182 \pm 83\%$ and $312 \pm 59\%$ for peroxynitrite; $160 \pm 21\%$ and $160 \pm 23\%$ for eNOS; $p < 0.001$; Figure 5). Moreover, apocynin and losartan prevented the overexpression of NADPH oxidase subunits in the mesenteric artery of CBDL rats (respectively, $122 \pm 3\%$ and $145 \pm 15\%$ for p22phox; $146 \pm 18\%$ and $199 \pm 24\%$ for nox1; $p < 0.001$; Figure 3D). Administration of apocynin and losartan in sham rats did not affect the low basal fluorescence signal of eNOS, ROS and peroxynitrite (respectively in mesenteric artery: $64 \pm 7\%$ $p = 0.08$ and $77 \pm 19\%$ $p = 0.2$ for eNOS; $79 \pm 18\%$ $p = 0.8$ and $97 \pm 13\%$ $p = 0.3$ for ROS; $102 \pm 9\%$ $p = 0.9$ and $105 \pm 11\%$ $p = 0.9$ for peroxynitrite; respectively in pulmonary artery: $129 \pm 16\%$ $p = 0.6$ and $85 \pm 11\%$ $p = 0.8$ for eNOS; $94 \pm 16\%$ $p = 0.5$ and $68 \pm 37\%$ $p = 0.7$ for ROS; $129 \pm 16\%$ $p = 0.8$ and $121 \pm 31\%$ $p = 0.7$ for peroxynitrite; data not shown).

DISCUSSION

The major findings of the present study indicate that CBDL in rats is associated with a decrease in EDHF-mediated relaxations in the mesenteric artery related to an increased formation of ROS, expression of eNOS and formation of peroxynitrite in the mesenteric and pulmonary arterial wall and that these effects are prevented by apocynin and losartan.

Several studies have indicated that CBDL in rats is associated with a general vasodilatation and a hyperdynamic syndrome.^{11,12} NO is thought to play a key role in the general vasodilatation in chronic liver diseases in rats but also in humans.²⁻⁹ Nevertheless, in the present study when assessing the endothelium-dependent NO-mediated component in mesenteric artery rings no difference was observed between CBDL and sham rats but, and rather surprisingly, a reduced EDHF-mediated component was observed in CBDL rats. NO-mediated relaxation was not altered although an increased expression level of eNOS was observed in both the pulmonary and the mesenteric arteries. The increased expression of eNOS was not unexpected since it has also been reported previously in the lungs of CBDL rats by the group of Fallon.^{3,4} In the present study, NO-mediated relaxation was not impaired in CBDL possibly due to degradation of the excessive formation of NO by superoxide anions leading to peroxynitrites.

An EDHF-dependent inhibition of contraction has been reported in mesenteric arteries exposed to inhibitors of eNOS and cyclooxygenase by Barrière *et al.*²⁵ as indicated by a diminished response to the $\alpha 1$ -adrenoceptor agonist PE in CBDL in comparison to sham rats in the presence of L-NA and indomethacin. This hyporeactivity was suppressed by APA and CTX suggesting that EDHF blunts contractile responses leading to the hyporeactivity in CBDL rats. In an interesting study assessing isolated perfused lung reactivity in CBDL rats, Carter *et al.*²⁶ observed that blunted hypoxic pressure responses involved K_{Ca} channels since

the addition of APA and CTX to the perfusate normalized the response to hypoxic vasoconstriction. These reports are in contrast to the present ones showing blunted EDHF-mediated responses but may perhaps be explained by the fact that reactivity was assessed in whole perfused lungs in the study by Carter *et al.*²⁶, by the use of a different rat strain (Sprague Dawley rats in the study by Barrière *et al.*²⁵ and Carter *et al.*²⁶, Wistar rats in the present work), and the use of different stimuli (hypoxia vs ACh, RWPs). It is possible that the decreased EDHF-mediated relaxation reflects a compensatory mechanism of the increased endothelial formation of NO in order to maintain normal the global relaxation. Such a delicate balance has been proposed to occur in eNOS knock out mice, and in rat pulmonary hypertension where a reduced formation of NO is associated with an upregulation of EDHF-mediated relaxation in resistance arteries.^{27,28} In addition, besides NO, other factors may contribute to the vasodilatation in cirrhosis. Such a possibility is supported in patients and in the CBDL rat model where an increased haeme oxygenase, which catalyses the production of the vasodilator carbon monoxide, has been observed.^{4,24}

In healthy arteries, IK_{Ca} and SK_{Ca} and myoendothelial gap junctions formed by Cx37, Cx40, Cx43 play a major role in the EDHF-mediated component of relaxation.²² The present findings demonstrate that CBDL in rats caused the down-regulation by about 50% of the expression of IK_{Ca} and SK_{Ca} and connexins Cx37, Cx40 and Cx43. It is noteworthy to mention that the decreased EDHF-mediated relaxation is observed both with ACh and RWPs suggesting that the abnormalities induced by CBDL involve an alteration of potassium channels expression and of the intercellular coupling by gap junctions rather than an abnormal function in the calcium and PI3-kinase/Akt signaling pathway in endothelial cells. One of the potential mechanisms leading to impaired K_{Ca} channels function²⁹ and gap junction communication³⁰ is oxidative stress, which has been reported in cirrhotic patients¹⁹ and in experimental models of portal hypertension.^{17,18} The results of the present study suggest that

decreased EDHF-mediated relaxation and oxidative stress may be related. Indeed, treatment with apocynin normalized the vascular formation of ROS and peroxynitrite and this restored EDHF-dependent relaxation as well as the expression of K channels and connexins. A role for the oxidative stress is also supported by the fact that N-acetylcysteine prevented the development of the hyperdynamic circulation in portal hypertensive rats together with a reduction in the increased urinary F₂-isoprostanes which were measured as a marker of oxidative stress.¹⁸ In the study of Vercelino *et al.*¹⁷, treatment with N-acetylcysteine led to decreased lipoperoxidation measured by thiobarbituric acid-reactive substances assay and increased SOD activity measured in lung homogenates. Moreover, a reduced pulmonary artery vasodilatation was observed on lung histologic samples.¹⁷ The present results also suggest that increased eNOS in CBDL is due to excessive oxidative stress since apocynin treatment normalized ROS and eNOS levels.

Another important finding of the present study is the fact that losartan, an antagonist of AT1 receptors, prevented the CBDL-induced endothelial dysfunction as indicated by normal EDHF-mediated relaxations in mesenteric artery rings. In addition, the losartan treatment not only restored endothelium-dependent relaxations but also prevented the upregulation of eNOS and the excessive oxidative stress in both the mesenteric artery and the pulmonary artery most likely by inhibiting the upregulation of several NADPH oxidase subunits including p22phox and nox1. As a consequence the vascular formation of peroxynitrites was normalized in CBDL rats treated with losartan. Altogether these findings indicate that activation of AT1 receptors is a key event in the CBDL-induced alteration of the endothelial function presumably by inducing the excessive oxidative stress. The present findings are in agreement with previous ones indicating that losartan normalized the expression of eNOS in the aorta of CBDL rats.¹⁶ Furthermore, chronic infusion of Ang II to rats caused an upregulation of eNOS protein levels³⁴ and oxidative stress by increasing the

expression of NADPH oxidase, a major enzymatic source of superoxide anions, in the arterial wall.^{23,35} The upregulation of NADPH oxidase observed in mesenteric arterial walls of CBDL rats was normalized by apocynin but also by losartan. Thus, the protective effect of losartan may be due to the normalization of oxidative stress as indicated by the level of ROS and NADPH oxidase subunits, and subsequent expression level of SK_{Ca} and IK_{Ca} and Cx37, Cx40 and Cx43. Similar results have been reported by Kansui *et al.*³⁶ in spontaneous hypertensive rats where the reduced expression of Cx37 and Cx40 in the endothelial cells of mesenteric arteries was improved with candesartan.

Portal hypertension in both humans and experimental animals is associated with an increased plasma renin activity and/or angiotensin II level.^{14,15,16} Moreover, chronic administration of losartan reduced portal hypertension^{31,32} in patients and improved the hyperdynamic circulation in CBDL rat.^{16,33} Thus, the present findings in conjunction with these previous ones suggest that an increased activation of the RAAS via activation of AT1 receptors triggers the redox-mediated abnormal vascular reactivity at least in the mesenteric artery in CBDL.

In conclusion, the present findings indicate that activation of AT1 receptors is a key event in the CBDL-induced alteration of the endothelial function presumably by increasing the excessive oxidative stress. This leads to an impaired EDHF-mediated relaxation in mesenteric arteries by down-regulation of the expression of connexins and potassium channels. The present results support the view that losartan improves endothelial dysfunction by its antioxidant effect and suggests that AT1 antagonists could be effective in the management of the general vasodilatation and in particular the pulmonary vasodilatation in portal hypertension.

FIGURES LEGENDS

FIG.1: Chronic bile duct ligation (CBDL) induced blunted EDHF-mediated relaxations in mesenteric artery rings. Concentration-relaxation curves to acetylcholine (ACh) and red wine polyphenols (RWPs) in mesenteric artery rings with endothelium in sham—○— and —●— CBDL rats: panels (A) and (C) in the presence of indomethacin and apamin plus charybdotoxin; panels (B) and (D) in the presence of indomethacin and N^o-nitro-L-arginine. Results are shown as mean ± SEM of 5-7 different rats; * p=0.001 and ** p=0.003 for sham vs CBDL.

FIG.2: CBDL induced down-regulation of connexins (panels A-C) and potassium channels (panels D, E) in the mesenteric artery: protective effect of apocynin and losartan. Top, representative immunofluorescent staining; bottom, corresponding cumulative data. Similar results have been observed in four other rats in each group. The lumen is on the right side of each image and bar scale corresponds to 50 μm. * p<0.001 for Cx37 and IK_{Ca}, p=0.04 for Cx40, p=0.004 for Cx43 and p<0.01 for SK_{Ca} when comparing CBDL with sham rats; # p<0.01 for Cx47, IK_{Ca} and SK_{Ca}, p<0.03 for Cx40 and <0.001 for Cx43 when comparing CBDL with treated CBDL rats.

FIG.3: CBDL induced the formation of reactive oxygen species (ROS, panel A) and peroxynitrites (panel C), an upregulation of eNOS (panel B) and NADPH oxidase subunits (panel D) in mesenteric artery: protective effect of apocynin and losartan. Top, representative immunofluorescent staining; bottom, corresponding cumulative data. Similar results have been observed in four other rats in each group. The lumen is on the right side of each image and bar scale corresponds to 50 μm. * p<0.02 and ** p<0.001 for CBDL vs sham

rats, # $p < 0.04$ for ROS and eNOS, $p < 0.01$ for nitrotyrosine and $p < 0.001$ for p22phox and nox1 when comparing CBDL with treated CBDL rats.

FIG.4: Characterization of the CBDL-induced formation of reactive oxygen species (ROS) in mesenteric artery. The effects of MnTMPyP (a SOD analogue), DPI (an inhibitor of flavin-dependent enzymes), apocynin (an inhibitor of NADPH oxidase) and L-NA (an inhibitor of eNOS) are shown. Top, representative immunofluorescent staining; bottom, corresponding cumulative data. Similar results have been observed in four other rats in each group. The lumen is on the right side of each image and bar scale corresponds to 50 μm . * $p < 0.01$ for CBDL vs sham rats, # $p < 0.01$ for CBDL vs treated CBDL rats.

FIG.5: CBDL induced formation of reactive oxygen species (ROS, panel A) and peroxynitrites (nitrotyrosine, panel C), and an upregulation of eNOS (panel B) in the pulmonary artery: effect of MnTMPyP (a SOD analogue). The protective effect of apocynin and losartan is also shown. Top, representative immunofluorescent staining; bottom, corresponding cumulative data. Similar results have been observed in three other rats in each group. The lumen is on the right side of each image and bar scale corresponds to 50 μm . * $p < 0.001$ for CBDL vs sham rats, # $p < 0.001$ for CBDL vs treated CBDL rats ** $p < 0.001$ for control vs MnTMPyP in CBDL rats.

FIG.6: Treatments with either apocynin (panels A, B) or losartan (panels C, D) prevented the blunted EDHF-mediated-relaxation in mesenteric artery rings from CBDL rats. Results are shown as mean \pm SEM of 5-7 different rats. * $p < 0.001$ for CBDL vs treated CBDL rats; NS : not significant .

REFERENCES

1. Abraldes JG, Iwakiri Y, Loureiro-Silva M, et al. Mild increases in portal pressure upregulate vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in the intestinal microcirculatory bed, leading to a hyperdynamic state. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G980-G987.
2. Nunes H, Lebrec D, Mazmanian M, et al. Role of nitric oxide in hepatopulmonary syndrome in cirrhotic rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:879-885.
3. Ling Y, Zhang J, Luo B, et al. The role of endothelin-1 and the endothelin B receptor in the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome in the rat. *Hepatology* 2004;39:1593-1602.
4. Zhang J, Ling Y, Luo B, et al. Analysis of pulmonary heme and oxygenase-1 and nitric oxide synthase alterations in experimental hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 2003;125:1441-1451.
5. Sztrymf B, Rabiller A, Nunes H, et al. Prevention of hepatopulmonary syndrome and hyperdynamic state by pentoxifylline in cirrhotic rats. *Eur Respir J* 2004;23:752-758.
6. Chabot F, Mestiri H, Sabry S, et al. Role of NO in the pulmonary artery hyporeactivity to phenylephrine in experimental biliary cirrhosis. *Eur Respir J* 1996;9:560-564.
7. Gómez FP, Barberà JA, Roca J, et al. Effects of nebulized N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in patients with hepatopulmonary syndrome. *Hepatology* 2006;43:1084-1091.
8. Brussino L, Bucca C, Morello M, et al. Effect on dyspnoea and hypoxaemia of inhaled N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in hepatopulmonary syndrome. *Lancet* 2003;362:43-44.

9. Schenk P, Madl C, Rezaie-Majd S, et al. Methylene blue improves the hepatopulmonary syndrome. *Ann Intern Med* 2000;133:701-706.
10. Rolla G, Brussino L, Colagrande P, et al. Exhaled nitric oxide and impaired oxygenation in cirrhotic patients before and after liver transplantation. *Ann Intern Med* 1998;129:375-378.
11. Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. The role of central blood volume in the development of sodium retention in portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 1996;110:193-198.
12. Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver disease : from the patient to the molecule. *Hepatology* 2006;43:S121-S131.
13. Ming Z, Smyth DD, Lauth WW. Decreases in portal flow trigger a hepatorenal reflex to inhibit renal sodium and water excretion in rats: role of adenosine. *Hepatology* 2002;35:167-175.
14. Newby DE, Wright RA, Dawson P, et al. The L-arginine/nitric oxide pathway contributes to the acute release of tissue plasminogen activator in vivo in man. *Cardiovasc Res* 1998;38:485-492.
15. Helmy A, Newby DE, Jalan R, et al. Nitric oxide mediates the reduced vasoconstrictor response to angiotensin II in patients with preascitic cirrhosis. *J Hepatol* 2003;38:44-50.
16. Yang YY, Lin HC, Huang YT, et al. Effect of 1-week losartan administration on bile duct-ligated cirrhotic rats with portal hypertension. *J Hepatol* 2002;36:600-606.
17. Vercelino R, Tieppo J, Dias AS, et al. N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:370-376.

18. Fernando B, Marley R, Holt S, et al. N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat. *Hepatology* 1998;28:689-694.
19. Chen MF, Mo LR, Lin RC, et al. Increase of resting levels of superoxide anion in the whole blood of patients with decompensated liver cirrhosis. *Free Radic Biol Med* 1997;23:672-679.
20. Rodriguez-Roisin R, Krowka MJ, Hervé P, et al. on behalf of the Ers Task Force Pulmonary-Hepatic Vascular Disorders (PHD) Scientific Committee. Pulmonary-Hepatic Vascular Disorders (PHD). *Eur Respir J* 2004;24:861-880.
21. Arguedas MR, Abrams GA, Krowka MJ, et al. Prospective evaluation of outcomes and predictors of mortality in patients with hepatopulmonary syndrome undergoing liver transplantation. *Hepatology* 2003;37:192-197.
22. Dal-Ros S, Bronner C, Schott C, et al. Angiotensin II-induced hypertension is associated with a selective inhibition of EDHF-mediated responses in the rat mesenteric artery. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;328:478-486.
23. Sarr M, Chataigneau M, Martins S, et al. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: Role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res* 2006;71:794-802.
24. Arguedas MR, Drake BB, Kapoor A, et al. Carboxyhemoglobin levels in cirrhotic patients with and without hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 2005;128:328-333.
25. Barrière E, Tazi KA, Rona JP, et al. Evidence for an endothelium-derived hyperpolarizing factor in the superior mesenteric artery from rats with cirrhosis. *Hepatology* 2000;32:935-941.

26. Carter EP, Sato K, Morio Y, et al. Inhibition of K(Ca) channels restores blunted hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats with cirrhosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L903-L910.
27. Waldron GJ, Ding H, Lovren F, et al.. Acetylcholine-induced relaxation of peripheral arteries isolated from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1999;128:653-658.
28. Morio Y, Homma N, Takahashi H, et al. Activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor is augmented in monocrotaline-induced pulmonary hypertension of rat lungs. *J Vasc Res* 2007;44:325-335.
29. Gutterman DD, Miura H, Liu Y. Redox modulation of vascular tone. Focus of potassium channel mechanisms of dilatation. *Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.*2005;25:671-678.
30. Griffith TM, Chaytor AT, Bakker LM, et al. 5-Methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin can modulate electrotonically mediated endothelium-dependent vascular relaxation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102: 7008-7013.
31. Wagatsuma Y, Naritaka Y, Shimakawa T, et al. Clinical usefulness of the angiotensin II receptor antagonist losartan in patients with portal hypertensive gastropathy. *Hepatogastroenterology* 2006;53:171-174.
32. De BK, Bandyopadhyay K, Das TK, et al. Portal pressure response to losartan compared with propranolol in patients with cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:1371-1376.
33. Heller J, Trebicka J, Shiozawa T, et al. Vascular, hemodynamic and renal effects of low-dose losartan in rats with secondary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2005;25:657-666.
34. Hennington BS, Zhang H, Miller MT, et al. Angiotensin II stimulates synthesis of endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension* 1998;31:283-888.

35. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, et al. 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;97:1916–1923.
36. Kansui Y, Fujii K, Nakamura K, et al. Angiotensin II receptor blockade corrects altered expression of gap junctions in vascular endothelial cells from hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H216-H224.

OTHER MANUSCRIPT ELEMENTS

Acknowledgment: We are indebted to Fabienne Goupilleau, Isabelle Bentz and Josiane Meder for their technical assistance.

Table 1: Characteristics of CBDL and Sham rats

	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Biliary density	Liver (% vs total weight)	Spleen (% vs total weight)
Sham rats	339.1±29.6	4138±36.8	0.2±0.06	3.4±0.3	0.20±0.01
CBDL rats	351.1±39.1	4012±31.1	29.4±9.8 *	7.1±1.1 *	0.66±0.1 *
Apocyrin + CBDL rats	322.7±28.6	383±39.6	28.7±8.8 *	7.1±0.7 *	0.65±0.1 *
Losartan + CBDL rats	367.7±11.8	354±39.0	31.3±7.4 *	6.8±0.9 *	0.61±0.1 *

CBDL : chronic bile duct ligation. * : p < 0.002 vs Sham rats

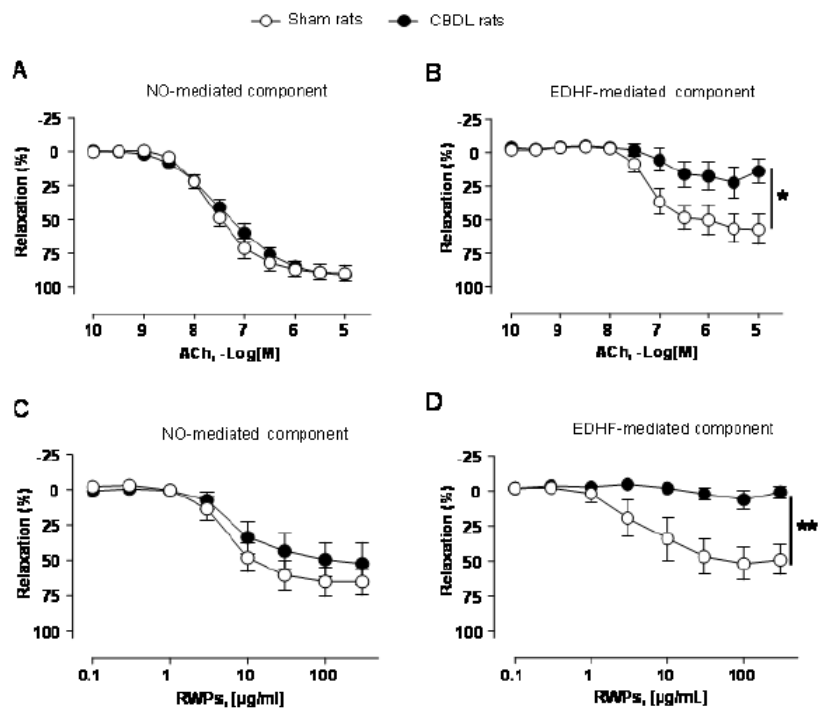


Figure 1

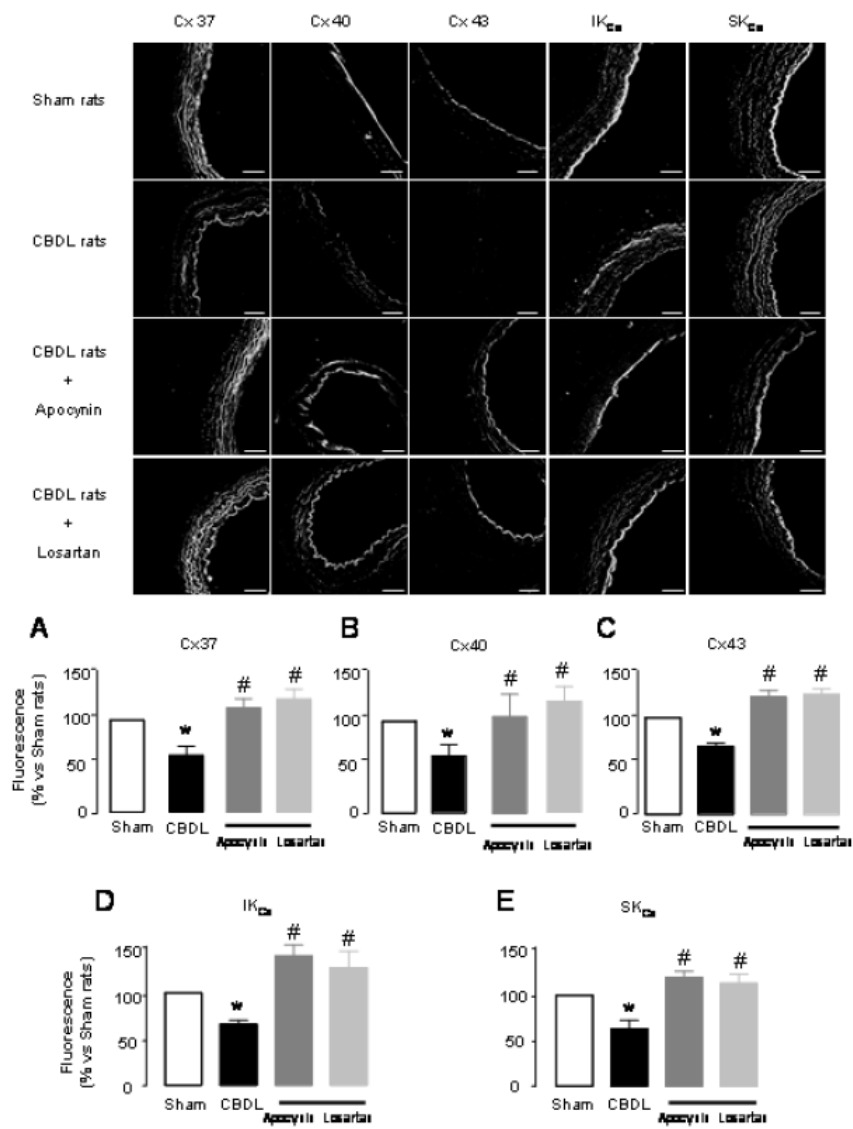


Figure 2

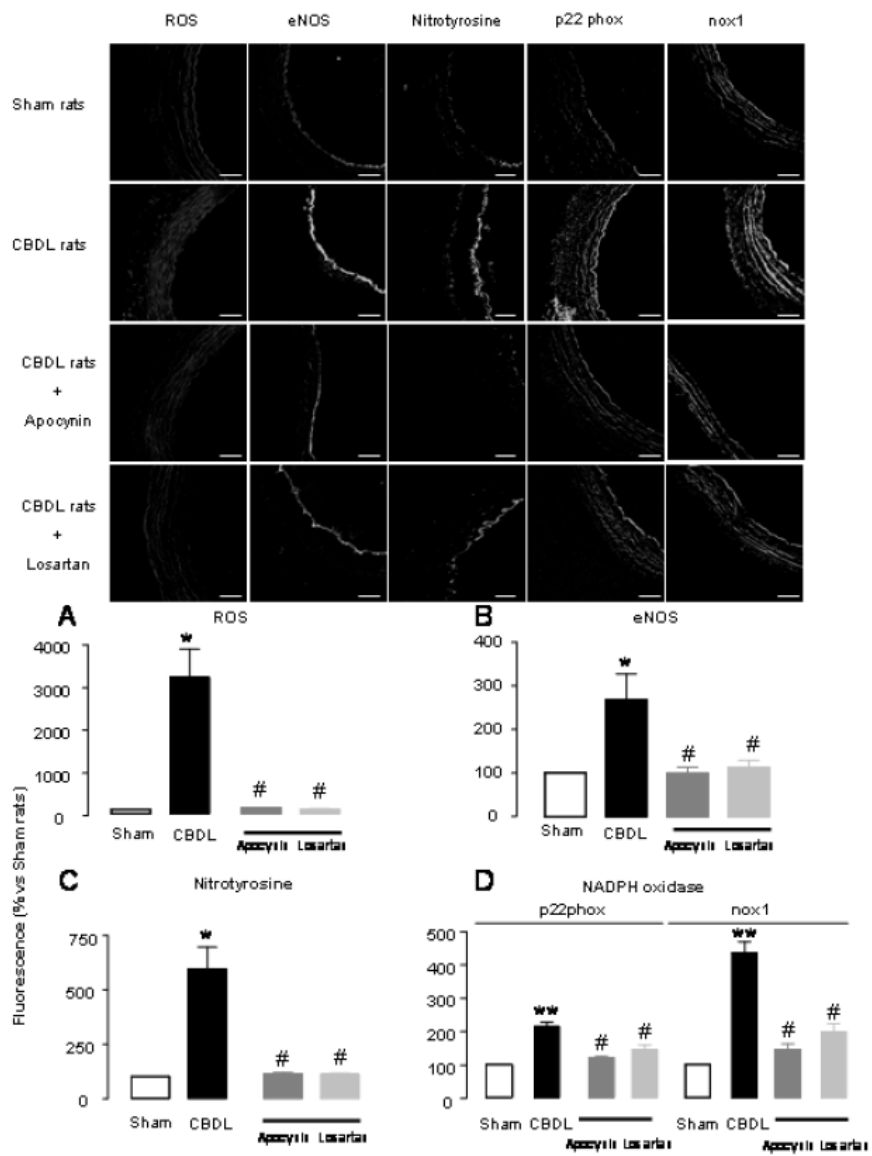


Figure 3

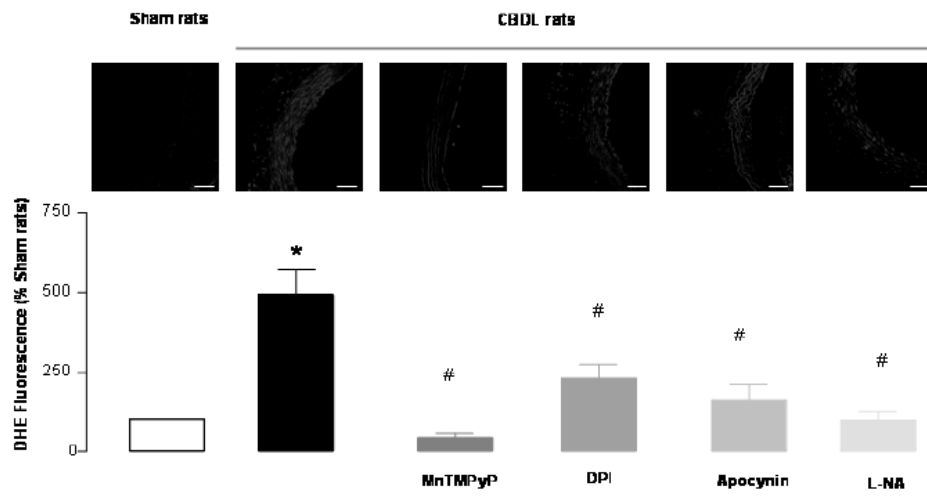


Figure 4

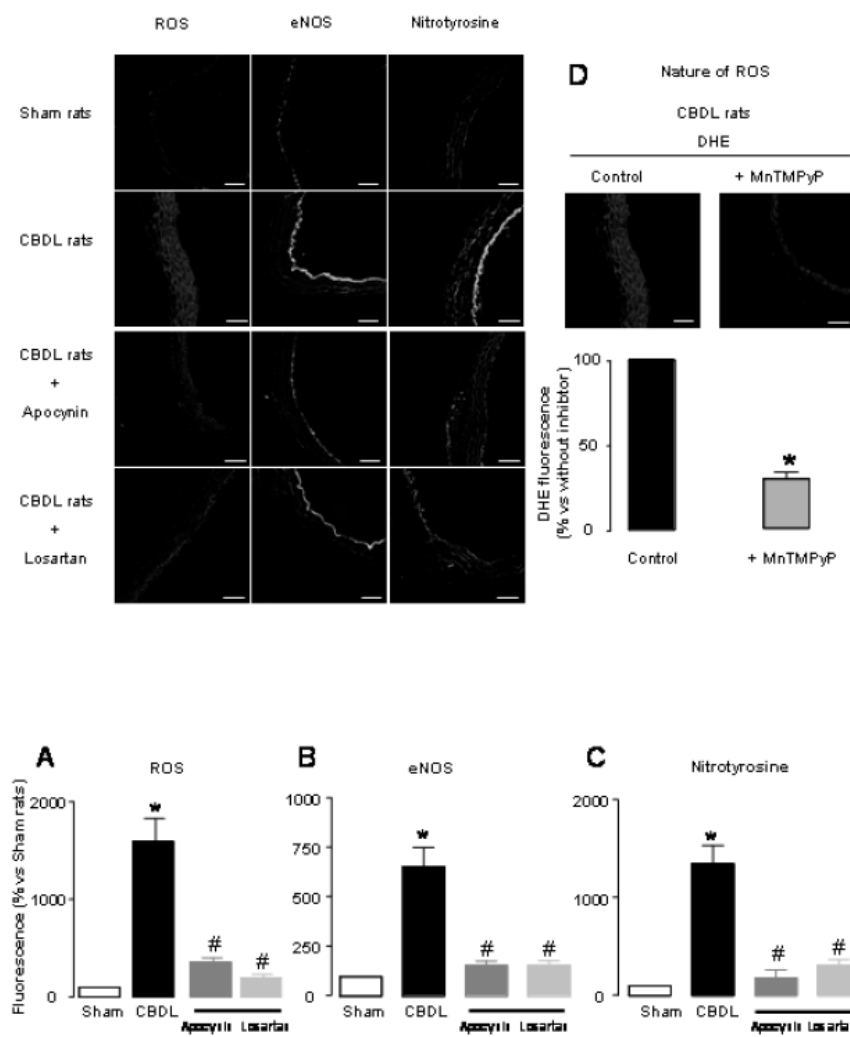


Figure 5

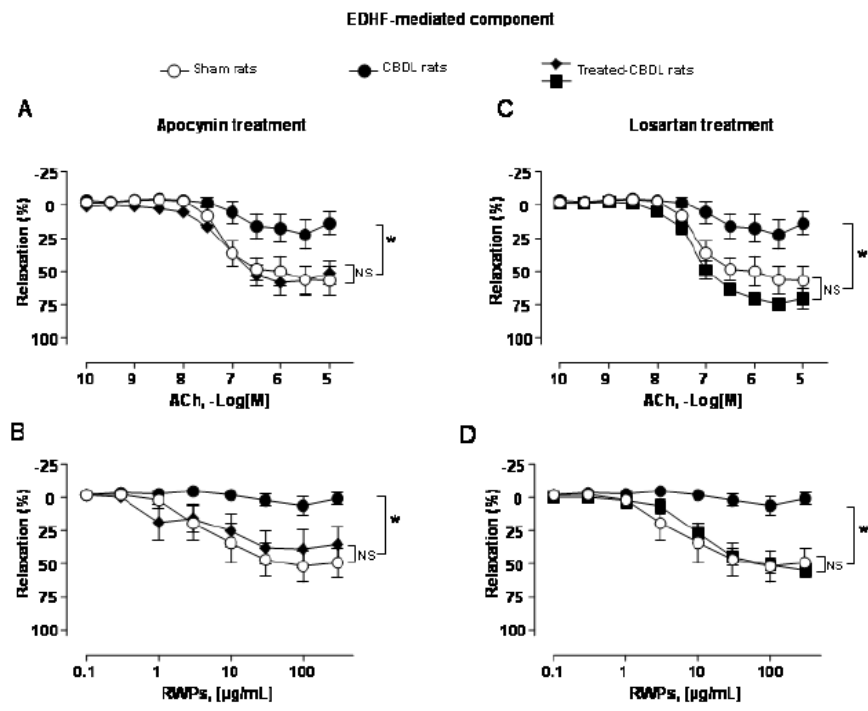


Figure 6

Synthèse des résultats de la publication 3 :

La ligature de la voie biliaire commune chez le rat induit une prolifération biliaire au niveau du foie ainsi qu'une forte augmentation de son poids, signes caractéristiques de la présence d'une cirrhose biliaire. Celle-ci est associée à une hypertension portale comme en témoigne la splénomégalie.

Au niveau vasculaire, une diminution spécifique des relaxations médiées par EDHF est observée dans l'artère mésentérique des rats cirrhotiques. Cette dysfonction endothéliale est indépendante de la nature de l'agoniste utilisé (acétylcholine ou polyphénols du vin rouge), indiquant qu'il n'y a pas de discrimination de la voie de formation d'EDHF (respectivement la voie calcique ou PI₃kinase/Akt). Cette atteinte est associée à une diminution de l'expression des connexines Cx37, Cx40, Cx43 et des canaux potassiques dépendants du calcium IK_{Ca} et SK_{Ca} chez ces animaux.

Des analyses complémentaires ont été réalisées sur les coupes de vaisseaux en microscopie confocale afin d'identifier les cibles moléculaires pouvant rendre compte de la dysfonction endothéliale liée à la cirrhose biliaire et l'hypertension portale dans l'artère mésentérique et dans l'artère pulmonaire. Au niveau de cette dernière nous avons pu :

1) mettre en évidence la formation de ROS et plus particulièrement des anions superoxydes, ainsi que la présence de peroxyde d'hydrogène,

2) caractériser les sources enzymatiques impliquées, la NADPH oxydase et la eNOS découplée. Le manque de tissus biologiques notamment du à la petite taille de l'artère pulmonaire, nous a empêché de compléter ces résultats.

En revanche au niveau de l'artère mésentérique, nous avons pu :

1) confirmer les résultats observés au niveau de l'artère pulmonaire sur un autre lit vasculaire,

2) mettre en évidence aussi la formation de peroxyde d'hydrogène en plus des anions superoxyde et démontrer une augmentation de l'expression de la NADPH oxydase et de la eNOS.

L'utilisation d'un traitement avec l'apocynine, un inhibiteur de la NADPH oxydase et un antioxydant connu, avant de ligaturer la voie biliaire commune, nous a permis de démontrer le rôle primordial du stress oxydant dans la physiopathologie de la cirrhose biliaire associée à

l'hypertension portale. En effet, les animaux traités présentent une fonction endothéliale normale et sans formation de ROS. De plus, l'expression de l'ensemble des protéines (Cx37, Cx40, Cx43, IK_{Ca} et SK_{Ca}, eNOS, NADPH oxydase) est similaire à celle observée chez les animaux contrôles. Ces résultats sont observés au niveau des deux lits vasculaires, mésentérique et pulmonaire. En revanche ce traitement n'empêche le développement de la cirrhose et de l'hypertension portale comme en témoigne l'hépatomégalie et la splénomégalie.

Le traitement avec le losartan, antagoniste de récepteur AT1 à l'angiotensine II, avant la ligature, nous a permis de mettre en évidence l'importance du récepteur AT1 dans cette physiopathologie. Les animaux traités présentent une fonction endothéliale normale, sans formation de ROS et l'expression de Cx37, Cx40, Cx43, IK_{Ca} et SK_{Ca}, d'eNOS, et de la NADPH oxydase est identique à celle des animaux contrôles, au niveau des artères mésentérique et pulmonaire. En revanche, comme l'apocynine, le losartan ne permet pas d'empêcher l'hépatomégalie ni la splénomégalie.

En conclusion, ce deuxième projet a permis de montrer les conséquences similaires sur deux lits vasculaires différents de la cirrhose biliaire associée à l'hypertension portale. Nous avons pu mettre en évidence la présence d'une dysfonction endothéliale spécifique de la composante EDHF associée à une diminution de l'expression des connexines Cx37, Cx40 et Cx43 et des deux canaux potassiques endothéliaux IK_{Ca} et SK_{Ca}. Le prétraitement avec l'apocynine nous a permis de mettre en évidence le rôle important du stress oxydant dans la physiopathologie et nous avons montré un effet bénéfique du losartan sur les complications vasculaires de la cirrhose, en dehors de ses applications thérapeutiques classiques. L'ensemble de ces résultats sera discuté dans la partie « Discussion générale ».

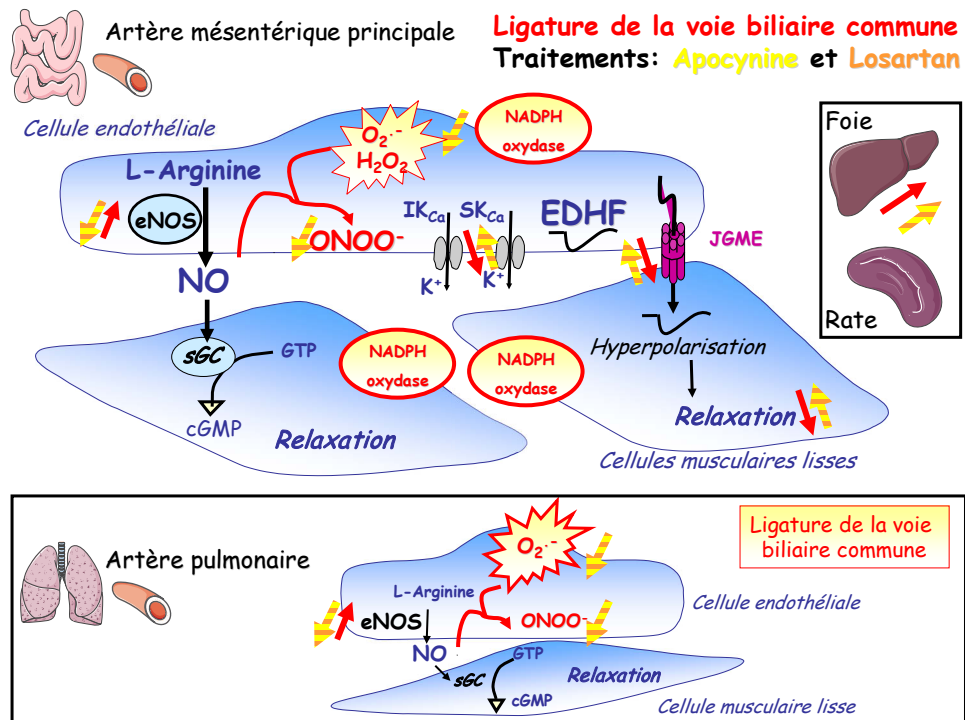


Figure 52 : Schéma récapitulatif des effets de la ligature de la voie biliaire et des traitements préventifs au niveau des artères mésentérique et pulmonaire ainsi que sur le poids du foie et de la rate. EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, eNOS : NO synthase endothéliale, IK_{Ca} et SK_{Ca} : canaux potassiques dépendants du calcium de moyenne et de faible conductance, JGME : jonctions gap myoendothéliales, K⁺ : potassium, NO : monoxyde d'azote, ONOO⁻ : peroxynitrites, O₂⁻ : anions superoxydes, ↑/↓ : effets de la ligature, augmentation ou diminution, ↗/↘ : effets des traitements avec l'apocynine ou le losartan, augmentation ou diminution.

Résultats Expérimentaux

Publications 4 et 5 :

Etude de la fonction endothéliale dans
un modèle de vieillissement *in vivo*
chez le rat : rôle du stress oxydant
et effets protecteurs des polyphénols
du vin rouge

Publication 4 :

Red wine polyphenols prevent aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance

Cardiovascular Research, soumis, 2009

Publication 5 :

Chronic intake of red wine polyphenols improves endothelial dysfunction in the mesenteric artery of old rats: role of NADPH oxidase-derived oxydative stress

American Journal of Physiology, soumis, 2009

Selon l'observatoire du département américain de la Santé, les pays occidentaux connaissent un vieillissement croissant de leur population. Les études épidémiologiques révèlent que le vieillissement, à lui seul et en absence des autres facteurs de risque (*e.g.* diabète, hypertension, hyperhomocystéinémie, hypercholestérolémie), augmente la morbidité et la mortalité cardio-vasculaire. Le risque de mortalité lié aux maladies cardiovasculaires est 80 fois supérieur chez les sujets âgés de 75-84 ans et 270 fois supérieur chez les sujets âgés de plus de 85 ans par comparaison aux sujets âgés de 35-44 ans (National Centre for Health Statistics, 2006).

Nous avons vu que dans les conditions physiologiques, l'endothélium était capable de maintenir l'homéostasie vasculaire via la libération de facteurs relaxants et contracturants qui contrôlent le tonus vasculaire (Vanhoutte, 2003). Dans le cas de modifications de la balance contraction/relaxation, une dysfonction endothéliale se met en place et elle est retrouvée dans la plupart des maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie et le diabète, aussi bien chez l'homme que chez les animaux (Mombouli et Vanhoutte, 1999). De plus, la dysfonction endothéliale jouerait un rôle important dans l'initiation et le développement des pathologies.

Le vieillissement est caractérisé par une détérioration progressive du système cardiovasculaire avec notamment une altération de la fonction endothéliale, aussi bien chez l'homme que chez l'animal (Labinsky *et al.*, 2006). Une diminution, au cours du vieillissement, de la relaxation endothélium-dépendante induite par l'acétylcholine a été observée dans plusieurs

lits vasculaires tels que l'artère brachiale humaine (Taddei *et al.*, 1995), l'aorte (Kung et Luscher, 1995), l'artère carotide (Hongo *et al.*, 1998) et l'artère mésentérique de rat (Atkinson *et al.*, 1994). De nombreux mécanismes moléculaires ont été impliqués dans la dysfonction endothéliale liée à l'âge. L'inhibition de la vasodilatation endothélium-dépendante par le vieillissement concernerait les trois facteurs vasodilatateurs endothéliaux, NO, EDHF et prostacycline (Csiszar *et al.*, 2002). Le vieillissement serait associé à une production accrue d'anions superoxyde, réagissant avec le NO et diminuant ainsi sa biodisponibilité par formation de péroxynitrite responsable d'un découplage de la eNOS (Katusic, 2007). Des études récentes ont montré aussi que le vieillissement est caractérisé par une augmentation de l'expression et de l'activité de l'arginase I, enzyme responsable de la dégradation de l'arginine précurseur du NO, diminuant par compétition l'activité de la eNOS (Katusic, 2007 ; Santhanam *et al.*, 2007). Les relaxations attribuées à EDHF diminuent aussi avec l'âge chez les rats normotendus et l'excrétion urinaire de 6-keto-prostacycline F1 alpha, un métabolite stable de la prostacycline, est également diminuée avec le vieillissement chez l'homme (Hornych *et al.*, 1991; Mantelli *et al.*, 1995). L'atténuation des relaxations endothélium-dépendantes avec l'âge pourrait s'expliquer aussi par une formation accrue de facteurs vasoconstricteurs endothéliaux (Matz *et al.*, 2000 ; Vanhoutte *et al.*, 2005). Actuellement, malgré l'impact de la dysfonction endothéliale lié au vieillissement sur la santé publique, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas encore totalement élucidés.

De nombreuses études épidémiologiques indiquent qu'une consommation modérée de polyphénols contenus dans certains aliments (le vin rouge, le thé, le chocolat et certains fruits et légumes) a des effets protecteurs sur le système cardiovasculaire et est associée à une réduction de la morbidité et la mortalité cardiovasculaire (Renaud et Gueguen, 1998). Les travaux menés dans le laboratoire d'accueil ont permis de mettre en évidence la capacité des composés polyphénoliques du vin et d'autres sources à produire les facteurs vasodilatateurs NO et EDHF par l'endothélium de différents lits vasculaires et espèces animales (Ndiaye *et al.*, 2003, 2005 ; Anselm *et al.*, 2007, 2009). 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 (Stoclet *et al.*, 2004). Cependant, peu d'études ont été consacrées à la caractérisation des propriétés protectrices des polyphénols dans la dysfonction endothéliale liée au vieillissement.

L'objectif de cette étude était d'analyser l'influence d'un extrait polyphénolique de vin sur le vieillissement des rats et sur les altérations vasculaires induites par ce phénomène naturel. Ainsi nous avons réalisé deux études, l'une portant sur les effets potentiellement préventifs d'un traitement avec les polyphénols du vin rouge (25 et 75 mg/kg/j durant 24 semaines) de jeunes rats âgés de 16 semaines ; la seconde sur les effets potentiellement curatifs de ce même traitement (100 mg/kg/j durant 4 semaines) chez les animaux âgés de 50 semaines. Afin de déterminer quel était le rôle du stress oxydant dans le vieillissement nous avons traité préventivement et curativement les animaux avec un antioxydant connu, l'apocynine.

Pour cela nous avons :

1) caractérisé au préalable les conséquences du vieillissement sur la fonction endothéliale en évaluant, *ex vivo*, les relaxations endothélium-dépendantes et endothélium-indépendantes d'anneaux d'artères mésentériques, afin de déterminer la cinétique d'apparition de la dysfonction endothéliale avec l'âge (12-14, 20, 40 et 50 semaines),

2) évalué l'effet protecteur potentiel d'un traitement chronique préventif et / ou curatif avec les extraits polyphénoliques de vin,

3) déterminé quel était le rôle du stress oxydant dans le vieillissement,

4) élucidé à l'aide de marquages tissulaires, les mécanismes moléculaires de la dysfonction endothéliale induite par le vieillissement ainsi que les mécanismes moléculaires des effets protecteurs des polyphénols du vin.

L'ensemble de ces résultats permettra de mieux comprendre les mécanismes et la cinétique d'apparition de la fonction endothéliale avec l'âge.

Editorial Manager(tm) for Cardiovascular Research
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Red wine polyphenols prevent aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance

Short Title: Red wine polyphenols and endothelial dysfunction in aging

Article Type: Original Article

Keywords: aging, endothelial dysfunction, polyphenols, physical activity, oxidative stress.

Corresponding Author: Dr. Valérie B. Schini-Kerth, PhD

Corresponding Author's Institution: Université Lous Pasteur de Strasbourg

First Author: Stéphanie Dal-Ros, Ph.D.

Order of Authors: Stéphanie Dal-Ros, Ph.D.; Anne-Laure Lang, Ph.D.; Joffrey Zoll, Ph.D.; Nathalie Keller; Christian Bronner, Ph.D.; Bernard Gény, Pr; Valérie B Schini-Kerth, Pr

Abstract

Red wine polyphenols prevent aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance

S. Dal-Ros, A.-L. Lang, J. Zoll, N. Keller, C. Bronner, B. Geny and V.B. Schini-Kerth

Aims: Aging is associated with an oxidative stress-mediated endothelial dysfunction and decline in physical performance, which promote cardiovascular diseases. This study examined whether red wine polyphenols (RWPs), a rich source of natural antioxidants, prevent aging-induced impairment of the vascular and skeletal functions and, if so, to determine the underlying mechanisms.

Methods and results: Vascular reactivity was assessed using mesenteric artery rings from young (12 weeks) and old (40 weeks) male Wistar rats. Old rats received from week 16 to 40 either solvent, RWPs (25 or 75 mg/kg/day) or apocynin (an antioxidant and NADPH oxidase inhibitor, 100 mg/kg/day). The expression level of target proteins and nitrotyrosine was assessed by immunohistochemistry, the formation of reactive oxygen species (ROS) by dihydroethidine, and exercise capacity by an endurance capacity test. Both the nitric oxide (NO) and the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-mediated endothelium-dependent relaxations to acetylcholine were blunted in old rats compared with young rats. This effect is associated with an increased expression of eNOS, NADPH oxidase p22phox and nox1 subunits, arginase I and AT1 and AT2 receptors, and the vascular formation of ROS and peroxynitrites. RWPs and apocynin prevented the aging-induced changes in protein expression and improved the physical exercise capacity of old rats.

Conclusions: The present findings indicate that intake of RWPs effectively protected against aging-induced endothelial dysfunction and decline of physical performance. The protective effect of RWPs involves their ability to normalize vascular oxidative stress and the expression of proteins involved in the formation of NO and the angiotensin II pathway.

***Cover Letter/Declaration**

Please find enclosed a manuscript entitled " **Red wine polyphenols prevent aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance** " by Dal-Ros *et al.*, which we would like to submit for publication in Cardiovascular Research as an original research article. The manuscript, or part of it, has neither been published (except in form of abstract or thesis) nor is currently under consideration for publication by any other journal. All authors have read the manuscript and approved its submission to Cardiovascular Research.

Sincerely yours,

V.B. Schini-Kerth

Pr. Valérie B. Schini-Kerth

CNRS UMR 7213 - Biophotonique et Pharmacologie

Faculté de Pharmacie - Université de Strasbourg

74, route du Rhin - BP 60024 - 67401 Illkirch – France

Tel: 0(+033) 3-90-24-41-27 - Fax: 0(+033) 3-90-24-43-13

E-Mail: valerie.schini-kerth@pharma.u-strasbg.fr

Signalement bibliographique ajouté par :

l'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Red wine polyphenols prevent aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance

Stéphanie DAL-ROS, Anne-Laure LANG, Joffrey ZOLL, Nathalie KELLER, Christian BRONNER, Bernard GÉNY, Valérie B. SCHINI-KERTH

Cardiovascular Research, soumis, 2009

Publication n° 4 : p. 212-244 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

Chronic intake of red wine polyphenols improves endothelial dysfunction in the mesenteric artery of old rats: role of NADPH oxidase-derived oxidative stress

Stéphanie Dal-Ros, Christian Bronner, Cyril Auger and Valérie B. Schini-Kerth

UMR CNRS 7213, Laboratoire de Biophotonique et de Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch, France

Running head: RWPs improve endothelial dysfunction in aging

Corresponding author:

Valérie B. Schini-Kerth, PhD

UMR CNRS 7213

Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie

Université de Strasbourg

Faculté de Pharmacie

74, route du Rhin

BP 60024

67401 Illkirch, France

Phone: +33 3 68 85 41 27; Fax: +33 3 68 85 43 13

Email: valerie.schini-kerth@unistra.fr

Abstract

Aging is associated with an oxidative stress-mediated endothelial dysfunction, which promotes cardiovascular diseases. This study determined whether intake of red wine polyphenols (RWPs), which are known to have antioxidant properties and to stimulate the endothelial formation of nitric oxide (NO) and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), improves the endothelial function in old rats. Vascular reactivity of mesenteric artery rings from young (12 weeks) and old (55 weeks) male Wistar rats was assessed in organ chambers. Old rats received either solvent (3% ethanol), RWPs extract (100 mg/kg/day) or the NADPH oxidase inhibitor and antioxidant apocynin (100 mg/kg/day) in the drinking water for 4 weeks. The expression level of eNOS, arginase I, angiotensin II receptors (AT1R and AT2R), NADPH oxidase subunits and of nitrotyrosine was assessed by immunohistochemistry, and the formation of reactive oxygen species (ROS) by dihydroethidine. Both the NO- and the EDHF-mediated endothelium-dependent relaxations to acetylcholine are blunted in old rats compared with young rats. This effect is associated with an increased expression of eNOS, arginase I, NADPH oxidase nox1 and p22phox subunits, AT1R and AT2R receptors, and the vascular formation of ROS and peroxynitrites. RWPs and apocynin treatments improved endothelial dysfunction, normalized oxidative stress and the expression of the different target proteins in old rats. Thus, the present findings indicate that intake of RWPs effectively improved aging-induced endothelial dysfunction. The protective effect of RWPs involves their ability to normalize vascular oxidative stress and the expression of proteins involved in the formation of NO and the angiotensin II pathway.

Keywords: aging, endothelium, reactive oxygen species, angiotensin II receptors

Signalement bibliographique ajouté par :

l'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Chronic intake of red wine polyphenols improves endothelial dysfunction in the mesenteric artery of old rats: role of NADPH oxidase-derived oxydative stress

Stéphanie DAL-ROS, Christian BRONNER, Cyril AUGER and Valérie B. SCHINKERTH

American Journal of Physiology, soumis, 2009

Publication n° 5 : p. 247-271

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

Synthèse des résultats des publications 4 et 5 :

Les données montrent que le vieillissement est associé à une altération temps-dépendante des relaxations dépendantes de l'endothélium au niveau de l'artère mésentérique de rat. Cette altération, progressive, est visible dès l'âge de 20 semaines ; la composante NO et la composante EDHF sont toutes les deux progressivement affectées par le vieillissement. De plus, cette dysfonction endothéliale liée au vieillissement concerne aussi bien les relaxations induites par l'acétylcholine que celles induites par les polyphénols indiquant que le vieillissement altère les deux voies de signalisation intracellulaires (voie calcium-dépendante et voie redox-sensible de la PI₃-kinase/Akt), sans discrimination.

Des analyses complémentaires ont été réalisées sur les coupes de vaisseaux en microscopie confocale afin d'identifier les cibles moléculaires pouvant rendre compte de la dysfonction endothéliale liée au vieillissement dans l'artère mésentérique. Les résultats correspondants ont permis de montrer que le vieillissement est associé à une augmentation de la production des ROS, plus particulièrement des anions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène par la NADPH oxydase et la NOS endothéliale, deux enzymes dont l'expression est augmentée avec l'âge. Nous avons aussi pu mettre en évidence une augmentation de l'expression de l'arginase I, enzyme qui entre en compétition avec la eNOS pour l'utilisation de la L-arginine ; ainsi qu'une amélioration de la fonction endothéliale par le traitement des artères de rats âgés *ex vivo* avec le DMFO (l'alpha-diméthylfluoro-ornithine) un inhibiteur de la L-arginase, suggérant une possible augmentation de l'activité de l'arginase chez les animaux âgés. Nous avons aussi pu mettre en évidence l'augmentation de l'expression des deux types de récepteurs à l'angiotensine II (AT1 et AT2). Les protéines impliquées dans la réponse EDHF, les connexines Cx37, Cx40, Cx43 et les canaux potassiques endothéliaux IK_{Ca}, SK_{Ca} sont eux diminués avec l'âge, expliquant la diminution de la relaxation médiée par EDHF.

La suite du projet a permis de déterminer que les traitements chroniques préventif et curatif avec les polyphénols du vin protège et restaure, partiellement mais significativement, les relaxations dépendantes de l'endothélium au niveau de l'artère mésentérique de rat. Cet effet semble principalement lié à une normalisation de la composante NO sans modification de la composante EDHF. Les analyses effectuées en microscopie confocale sur des coupes d'artères mésentériques provenant de ces rats traités révèlent que les traitements avec les polyphénols du vin rouge d'une part conservent et d'autre part rétablissent l'expression de la eNOS, de

l'arginase 1, des récepteurs AT1 et AT2. Le traitement préventif permet une faible mais significative amélioration de l'expression des connexines et des canaux potassiques endothéliaux, en revanche le traitement curatif ne permet pas d'empêcher ces pertes d'expression.

Nous avons aussi pu mettre en évidence le rôle du stress oxydant dans le vieillissement, par l'utilisation de traitements préventif et curatif avec l'apocynine, autre anti-oxydant et inhibiteur de la NADPH oxydase. Nous avons observé d'une part que le traitement préventif permettait de préserver une expression normale de la eNOS, de la NADPH oxydase, des récepteurs AT1 et AT2, et d'autre part qu'un traitement curatif permettait de restaurer leur expression chez les animaux âgés.

En collaboration avec l'équipe du Pr Gény, des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, des analyses ont été réalisées sur la mitochondrie du muscle soléaire, muscle de la jambe. Nous avons pu mettre en évidence la formation de ROS, plus particulièrement d' O_2^- dans le soléaire ainsi qu'une diminution de la respiration mitochondriale. Ces résultats indiquent la présence d'une dysfonction musculaire associée à une dysfonction mitochondriale chez les animaux âgés. Par la suite, seuls les animaux jeunes traités préventivement avec les polyphénols du vin à la dose de 75 mg/kg/j ont été étudiés par l'équipe du Pr Gény. Nous avons pu montrer que les animaux traités pendant 7 mois avec les polyphénols du vin rouge présentent une fonction musculaire et mitochondriale identiques à des animaux jeunes.

De plus, nous avons pu, grâce à un test d'endurance, déterminer les conséquences du vieillissement sur les aptitudes physiques de ces animaux. Les animaux âgés présentent une diminution de 65% du temps de course sur un tapis roulant en comparaison à des animaux jeunes. Ainsi, le vieillissement est associé à une perte de la capacité physique des animaux. En revanche, le traitement préventif avec les polyphénols du vin rouge à forte concentration ainsi qu'avec l'apocynine ont permis de limiter cette perte de capacité à 40% et 35%. En revanche, la plus faible dose en polyphénols n'a pas permis d'obtenir les mêmes effets bénéfiques sur la capacité physique des animaux âgés.

En conclusion, ce dernier projet a permis de démontrer des effets originaux et bénéfiques des polyphénols du vin rouge : 1) sur la protection de la fonction endothéliale au cours du vieillissement et chez les animaux âgés, 2) sur le développement du stress oxydant avec l'âge, 3) sur la protection de l'expression des protéines eNOS, NADPH oxydase, des récepteurs AT1 et AT2, 4) sur la protection de la respiration mitochondriale du muscle soléaire et enfin 5) sur le

maintien de la capacité physique des animaux au cours du vieillissement. L'ensemble de ces résultats sera discuté dans la partie « Discussion générale ».

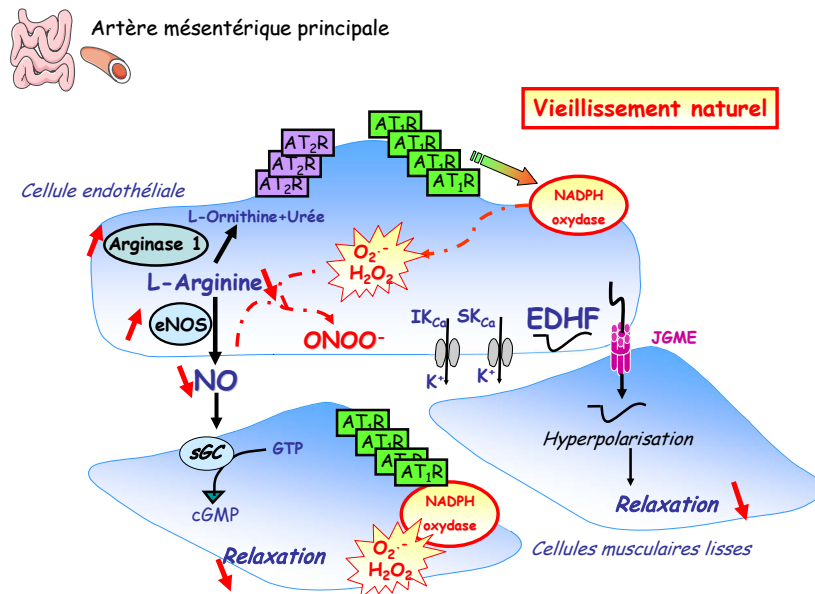


Figure 53 : Schéma récapitulatif des effets du vieillissement naturel sur l'artère mésentérique. AT1 et AT2 : récepteurs de type 1 et 2 à l'angiotensine II, EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, eNOS : NO synthase endothéliale, IK_{Ca} et SK_{Ca} : canaux potassiques dépendants du calcium de moyenne et de faible conductance, JGME : jonctions gap myoendothéliales, K⁺ : potassium, NO : monoxyde d'azote, ONOO⁻ : peroxynitrites, O₂⁻ : anions superoxydes, **↕** : effets du vieillissement, augmentation ou diminution.

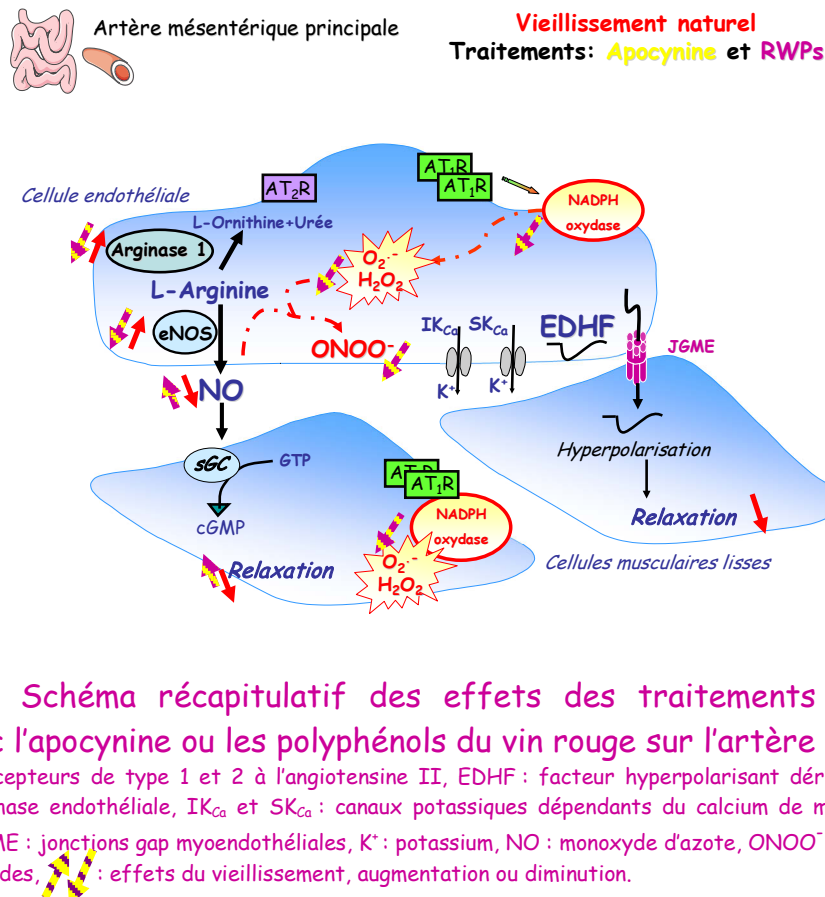


Figure 54 : Schéma récapitulatif des effets des traitements préventif et curatif avec l'apocynine ou les polyphénols du vin rouge sur l'artère mésentérique. AT1 et AT2 : récepteurs de type 1 et 2 à l'angiotensine II, EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, eNOS : NO synthase endothéliale, IK_{Ca} et SK_{Ca} : canaux potassiques dépendants du calcium de moyenne et de faible conductance, JGME : jonctions gap myoendothéliales, K⁺ : potassium, NO : monoxyde d'azote, ONOO⁻ : peroxynitrites, O₂⁻ : anions superoxydes, **↕** : effets du vieillissement, augmentation ou diminution.

Discussion Générale et Perspectives

L'ensemble de ce travail de thèse a permis de mettre en évidence de nombreux points communs entre les deux pathologies vasculaires étudiées et le vieillissement physiologique. Le point majeur est l'apparition d'une dysfonction endothéliale plus ou moins importante chez les animaux hypertendus, cirrhotiques ou âgés et plus particulièrement la mise en évidence du rôle majeur joué par le stress oxydant et le système rénine angiotensine. Avec l'appui de la littérature scientifique, nous allons maintenant tenter d'apporter des réponses aux questions qui découlent de ce travail.

Dysfonction endothéliale et pathologies cardiovasculaires :

Nous avons pu mettre en évidence une atteinte plus ou moins marquée des relaxations induites par l'acétylcholine et les polyphénols du vin dans les anneaux d'artères mésentériques de rats hypertendus, âgés ou bien présentant un SHP. L'inhibition des relaxations observée dans ces différents modèles est observée indépendamment de la nature de l'agoniste utilisé (acétylcholine ou polyphénols du vin rouge), indiquant que dans ces trois pathologies il n'y a pas de discrimination quant à la voie de formation des facteurs vasorelaxants (respectivement la voie calcique ou PI₃kinase/Akt). Les expériences réalisées simultanément sur les artères sans endothélium n'ont pas montré d'atteinte de la capacité des muscles lisses vasculaires à se relâcher ou à s'hyperpolariser. Ainsi, les trois pathologies affectent bien les mécanismes vasodilatateurs en aval des voies d'activation et au niveau de l'endothélium, en modifiant par exemple l'expression de la NOS synthase et des canaux potassiques et /ou connexines.

Pour le premier projet sur l'hypertension artérielle systémique, nous avons comme modèle de dysfonction endothéliale celle induite chez le rat, par infusion chronique d'angiotensine II. Compte tenu de l'implication de l'activation du système rénine-angiotensine dans diverses situations physiopathologiques comme l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque, l'athérosclérose, la résistance à l'insuline (Shinozaki *et al.*, 2004), les altérations vasculaires observées dans ce modèle pourraient, être représentatives de nombreuses pathologies affectant le système vasculaire. En accord avec les données apportées dans la littérature (Rajagopalan *et al.*, 1996 ; Mollnau *et al.*, 2002), les rats implantés avec une minipompe délivrant de l'angiotensine

II pendant 21 jours présentent une augmentation de la pression artérielle sans modification de la fréquence cardiaque. Ceci indique que l'effet hypertenseur résulte principalement d'une augmentation des résistances périphériques. Rajagopalan *et al.* (1996) ont montré que cet effet hypertenseur pouvait être prévenu par le losartan, ce qui indique l'implication des récepteurs AT1. Nous avons par ailleurs montré que le traitement chronique de 21 jours par l'angiotensine II induit une diminution très marquée de l'activité rénine-plasmatique, ce qui est compatible avec le rétro-contrôle négatif exercé par l'angiotensine 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'angiotensine II (Tanabe *et al.*, 1999). Une concentration plasmatique élevée en Ang II est retrouvée chez les patients présentant une hypertension sévère (Boyd *et al.*, 1972 ; Sim et Qui, 2003).

Nous avons montré pour la première fois, une atteinte spécifique de la composante EDHF de la relaxation dans le modèle d'hypertension artérielle induite par l'angiotensine II sans atteinte de la composante NO ni de modifications de la relaxation globale. Dans les artères de conductance comme l'aorte, la composante NO est altérée par l'infusion chronique d'angiotensine II (Sarr *et al.*, 2006). Pourtant en accord avec nos résultats, dans l'artère mésentérique de rats SHR, spontanément hypertendus, il n'y a pas d'altération de la composante NO mais uniquement d'EDHF (Onaka *et al.*, 1998 ; Kähönen *et al.*, 1999 ; Goto *et al.*, 2000). Une autre hypothèse serait qu'il existerait dans notre modèle, un mécanisme compensatoire entre les deux facteurs vasodilatateurs NO et EDHF. Il a déjà été démontré un tel mécanisme chez des souris Knock-out pour la eNOS, dans le diabète et également dans l'hypertension pulmonaire (Waldron *et al.*, 1999 ; Ding *et al.*, 2000 ; Morio *et al.*, 2007 ; Gutterman *et al.*, 2005). Ainsi, dans notre modèle d'hypertension artérielle, le manque de relaxation due à EDHF pourrait être compensé par une augmentation du NO assurant ainsi une relaxation globale normale. Un autre mécanisme peut être impliqué dans la dysfonction endothéliale liée à l'hypertension artérielle. En effet, il a été montré chez le rat SHR que l'endothélium induit une contraction par les produits dérivés de la cyclooxygénase des cellules musculaires lisses en réponse à l'acétylcholine, à l'ATP/ADP, à la sérotonine, à l'acide arachidonique et à l'endothéline-1 (Vanhoutte *et al.*, 1988, 1989, 1995). Une étude dans le laboratoire a aussi démontré la présence d'EDCFs en réponse à l'acétylcholine dans l'aorte de rats traités chroniquement avec l'angiotensine II (Kane *et al.*, soumis 2009). Dans notre étude nous n'avons pas regardé la capacité de l'acétylcholine à induire une contraction. Chez les rats hypertendus Dahl « sensible au sel » et chez les souris knock-out pour la eNOS, l'altération des relaxations endothélium-dépendante ne semble pas être due à la sécrétion

d'EDCFs (Lüscher *et al.*, 1987a, b ; Kuhlencordt *et al.*, 2004). Ainsi, il semblerait que dans l'hypertension la composante NO soit altérée ou bien conservée, et ce dépendant du lit vasculaire étudié tout comme la présence ou non d'EDCFs.

Dans le cas du SHP, nous avons mis en évidence une atteinte spécifique de la composante EDHF de la relaxation dans l'artère mésentérique de rats sans modification de la composante NO ni de modifications de la relaxation globale. En revanche, Barrière *et al.* (2000) ont mis en évidence le rôle d'EDHF dans l'inhibition de la contraction observée dans les artères mésentériques de rats ayant eu une ligature de la voie biliaire commune (CBDL), et que cette hyporéactivité est supprimée par la combinaison de charybdotoxine et d'apamine (inhibant les canaux responsables de la formation d'EDHF). Dans une étude sur le poumon perfusé de rats CBDL, Carter *et al.* (2000) ont confirmé ces résultats par la normalisation de la contraction induite par l'hypoxie en présence de charybdotoxine et d'apamine. Ces résultats sont en désaccord avec les nôtres montrant une diminution des relaxations médiées par EDHF, et peuvent être expliqués par la différence des techniques utilisées par Carter *et al.* (2000) par l'utilisation de souches de rats différentes (les Sprague Dawley par Barrière *et al.* (2000) et des Wistar par Carter *et al.* (2000) et l'utilisation de stimuli différents (l'hypoxie au lieu de l'acétylcholine et les polyphénols du vin rouge dans notre étude). De plus la diminution des relaxations médiées par EDHF pourrait être un effet compensatoire de l'augmentation de la production de NO pour maintenir une relaxation globale normale (Olmos *et al.*, 1995 ; Bauersachs *et al.*, 1996). La détérioration d'EDHF par le NO n'a lieu que dans le cas d'une production excessive de NO (Takase *et al.*, 1996). Dans notre étude, nous n'avons pas montré de modifications des relaxations médiées par le NO. Comme nous l'avons déjà souligné, le lit vasculaire, le modèle d'étude, la souche ou l'espèce utilisés varient les résultats. En effet, chez les patients en attente de transplantation du foie il a été rapporté une élévation du NO exhalé ainsi qu'une normalisation après l'opération (Rolla, 1998), suggérant ainsi le rôle d'une augmentation du NO chez les patients. Une surexpression de la eNOS et / ou une augmentation des relaxations médiées par le NO ont été rapportés dans les modèles d'hypertension pulmonaire (Isaacson *et al.*, 1994 ; Resta *et al.*, 1997 ; Shirai *et al.*, 2003 ; Jermigan *et al.*, 2004a). En revanche d'autres études ont démontré une diminution de ces relaxations dans l'artère pulmonaire (Adnot *et al.*, 1991 ; Murata *et al.*, 2002 ; Sauzeau *et al.*, 2003 ; Abe *et al.*, 2004 ; Elmedal *et al.*, 2004).

Certes dans le modèle d'hypertension artérielle et de SHP, nous n'avons pas vu d'augmentation des relaxations médiées par le NO probablement car une partie du NO excédentaire est transformée en peroxy-nitrites. La limitation majeure des études réalisées *ex vivo* en chambre à organe isolé est l'absence de l'implication du flux, jouant un rôle important dans la physiopathologie de la cirrhose et de l'hypertension portale et systémique. Ainsi, d'autres techniques telle que la mesure du NO par résonance paramagnétique électronique ou bien des études d'organes perfusés nous auraient peut être permis de répondre à ces attentes.

En revanche et en accord avec la littérature, l'augmentation de l'âge diminue la capacité de l'endothélium à produire les facteurs vasodilatateurs (Vanhoutte, 2002 ; Moritoki *et al.*, 1986 ; Koga *et al.*, 1988 ; Charpie *et al.*, 1994 ; Davidge *et al.*, 1996 ; Hongo *et al.*, 1988 ; Kung et Lüscher, 1995 ; Taddei *et al.*, 1997b, 2001 ; Cernadas *et al.*, 1998 ; Yasuro *et al.*, 1999 ; Heymes *et al.*, 2000 ; Csiszar *et al.*, 2002, 2007 ; Subramian et MacLeod, 2003 ; Spier *et al.*, 2007 ; Bulckaen *et al.*, 2008). En effet il est largement reconnu que la relaxation induite par l'acétylcholine est altérée par le vieillissement à la fois dans les artères de conductance et de résistance et ceci pour différentes espèces. Dans les artères de conductance cette altération se trouve dans l'aorte (Koga *et al.*, 1988 ; Kung et Lüscher, 1995) et dans l'artère carotide de rat (Hongo *et al.*, 1988), dans l'artère mésentérique et fémorale de chien (Shimizu et Toda, 1986 ; Haidet *et al.*, 1995) ainsi que dans les artères brachiale et coronaire humaines (Taddei *et al.*, 1995 ; Egashira *et al.*, 1993). Les effets du vieillissement n'ont été que peu étudiés dans les artères de résistance. Néanmoins, une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium induite par le carbachol, un autre agoniste des récepteurs muscariniques, a été décrite dans le lit mésentérique perfusé de rat (Atkinson *et al.*, 1994). Nous avons mis en évidence l'apparition progressive d'une dysfonction endothéliale générale plus sévère avec atteinte de la relaxation globale mais aussi une diminution des relaxations dues uniquement au NO ou à EDHF. Peu d'études ont cherché à déterminer les mécanismes impliqués. Koga *et al.* (1988) ont montré qu'une partie du défaut de relaxation observé aux fortes concentrations d'acétylcholine dans l'aorte de rat de souche WKY était améliorée par la pré-incubation des artères par l'indométacine, un inhibiteur de COXs. Ils en ont conclu que les produits du métabolisme de l'AA via les COXs étaient libérés par l'endothélium et pouvaient induire une contraction du muscle lisse vasculaire. Par contre, Kung et Lüscher (1995) ont montré que, dans l'aorte de rat de souche WKY, le défaut de relaxation à l'acétylcholine n'était pas dû à la contribution d'un facteur contracturant libéré par les COX endothéliales. En effet, les relaxations à l'acétylcholine ne sont pas améliorées par la pré-

incubation des vaisseaux avec le SQ30741, un antagoniste des récepteurs au TXA_2 et à la PGH_2 . Par ailleurs, Mayhan *et al.* (1990) ont observé que dans les artérioles de rat de souche Wistar, le défaut de relaxation à l'acétylcholine, à la sérotonine, et à l'ADP n'était pas modifié par le traitement des artères à l'indométacine. Dans nos deux études sur le vieillissement, nous n'avons pas mis en évidence de contractions induites par l'acétylcholine, ni de différences dans les contractions induites par la phényléphrine, suggèrent que les EDCFs ne seraient pas impliqués dans la dysfonction endothéliale chez les animaux âgés. Shirasaki *et al.* (1986) ont observé que le vieillissement était associé à une diminution de la relaxation induite par les donneurs de NO, tels que le nitroprussiate de sodium et le nitrite de sodium, dans l'aorte et l'artère mésentérique de rats de souche WKY. Ils ont montré que ce défaut était dû à la modulation par l'endothélium de cette réponse aux donneurs de NO puisque un tel défaut n'est pas observé sur de l'artère dépourvue d'endothélium. Tschudi *et al.* (1996) ont observé une diminution de la libération de NO dans l'aorte de rat de souche Ro-Ro avec le vieillissement lors d'une stimulation par l'ionophore calcique A23187 (qui stimule les cellules endothéliale sans passer par la liaison à un récepteur). Ils ont donc attribué le défaut de relaxation observé au cours du vieillissement à un défaut de libération de NO au niveau endothélial, dans l'aorte mais pas dans les artères pulmonaires.

Fujii *et al.* (1993) ont observé une diminution de l'hyperpolarisation induite par l'acétylcholine dans les branches principales de l'artère mésentérique supérieure de rat âgé de souche WKY. Ils attribuent donc le défaut de relaxation observé au cours du vieillissement à un défaut au niveau de la voie EDHF. Dans nos études, nous n'avons pas pu réaliser en parallèle la réactivité vasculaire et les expériences d'hyperpolarisation. En revanche, ces résultats auraient permis de pouvoir faire le lien entre une potentielle diminution d'hyperpolarisation et la diminution des relaxations médiées par EDHF observée chez les rats âgés.

Ainsi, la nature des mécanismes impliqués dans le vieillissement demeure controversée, mais l'examen approfondi de l'ensemble de ces études a permis de mettre en évidence des différences expérimentales : l'utilisation de souche WKY, l'utilisation d'animaux adultes d'âges variés (31 semaines pour l'étude de Shirasaki *et al.*, 12 mois pour celle de Koga *et al.*) ou l'utilisation d'animaux femelles sans détermination de leur statut hormonal (étude de Tschudi *et al.*, 1996). L'étude expérimentale du vieillissement physiologique et la comparaison des résultats nécessitent en effet de déterminer les critères tels que la définition d'un âge à partir duquel un animal est « âgé », le choix d'une espèce ou d'une souche exempte de pathologies associées au vieillissement, la vigilance concernant le sexe et donc l'influence du statut hormonal de l'animal sur l'étude.

Dysfonction endothéliale et mécanismes moléculaires :

Les mécanismes moléculaires mis en évidence dans ces trois pathologies semblent être similaires. Comme nous l'avons vu précédemment les trois pathologies sont associées à une dysfonction endothéliale caractérisée par la diminution des relaxations médiées par EDHF et dans le cadre du vieillissement aussi de NO.

Des études utilisant des bloqueurs pharmacologiques des jonctions gap myoendothéliales (peptides mimétiques, dérivées de l'acide glyccirhétinique) ont permis de mettre en évidence l'importance de ces jonctions dans les réponses médiées par EDHF (Goldberd *et al.*, 1996 ; Griffith *et al.*, 2004). Nous avons pu démontrer en accord avec la littérature, que chez des rats contrôles jeunes les jonctions gap myoendothéliales jouent un rôle majeur dans la transmission de l'hyperpolarisation des cellules endothéliales aux cellules musculaires lisses afin d'assurer les relaxations de l'artère mésentérique (Harris *et al.*, 2000 ; Goto *et al.*, 2002). Les différentes études de marquages immunologiques des connexines, constituants des jonctions gap myoendothéliales, ont permis conformément à la littérature, de localiser les connexines Cx37 et Cx43 dans la média et l'intima des vaisseaux alors que la connexine Cx40 est préférentiellement localisée au niveau de l'intima dans l'artère mésentérique de rat jeunes contrôles (Kansui *et al.*, 2004 ; Rummery et Hill, 2004). En revanche, dans les trois pathologies, nous avons pu mettre en évidence la diminution d'au moins 50% de l'expression de chacune des connexines pouvant ainsi expliquer la perte des relaxations médiées par EDHF (Rummery et Hill, 2004). Ces résultats ont été démontrés dans un autre modèle d'hypertension artérielle, chez les rats SHR (Rummery *et al.*, 2002), mais aussi au cours du vieillissement (Yeh *et al.*, 2000). De plus, nous avons confirmé que les deux canaux potassiques dépendants du calcium de faible et d'intermédiaire conductance SK_{Ca} et IK_{Ca} sont impliqués dans la genèse d'EDHF, comme en témoigne l'inhibition des relaxations en présence d'apamine et de charybdotoxine (Ohashi *et al.*, 1999 ; Castle, 1999 ; Garcia *et al.*, 1991) et l'inhibition de l'hyperpolarisation et non par l'ibériotoxine (bloqueur sélectif de BK_{Ca}) (Chataigneau *et al.*, 1998). Par ailleurs, nous avons pu démontrer d'une part que les canaux SK_{Ca} sont localisés au niveau de l'intima et de la média et que les canaux IK_{Ca} sont préférentiellement exprimés au niveau de l'intima. D'autre part, nous avons pu aussi démontrer que les trois pathologies sont associées à une diminution de 30 à 50% de l'expression de ces deux canaux. De récentes études ont souligné le rôle important de ces canaux dans la dysfonction vasculaire présente dans la cirrhose (Barrière *et al.*, 2001), dans l'hypertension (Taylor *et al.*, 2003 ; Si *et*

al., 2006). L'ensemble de ces résultats indique que la diminution d'expression des connexines et des canaux potassiques endothéliaux pourrait expliquer la perte des relaxations médiées par EDHF. Nous discuterons ci-après du rôle du stress oxydant dans ces modifications d'expressions de ces protéines.

Les modifications des relaxations médiées par le NO avec l'âge peuvent s'expliquer par différents mécanismes. L'augmentation de l'expression et/ou de l'activité de l'arginase 1, compétitant avec la eNOS pour le substrat commun l'arginine, l'augmentation de la production des ROS et notamment des anions superoxydes réduisant la biodisponibilité du NO sont des hypothèses qui sont en accord avec les résultats obtenus dans notre modèle de vieillissement. Une diminution de l'activité de la eNOS malgré son augmentation d'expression (Cernadas *et al.*, 1998) et donc une diminution de la formation de NO (Tschudi *et al.*, 1996a), une déficience en cofacteur BH₄ (Eskurza *et al.*, 2005), la réduction de l'expression de la guanylyl cyclase soluble (Klöss *et al.*, 2000) ou une augmentation de l'ADMA (Versari *et al.*, 2009) pourraient aussi expliquer ces atteintes. Nous avons montré également une augmentation de l'expression de la eNOS, ceci pouvant s'expliquer par un mécanisme compensatoire qui survient dans le cas d'une augmentation du stress oxydant et d'une dysfonction endothéliale. Due à la diminution du NO vasculaire un changement de l'expression de la eNOS (augmentation) et de la caveolin-1 (diminution, protéine membranaire liée à la eNOS inactive) peut avoir lieu afin de maintenir la production bioactive du NO (Piech *et al.*, 2003 ; Lopez-Sepulveda *et al.*, 2008).

Dysfonction endothéliale et stress oxydant :

Certes la dysfonction endothéliale apparaît dans différents processus pathologiques, mais le stress oxydant semble être identifié comme dénominateur commun (Griendling et FitzGerald, 2003a, b). Les ROS jouent un rôle majeur dans la physiologie et physiopathologie vasculaire, en particulier l'anion superoxyde pouvant diminuer la biodisponibilité du NO (Rajagopalan *et al.*, 1996 ; Miller *et al.*, 1998 ; Pagano *et al.*, 1997). Il n'y a pas de doute quant à l'implication du stress oxydant et des dommages associés au cours du vieillissement (Miller *et al.*, 1998 ; Tschudi *et al.*, 1996 ; Taddei *et al.*, 2001 ; Ciszar *et al.*, 2002, 2007), de l'hypertension artérielle (Mombouli et Vanhoutte, 1999 ; Sarr *et al.*, 2006), notamment au niveau de l'endothélium qui est une source importante d'anions superoxyde (Hamilton *et al.*, 2001). En utilisant la dihydroéthidine (DHE) comme sonde fluorescente, nous avons effectivement montré une augmentation de la quantité de ROS dans les artères mésentériques, pulmonaires et les muscles

squelettiques des animaux hypertendus, âgés et atteints de SHP. Ceci est en accord avec les données de la littérature, utilisant la même sonde fluorescente (Landermesser *et al.*, 2002b). Le marquage *in situ* au bromure d'éthidium est observé au niveau de l'intima, de la média et de l'adventice des artères et au niveau du tissu conjonctif entourant les fibres musculaires squelettiques. Le marquage peut être inhibé par le MnTMPyP (un analogue perméant membranaire de la SOD) dans le cadre des trois pathologies et par la PEG-Catalase (un analogue perméant membranaire de la catalase) dans les artères âgées, ce qui indique qu'il provient de l'élévation tissulaire en anions superoxydes et en H₂O₂. Le rôle de la NADPH oxydase comme source d'anions superoxydes a déjà été mis en évidence dans l'hypertension artérielle (Rajagopalan *et al.*, 1996). La prévention de la genèse des ROS, par exemple en délétant la sous-unité p47phox de la NADPH oxydase, permet une résistance à l'hypertension induite par l'angiotensine II et réduit la formation endothéliale des anions superoxydes (Landmesser *et al.*, 2002). Une augmentation de l'expression de diverses sous-unités de la NADPH oxydase (p22phox, gp91phox, nox1) a été rapportée dans les artères issus d'animaux traités chroniquement avec l'angiotensine II (Fukui *et al.*, 1997 ; Mollnau *et al.*, 2002), âgés (Félétou et Vanhoutte, 2006) et de patients atteints de cirrhose alcoolique (Colmenero *et al.*, 2007). Dans les segments d'artères mésentériques issus des rats hypertendus, âgés ou atteints d'un SHP, nous avons effectivement mis en évidence, par immunofluorescence, une augmentation du niveau d'expression des protéines p22phox et nox1 ainsi que de la eNOS. D'autre part, nous avons montré que le DPI et l'apocynine d'une part et le L-NA d'autre part diminuent le marquage au bromure d'éthidium. Ces données indiquent l'implication de la NADPH oxydase et la eNOS découplée comme source de ROS. La production accrue de ROS par la NADPH oxydase pourrait aussi initier le phénomène de découplage de la eNOS (Mollnau *et al.*, 2002 ; Griendling et Fitzgerald, 2003) et à l'origine de la formation de H₂O₂ (Landmesser *et al.*, 2003).

L'implication de la NADPH oxydase dans l'âge et le SHP a été confirmée lors des traitements chroniques des animaux avec l'apocynine. En effet, ce traitement chronique a permis d'inhiber totalement le stress oxydant associé aux pathologies et d'assurer l'expression physiologique des sous-unités de la NADPH oxydase et de la eNOS. De plus, ce traitement chronique permet d'assurer des relaxations endothélium-dépendantes normales chez les animaux âgés ou atteints d'un SHP. Chez l'Homme le stress oxydant semble aussi jouer un rôle majeur dans ces pathologies. Donato *et al.* (2007) ont notamment montré l'apparition du stress oxydant avec l'âge parallèlement à la perte progressive de la vasodilatation des artères. Les auteurs ont aussi mis en évidence une augmentation de l'expression de la NADPH oxydase alors que la

xanthine oxydase, la SOD et la catalase mitochondriales ou cytosoliques ne seraient pas liée à cette dysfonction endothéliale et au stress oxydant (Donato *et al.*, 2007 ; Eskurza *et al.*, 2006). Le stress oxydant peut aussi être à l'origine des modifications d'autres protéines, telles que l'arginase augmentant ainsi son activité de dégradation de la L-arginine et entrant en compétition avec la eNOS ; les canaux potassiques endothéliaux IK_{Ca} et SK_{Ca} diminuant ainsi la formation d'EDHF ou bien des connexines diminuant ainsi le passage de l'hyperpolarisation des cellules endothéliales aux cellules musculaires lisses vasculaires. Ces mécanismes ont été mis en évidence dans d'autres modèles ou autres pathologies (Thengchaisri *et al.*, 2006 ; Gutterman *et al.*, 2005 ; Griffith *et al.*, 2005).

Il faut noter que dans nos modèles, malgré l'augmentation des ROS dans les cellules musculaires lisses des artères mésentériques, l'effet relaxant du nitroprussiate de sodium n'est pas altéré. Le flux de NO provenant du nitroprussiate de sodium pourrait excéder le flux d'anions superoxydes, masquant ainsi l'influence de la dégradation de NO. Aux vues de tous ces résultats, le stress oxydant affecterait préférentiellement la fonction endothéliale, la formation des facteurs vasorelaxants et leur transmission plutôt que les mécanismes impliqués dans la relaxation des cellules musculaires lisses.

Dysfonction endothéliale et système rénine angiotensine :

Dans les trois pathologies nous avons pu mettre en évidence l'importance du système rénine angiotensine (SRAA) dans leur physiopathologie.

D'autres auteurs ont déjà souligné le rôle néfaste du SRAA dans l'hypertension artérielle (Onaka *et al.*, 1998 ; Kähönen *et al.*, 1999 ; Goto *et al.*, 2000) puisque les rats SHR traités avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II ou des antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II présentent une fonction endothéliale et une hyperpolarisation normale en comparaison aux animaux SHR non traités. Ces études ont démontré le lien entre le SRAA et EDHF. Elles ont été confirmées par les résultats de l'étude de Kansui *et al.* (2004) démontrant le lien entre l'expression des connexines et le SRAA. Notre étude a effectivement démontré qu'un traitement chronique avec l'angiotensine II de 3 semaines est nécessaire à l'induction d'une dysfonction endothéliale spécifique de la composante EDHF associée à une diminution des canaux et des connexines. En effet, le même traitement hypertensif de 2 semaines ne permet pas d'obtenir les mêmes résultats (Dal-Ros *et al.*, 2009 ; Hilgers *et al.*, 2007). Linz *et al.* (2000) ont pu également démontrer le rôle du SRAA dans la durée de vie des animaux hypertendus, car en

effet un traitement des jeunes rats SHR-SP avec le fonsartan (antagoniste des récepteurs à l'angiotensine II) permet de doubler leur durée de vie, comparable avec celle d'animaux normaux WKY.

La stimulation chronique du SRAA pour compenser la diminution des résistances périphériques vasculaires associée à une hypovolémie est observée chez les patients et dans des modèles expérimentaux d'hypertension portale (Newby *et al.*, 1998 ; Helmy *et al.*, 2003 ; Ubeda *et al.*, 1994 ; Yang *et al.*, 2002). Ainsi, le SRAA jouerait un rôle dans la genèse du statut hyperdynamique observée. Nous avons effectivement pu démontrer qu'un traitement préventif avec le losartan, antagoniste de récepteur à l'angiotensine II était capable de prévenir l'apparition des complications liées à la ligature de la voie biliaire commune, telles que l'apparition du stress oxydant, de la dysfonction endothéliale et des mécanismes sous-jacents (diminution de l'expression de la eNOS, de la NADPH oxydase). Des résultats identiques ont été publiés par Yang *et al.* (2002) sur l'aorte de rats CBDL et traités après 3 semaines avec du losartan à 3 mg/kg/jour durant 1 semaine. De plus, l'utilisation d'une plus faible dose de losartan (0.5 à 5 au lieu de 10 mg/kg/jour) est aussi capable de diminuer l'hypertension portale et la cirrhose chez les patients et dans les modèles expérimentaux (Yang *et al.*, 2002 ; Heller *et al.*, 2005 ; Wagatsuma *et al.*, 2002 ; De BK *et al.*, 2003).

Dans le cadre de l'étude sur le vieillissement, nous avons pu mettre en évidence et en accord avec la littérature (Oudot *et al.*, 2006), une augmentation des deux types de récepteurs à l'angiotensine II, AT1 et AT2. Pinaud *et al.* (2007) soumet notamment l'hypothèse d'un changement de fonction (vasoconstriction/vasodilatation) et de localisation (cellules musculaires lisses/endothélium) du récepteur AT2 chez les rats âgés. En effet, chez de jeunes rats, la vasodilatation liée au flux de l'artère mésentérique est inhibée en présence de l'antagoniste de récepteur AT2, le PD123319 ; alors que chez les animaux âgés, cette vasodilatation au flux est augmentée en présence de PD123319. Atkinson *et al.* (1995) et Goto *et al.* (2000) ont démontré qu'un traitement avec un antagoniste des récepteurs à l'angiotensine II (sartans) ou bien un inhibiteur de l'enzyme de conversion sont capables d'améliorer les relaxations de rats âgés alors que des anti-hypertenseurs classiques type hydralazine plus hydrochlorothiazide n'en sont pas capables. Sagach *et al.* (2006), Ferder *et al.* (2002), Gonzalez-Bosc *et al.* (2001) arrivent à la même conclusion concernant les effets bénéfiques d'un traitement avec l'énalapril (inhibiteur de l'enzyme de conversion) et les sartans sur la fonction endothéliale et l'expression de la eNOS dans l'aorte des rats âgés. Basso *et al.* (2007) ont pu démontrer aussi l'importance du SRAA dans le vieillissement chez les rats par une augmentation de la durée de vie des animaux traités avec

du losartan (antagoniste des récepteur à l'angiotensine II, 28 à 37 mois) et aussi avec l'énalapril (28 à 37 mois) en comparaison à des animaux non-traités (26 mois).

Polyphénols et effets protecteurs :

Les travaux réalisés montrent que l'administration par voie orale de composés polyphénoliques du vin rouge exerce chez les rats un effet protecteur contre diverses altérations vasculaires, musculaires et physiques chez les rats âgés. Dans les deux études sur le vieillissement, les effets des polyphénols sont observés à 25 et 75 mg/kg/j pour l'étude préventive et 100 mg /kg/j pour l'étude curative. Le fait que ces effets soient mis en évidence après une administration par voie orale (dans l'eau de boisson) indique qu'une fraction significative des polyphénols atteint la circulation générale pour prévenir les effets de l'âge.

Dans notre étude, l'effet d'un traitement chronique avec des polyphénols du vin rouge a été évalué sur la fonction endothéliale. Les résultats obtenus montrent que la diminution de l'effet relaxant de deux stimuli (acétylcholine et polyphénols en aiguë) sur les artères mésentériques des rats âgés peut être rétablie par le traitement chronique avec les polyphénols du vin rouge administrés par voie orale. Cet effet des polyphénols est spécifique, dans la mesure où leur administration ne modifie pas l'effet relaxant du nitroprussiate de sodium sur les cellules musculaires lisses. Les mécanismes qui sous-tendent l'effet bénéfique de l'administration des polyphénols sur la dysfonction endothéliale et les dommages liés à l'âge pourraient impliquer divers mécanismes, comme par exemple l'inhibition de la production de facteurs vasoconstricteurs, ou l'augmentation de la production ou de la biodisponibilité de facteurs vasodilatateurs (Stoclet *et al.*, 2004).

La présente étude apporte l'information nouvelle que les polyphénols sont capables, après administration par voie orale, de prévenir l'augmentation de l'expression vasculaire des composantes p22phox et nox1 et de la eNOS dans un modèle de dysfonction endothéliale liée à l'âge. De plus, cet effet est associé à une diminution de la production vasculaire de ROS et à une amélioration de la fonction endothéliale. L'ensemble de ces données indiquent que l'effet antioxydant des composés polyphénoliques du vin rouge peut découler aussi d'une diminution de l'expression d'enzymes qui produisent ces ROS dans la paroi vasculaire. Ces effets sont comparables à ceux observés par Sarr *et al.*, (2006) dans un modèle d'hypertension induite par l'Ang II, où un traitement chronique avec les polyphénols du vin rouge par voie orale est capable de prévenir le développement de l'hypertension artérielle et la dysfonction endothéliale associée

à une diminution du stress oxydant. Lopez-Sepulveda *et al.* (2008) aboutissent à la même conclusion sur les effets protecteurs des polyphénols du vin rouge chez les rats SHR. Les flavonoïdes du thé éliminent eux aussi efficacement différents radicaux libres (Zijp *et al.*, 2000 ; Beatty *et al.*, 2000). De plus, l'effet des polyphénols du vin sur l'expression des composants de la NADPH oxydase est similaire à 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). De nombreuses études récentes mettent effectivement en évidence la capacité des polyphénols à diminuer l'expression de la NADPH oxydase (Walter *et al.*, 2008 ; Feillet-Coudray *et al.*, 2009 ; Gresele *et al.*, 2008). Les polyphénols du vin rouge sont aussi capables d'augmenter l'expression de la eNOS. En effet, différentes sources de polyphénols ont montré leur capacité à augmenter l'expression de la eNOS aussi bien au niveau des ARNm qu'au niveau protéique (Leikert *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2004 ; Wallerath *et al.*, 2002). Ces effets sont associés à une augmentation de la formation basale de NO après 24 heures de traitement des cellules endothéliale avec le jus de raisin Concord (Anselm *et al.*, 2008).

Des études ont démontré la capacité des polyphénols à réduire la pression artérielle dans des modèles expérimentaux d'hypertension, induite par le L-NAME, l'angiotensine II, les DOCA-salt et les rats SHR (Sarr *et al.*, 2006 ; Bernatova *et al.*, 2002 ; Soares *et al.*, 2002 ; Lopez-Sepulveda *et al.*, 2008 ; Peng *et al.*, 2005). Comme nous l'avons vu à côté des effets anti-hypertenseurs, ils sont capables de diminuer le stress oxydant et d'assurer une fonction endothéliale normale (Wallerath *et al.*, 2003, Sarr *et al.*, 2006). L'ingestion d'extrait de raisin chez les rats obèses, prévient l'hypertension, le stress oxydant mais aussi l'hypertrophie cardiaque (Al-Awwadi *et al.*, 2004, 2005). Cette ingestion est aussi capable de prévenir le développement des plaques d'athéromes chez le hamster (Auger *et al.*, 2002, 2004). Dans notre étude sur le vieillissement nous avons mis en évidence la capacité de l'ingestion des polyphénols du vin rouge à prévenir la dysfonction endothéliale et le stress oxydant mais l'élément nouveau est aussi l'effet global sur l'organisme. En effet, nous avons mis en évidence la perte de capacité des animaux âgés à l'exercice physique, ils courent 3 fois moins longtemps que les animaux jeunes. Cette perte de capacité physique est associée à une dysfonction musculaire (augmentation du stress oxydant des muscles squelettiques, dysfonction mitochondriale) et pourrait être liée à la dysfonction endothéliale vasculaire puisque les vaisseaux assureraient moins bien leur rôle d'apport en oxygène au niveau des muscles. Les polyphénols du vin rouge sont capables de prévenir en partie cette perte de capacité globale d'exercice chez les rats âgés. En revanche nous n'avons pas réalisé les expériences chez les rats âgés ayant reçu les polyphénols de façon

curative, mais ces résultats apporteraient des renseignements complémentaires. Nous n'avons pas non plus déterminé si l'activité physique régulière pouvait avoir un effet bénéfique sachant que Pellegrin *et al.* (2008) ont démontré une augmentation de l'expression de la eNOS suite à un entraînement des animaux. En effet, si les effets de l'exercice sur la fonction endothéliale NO-dépendante des sujets sains sont controversés (Hannukainen *et al.*, 2007 ; Spier *et al.*, 2004 ; Tanriverdi *et al.*, 2005), les données de la littérature indiquent clairement le rôle de l'exercice dans la prévention et le traitement de la dysfonction endothéliale. L'exercice est capable de préserver l'intégrité de la fonction endothéliale chez les sujets à risque cardiovasculaire mais aussi de corriger la fonction endothéliale « déprimée » et ce, dans les différents territoires vasculaires (artères de conductance et de résistance) impliqués ou non dans la réalisation de l'exercice (Hannukainen *et al.*, 2007 ; Spier *et al.*, 2004 ; Tanriverdi *et al.*, 2005).

Chez l'Homme sain, il a été démontré qu'une consommation de vin rouge et de vin désalcoolisé est capable d'augmenter la vasodilatation induite par le flux (Agewall *et al.*, 2000 ; Hashimoto *et al.*, 2001). Il a aussi été démontré qu'une consommation de polyphénols du vin rouge est capable de corriger la dysfonction endothéliale induite par une alimentation riche en lipides (Cuevas *et al.*, 2000) ou par une grande consommation de cigarettes (Papamichael *et al.*, 2004). Chez les patients atteints de pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle et les maladies coronariennes, cette ingestion améliore la vasodilatation. Une consommation de thé pendant l'année précédant un infarctus du myocarde aigu est associée à une mortalité post-infarctus plus faible (Mukamal *et al.*, 2002). De plus l'équipe de Folts a démontré que la consommation du jus de raisin Concord, à raison de 7,7 ml/kg/j pendant 14 jours, améliore la dilatation de l'artère brachiale et l'oxydation des LDL chez les patients atteints de coronaropathies (Stein *et al.*, 1999). Plus récemment une étude coréenne a montré que ce jus à raisin de 5,5 ml/kg/jour (équivalent à 2 verres par jour) pendant 8 semaines est capable de réduire la pression artérielle systolique de 7,2 mmHg et diastolique de 6,2 mmHg chez des hommes coréens modérément hypertendus (Park *et al.*, 2004). De plus, l'ingestion régulière de polyphénols du vin rouge est associée à des effets bénéfiques sur les biomarqueurs inflammatoires chez l'Homme (Freedman *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces données soulignent que l'ingestion de produits riches en polyphénols tant chez l'animal que chez l'Homme, a un effet bénéfique sur différentes pathologies cardiovasculaires, incluant l'hypertension artérielle, l'athérosclérose et le vieillissement. Cet

effet bénéfique et protecteur n'est pas exclusif à notre extrait de vin de Corbières, n'est pas dépendant non plus de la composante alcoolique ni des processus de maturation en barrique et n'est pas exclusif au vin rouge, puisque comme nous l'avons vu tout au long de ce mémoire, les mêmes effets sont rapportés pour le jus de raisin, la peau et les pépins de raisin, le thé, le chocolat et même certains vins blancs. L'effet bénéfique de ces polyphénols est notamment associé à une restauration de l'effet protecteur des cellules endothéliales en normalisant le stress oxydant excessif et à leur capacité à stimuler la formation des facteurs vasodilatateurs.

Certes ces nombreuses données appuient le potentiel bénéfique d'une consommation de composés riches en polyphénols, mais il reste de nombreux points obscurs dans la compréhension de ces effets. En particulier, quelle est la cinétique d'induction de la protection ? Est ce que l'ingestion doit être quotidienne ? quel(s) polyphénol(s) est à l'origine de cette protection ? Est-ce un mélange de molécules agissant en synergie, une classe (flavonols, flavanols) ou bien une molécule particulière (resvératrol, épicatechine) ? Est-ce que pour toutes les sources de polyphénols se sont les mêmes molécules qui leur procurent leur effet bénéfique ? Quels en sont les mécanismes ? ou encore il y a-t-il des récepteurs aux polyphénols ou bien pénètrent-ils directement dans la cellule ? Les réponses à toutes ces questions aideront à mieux comprendre le potentiel de ces produits pour maintenir un système cardiovasculaire fonctionnel et la santé chez l'Homme.

Ainsi, en perspectives de ce travail sur le vieillissement, il serait nécessaire dans le cadre de la prévention mais aussi du traitement de déterminer : 1) les temps et doses nécessaires et suffisantes pour assurer les effets protecteurs, 2) si l'effet bénéfique persiste après l'arrêt du traitement ou bien si une prise continue et régulière est nécessaire, 3) si d'autres sources de polyphénols (jus de raisin, thé vert, chocolat) sont capables d'induire les mêmes effets. Il serait aussi important de déterminer si les polyphénols sont capables de prolonger la durée de vie des animaux en réalisant des tests de survie comme l'a démontré le resvératrol dans un modèle de souris obèse (Baur *et al.*, 2006). Toujours dans le cadre du vieillissement et des effets protecteurs des polyphénols, il serait intéressant de réaliser ces expériences avec des rats plus âgés et chez qui il y a généralement apparition de pathologies associées à l'âge comme l'hypertension artérielle. L'identification de l'origine des altérations observées et des mécanismes plus en amont permettrait de mieux comprendre encore le rôle du système cardiovasculaire dans la physiologie du vieillissement de l'organisme entier.

Il serait intéressant de déterminer dans le modèle d'hypertension artérielle induite par l'infusion chronique d'angiotensine II si un traitement préventif et / ou curatif est capable de prévenir et / ou de restaurer une pression artérielle normale et une fonction endothéliale normale chez les animaux. L'effet anti-hypertenseur et l'effet bénéfique sur la fonction endothéliale de l'aorte de rat ont déjà démontré dans notre équipe par Sarr *et al.* (2006) mais nous ne disposons pas de données concernant l'artère mésentérique, ni même d'un potentiel effet curatif de ce traitement. Ces traitements pourraient être comparés à des traitements avec des anti-hypertenseurs classiques tels que les sartans ou la combinaison d'hydralazine et de hydrochlorothiazide.

Au vue des effets bénéfiques des polyphénols du vin rouge sur notamment le stress oxydant, et du rôle de ce dernier mis en évidence dans notre étude sur le SHP, il serait envisageable d'étudier les effets de polyphénols de jus de raisin ou de thé vert pour la prévention ou améliorer le traitement de ces pathologies, s'affranchissant ainsi de la composante alcoolique dans le cadre d'une pathologie associée à une cirrhose. Cela permettrait chez l'Homme de pouvoir proposer de nouvelles indications hygiéno-diététiques pour les patients notamment en attente de greffe. De plus, les traitements avec l'apocynine et le losartan ont permis de prévenir les complications liées à la ligature de la voie biliaire commune. Mais est-ce que ces deux traitements s'avèrent efficaces pour traiter des rats atteints du SHP. La réponse à cette question permettrait aussi de proposer d'autres traitements pour les patients en attente de greffe et chez qui le traitement des complications est vital.

En conclusion, ces études ont permis de mettre en évidence des similitudes dans les mécanismes de l'atteinte vasculaire observée dans l'hypertension artérielle, le SHP ainsi que dans le vieillissement. Ceux-ci offrent ainsi de nouvelles pistes quant à l'implication majeure du stress oxydant et du système rénine-angiotensine dans ces pathologies. Deux traitements se sont avérés efficaces pour ces pathologies, le losartan dans le traitement du SHP et de ses complications et les polyphénols du vin rouge bénéfiques pour le vieillissement physiologique. Du point de vue clinique, nos résultats suggèrent que le losartan pourrait ainsi ouvrir sa fenêtre thérapeutique au contrôle et à l'amélioration de l'hyperdynamie circulatoire et spécialement dans le SHP, complication de la cirrhose et de l'hypertension portale.

Les polyphénols du vin rouge avaient déjà démontré leur capacité à prévenir l'hypertension artérielle mais offrent aujourd'hui de nouveaux espoirs quant à leurs effets bénéfiques pour le système vasculaire au cours du vieillissement physiologique. A l'heure actuelle,

des études sont en cours dans notre laboratoire afin de déterminer quelles sont les molécules actives dans l'extrait complexe de vin rouge dans l'optique de développer des molécules à visée thérapeutique. De plus, l'identification des sources alimentaires (fruits, légumes, boissons) riches en ces molécules actives permettra de proposer des orientations hygiéno-diététiques en conseillant une consommation régulière de ces aliments et boissons.

Références

A

Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Matsumoto Y, Hattori T, Nakashima Y, Kaibuchi K, Sueishi K, Takeshit A. Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circ Res*. 2004; 94, 385-393.

Abou-Agag LH, Aikens ML, Tabengwa EM, Benza RL, Shows SR, Grenett HE, Booyse FM. Polyphenolics increase t-PA and u-PA gene transcription in cultured human endothelial cells. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001; 25, 155-62.

Adelstein RS, Hathaway DR. Role of calcium and cyclic adenosine 3':5' monophosphate in regulating smooth muscle contraction. Mechanisms of excitation-contraction coupling in smooth muscle. *Am J Cardiol*. 1979, 44:783-7.

Adnot S, Raffestin B, Eddahibi S, Braquet P, Chabrier PE. Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. *J Clin Invest*. 1991; 87, 155-162.

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; 52:5593-5597.

Albrecht EW, Stegemen CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol*. 2003; 199:8-17.

Alcaraz MJ, Houtt JR. Actions of flavonoids and the novel anti-inflammatory flavone, hypolaetin-8-glucoside on prostaglandin biosynthesis and inactivation. *Biochemical Pharmacology*. 1985; 34: 2477-2482.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001; 357:593-615

Almeida JA, Riordan SM, Liu J, Galhenage S, Kim R, Bihari D, Wegner EA, Cranney GB, Thomas PS. Deleterious effect of nitric oxide inhibition in chronic hepatopulmonary syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 19:341-346.

Agarwal DP. Cardioprotective effects of light-moderate consumption of alcohol: a review of putative mechanism. *Alcohol Alcohol*. 2002, 37, 409-15.

Agewall S, Wright S, Doughty RN, Whalley GA, Duxbury M, Sharpe N. Does a glass of red wine improve endothelial function? *Eur Heart J*. 2000 Jan;21(1):74-8.

Ahern GP, Hsu SF, Jackson MB. Direct actions of nitric oxide on rat neurohypophysial K⁺ channels. *J Physiol* 1999;520(Pt 1):165-76

Akbari CM, LoGerfo FW. Diabetes and peripheral vascular disease. *J Vasc Surg.* 1999; 30:373-84.

Andrawis N, Jones DS and Abernethy DR. Aging is associated with endothelial dysfunction in the human forearm vasculature. *J Am Geriatr Soc.* 2000; 48:193-198.

Andreoletti O, Levavasseur E, Uro-Coste E, Tabouret G, Sarradin P, Delisle MB, Andreoletti O, Levavasseur E, Uro-Coste E, Tabouret G, Sarradin P, Delisle MB (2002). Astrocytes accumulate 4-hydroxynonenal adducts in murine scrapie and human Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Dis* 11: 386-393.

Andreoli SP, Mallett CP, Bergstein JM. Role of glutathione in protecting endothelial cells against hydrogen peroxide oxidant injury. *J Lab Clin Med.* 1986 Sep;108(3):190-8.

Andrews KL, Irvine JC, Tare M, Apostolopoulos J, Favaloro JL, Triggle CR, Kemp-Harper BK. A role for nitroxyl (HNO) as an endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factor in resistance arteries. *Br J Pharmacol.* 2009 Mar 25. [Epub ahead of print]

Andriambeloson E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br J Pharmacol.* 1997; 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. Diabetes impairs endothelium-dependent relaxation of human penile vascular tissues mediated by NO and EDHF. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 312:1202-1208.

Anselm E, Chataigneau M, Ndiaye M, Chataigneau T, Schini-Kerth V.B. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. *Cardiovascular Research.* 2007; 73:404-13.

Anselm E, Socorro VF, Dal-Ros S, Schott C, Bronner C, Schini-Kerth VB. Crataegus special extract WS 1442 causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of endothelial NO synthase but not via activation of estrogen receptors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009; 53:253-60.

Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinoshita N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr.* 2000; 130: 2243-50.

Arakawa K, Urata H. Hypothesis regarding the pathophysiological role of alternative pathways of angiotensin II formation in atherosclerosis. *Hypertension.* 2000; 36:638-41.

Ardailou R, Michel JB. The relative roles of circulating and tissue renin-angiotensin systems. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; 14:283-286.

Arguedas MR, Abrams GA, Krowka MJ, Fallon MB. Prospective evaluation of outcomes and predictors of mortality in patients with hepatopulmonary syndrome undergoing liver transplantation. *Hepatology.* 2003; 37:192-197.

Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci.* 1999; 55:1078-1087.

Arruda RM, Peotta VA, Meyrelles SS, Vasquez EC. Evaluation of Vascular Function in Apolipoprotein E Knockout Mice With Angiotensin-Dependent Renovascular Hypertension. *Hypertension.* 2005; 46:932-6.

Atkinson J, Tatchum-Talom R, Capdeville-Atkinson C. Reduction of endothelial function with age in the mesenteric arterial bed of the normotensive rat. *British journal of pharmacology.* 1994; 111:1184-1188.

Atkinson J. Effect of aging and chronic angiotensin I converting enzyme inhibition on the endothelial function of the mesenteric arterial bed of the rat. *Am J Cardiol.* 1995; 24:19E-23E.

Aubin MC, Carrier M, Shi YF, Tardif JC, Perrault LP. Role of probucol on endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries associated with left ventricular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006; 47:702-10.

Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1989; 13, 859-64.

Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Thromboxane A2 receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension.* 1990; 15: 699-703

Auch-Schwelk W, Vanhoutte PM. Contractions to endothelin in normotensive and spontaneously hypertensive rats: Role of endothelium and prostaglandins. *Blood Pressure* ; 1992; 1: 45-49.

Auger C, Caporiccio B, Landrault N, Teissedre PL, Laurent C, Cros G, Besançon 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*). *The Journal of nutrition.* 2004; 132:1207-1213.

Auger C, Laurent N, Laurent C, Besançon P, Caporiccio B, Teissédre PL, Rouanet JM. Hydroxycinnamic acids do not prevent aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden Syrian hamsters. *Life Sci.* 2004; 74:2365-77.

B

Babamusta F, Rateri DL, Moorleghe JJ, Howatt DA, Li XA, Daugherty A. Angiotensin II infusion induces site-specific intra-laminar hemorrhage in macrophage colony-stimulating factor- efficient mice. *Atherosclerosis.* 2005; 186:282-90.

Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999; 93:1464-76.

Badimon L, Badimon JJ, Penny W, Webster MW, Chesebro JH, Fuster V. Endothelium and atherosclerosis. *J Hypertens.* 1992; 10:543-50.

Ballinger SW. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Radical Biol Med.* 2005; 38:1278-95.

Barriere E, Tazi KA, Pessione F, Hller J, Poirel O, Lebrec D, Moreau R. Role of small-conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channels in in vitro NO-mediated aortic hyporeactivity to a -adrenergic vasoconstriction in rats with cirrhosis. *J. Hepatol.* 2001; 35:350-357.

Barrière E, Tazi KA, Rona JP, Pessione F, Heller J, Lebrec D, Moreau R. Evidence for an endothelium-derived hyperpolarizing factor in the superior mesenteric artery from rats with cirrhosis. *Hepatology.* 2000; 32:935-941.

Barton M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis: endothelin receptor antagonists as novel therapeutics. *Curr Hypertens.* 2000; 2:84-91.

Basso N, Cini R, Pietrelli A, Ferder L, Terragno NA, Inserra F. Protective effect of long-term angiotensin II inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293:H1351-8.

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 2006; 444:337-42.

Bauersachs J, Popp R, Hecker M, Sauer E, Fleming I, Busse R. Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation.* 1996; 94:3341-7.

Banfi B, Maturana A, Jaconi S, Arnaudeau S, Laforge T, Sinha B, Ligeti E, Demaurex N, Krause KH. A mammalian H^+ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science.* 2000; 287:138-42.

Beatty ER, O'Reilly JD, England TG, McAnlis GT, Young IS, Geissler CA, Sanders TA, Wiseman H. Effect of dietary quercetin on oxidative DNA damage in healthy human subjects. *Br J Nutr.* 2000; 84:919-25.

Beaudeux JL. Oxidative modification of lipoprotein (a): physical chemical aspects and biologic implications. *Ann Pharm Fr.* 1999; 57:266-75.

Bengtsson SH, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003; 30:849-854.

Bentzon JF, Skovenborg 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; 103:1681-1687.

Beny JL, von der Weid PY. Hydrogen peroxide: an endogenous smooth muscle cell hyperpolarizing factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 176:378 -384.

Beny JL. Information Networks in the Arterial Wall. *News Physiol Sci.* 1999; 14:68-73.

Beny JL, Pacicca C. Bidirectional electrical communication between smooth muscle and endothelial cells in the pig coronary artery. *Am J Physiol.* 1994; 266:H1465-H1472.

- Bernardi M, Trevisani F. Systemic and regional hemodynamics in pre-ascitic cirrhosis. *J Hepatol*. 1997; 27:588-591.
- Bernátová I, Pechánová O, Babál P, Kyselá 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.
- Berry C, Hamilton CA, Brosnan MJ, Magill FG, Berg GA, McMurray JJ, Dominiczak AF. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation*. 2000; 101:2206-2212.
- Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, Giovannini L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res*. 1998; 24:133-138.
- Blackwell KA, Sorenson JP, Richardson DM, Smith LA, Suda O, Nath H, Katusic ZS. Mechanisms of aging-induced impairment of endothelium-dependent relaxations-role of tetrahydrobiopterin. *Am J Physiol*, 2004; 287:2448-53.
- Boldogh I, Bacsi A, Choudhury BK, Dharajiya N, Alam R, Hazra TK, Mitra S, Goldblum RM, Sur S. ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation. *J Clin Invest*. 2005; 115:2169-2179.
- Boffetta P, Garfinkel L. Alcohol drinking and mortality among men enrolled in an American Cancer Society prospective study. *Epidemiology*. 1999; 1:342-8.
- Bohm M, Rosenkranz S, Laufs U. Alcohol and red wine : impact on cardiovascular risk. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19:11-6.
- Bousette N, Giaid A. Endothelin-1 in atherosclerosis and other vasculopathies. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003; 81:578-587.
- Boyd GW, Jones MBS, Peart WS. The Radio-immunoassay of Angiotensin II and Plasma Renin Activity in Human Hypertension (Genest J and Koiv E eds) pp 538-591, Springer-Verlag, Berlin, Germany.1972.
- Brakemeier S, Eichler I, Knorr A, Fassheber T, Kohler R, Hoyer J. Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channel in renal artery endothelium in situ by nitric oxide and reactive oxygen species. *Kidney Int*. 2003; 64:199 -207.
- Brandes RP, Barton M, Schweitzer G, Phillippens KMH, Mügge A. Endothelial-derived superoxide anion in pig coronary arteries: evidence from lucigenin chemiluminescence and histochemical techniques. *J Physiol (Lond)*. 1997; 500:331-42.
- Bravo L. Polyphenols : chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 1998; 56:317-33.
- Brussino L, Bucca C, Morello M, Scappaticci E, Mauro M, Rolla G. Effect on dyspnoea and hypoxaemia of inhaled N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in hepatopulmonary syndrome. *Lancet*. 2003; 362:43-44.

Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*. 1996 ;27:523-528.

Bulckaen H, Prévost G, Boulanger E, Robitaille G, Roquet V, Gaxatte C, Garçon G, Corman B, Gosset P, Shirali P, Creusy C, Puisieux F. Low-dose aspirin prevents age-related endothelial dysfunction in a mouse model of physiological aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . 2008; 294: H1562-H1570.

Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane JR. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins*. 1976; 12:897-913.

Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci*. 2002; 23:374-380.

Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res*. 1996; 33:181-194.

Busse R, Fleming I. Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *Trends Pharmacol Sci*. 2004; 24:24-29.

C

Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat JL, Sauvaigo S. Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol Chem*. 2002. 383:933-943.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases : the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000; 87:840-844.

Caligiuri G. Role of the immune response in atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Med Sci (Paris)*. 2004; 20:175-181.

Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res*. 1996 ; 78:415-423.

Carbonneau MA, Leger CL, Monnier L, Bonnet C, Michel F, Fouret G, Dedieu F, Descomps B. Supplementation with wine phenolic compounds increases the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoprotein without changing the lipoprotein Cu(2+)-oxidizability : possible explanation by phenolic location. *Eur J Clin Nutr*. 1997; 51: 682-690.

Carluccio F, Siems W, Stefanelli G, Sommerburg O, Grune T, Riedel E, Hampl H. Homocysteine in chronic renal failure in relation to renal anemia and to oxidative stress parameters 4-hydroxynonenal and malondialdehyde. *Clin Nephrol* . 2002; 58:S26-S30.

Carter EP, Sato K, Morio Y, McMurtry IF. Inhibition of K(Ca) channels restores blunted hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats with cirrhosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279:L903-L910.

Castle NA. Recent advances in the biology of small conductance calcium-activated potassium channel. *Perspect Drug Discov.* 1999; 15/16:131-154.

Castro SM, Guerrero-Plata A, Suarez-Real G, Adegboyega PA, Colasurdo GN, Khan AM, Garofalo RP, Casola A. Antioxidant treatment ameliorates respiratory syncytial virus-induced disease and lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174: 1361-1369.

Castro AF, Amorena C, Muller A, Ottaviano G, Tellez-Inon MT, Taquini AC. Extracellular ATP and bradykinin increase cGMP in vascular endothelial cells via activation of PKC. *Am J Physiol.* 1998; 275:C113-C119.

Cernadas MR, Sánchez de Miguel L, Garcia-Durán M, González-Fernández F, Millás I, Montón M, Rodrigo J, Rico L, Fernández P, de Frutos T, Rodríguez-Feo JA, Guerra J, Caramelo C, Casado S, López-Farré A. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res.* 1998; 83:279-286.

Chataigneau T, Feletou M, Duhault J, Vanhoutte PM. Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *Br J Pharmacol.* 1998a; 123:574-580.

Chataigneau T, Feletou M, Thollon C, Villeneuve N, Vilaine JP, Duhault J, Vanhoutte PM. Cannabinoid CB1 receptor and endothelium-dependent hyperpolarization in guinea-pig carotid, rat mesenteric and porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol.* 1998b; 123:968-974.

Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthin oxidase. *Anticancer Res.* 1993; 13:2165-2170.

Channon KM. Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 2004; 14:323-327.

Chappell MC, Pirro NT, Sykes A, Ferrario CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension.* 1998; 31:362-367.

Charpie JR, Schreur KD, Papadopoulos SM, Webb RC. Endothelium dependency of contractile activity differs in infant and adult vertebral arteries. *J Clin Invest.* 1994; 93:1339-1343.

Chaytor AT, Edwards DH, Bakker LM, Griffith TM. Distinct hyperpolarizing and relaxant roles for gap junctions and endothelium-derived H₂O₂ in NO-independent relaxations of rabbit arteries. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100:15212-15217.

Chen MF, Mo LR, Lin RC, Kuo JY, Chang KK, Liao C, Lu FJ. Increase of resting levels of superoxide anion in the whole blood of patients with decompensated liver cirrhosis. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23:672-679.

Chen GF, Suzuki H. Calcium dependency of the endothelium-dependent hyperpolarization in smooth muscle cells of the rabbit carotid artery. *J Physiol.* 1990; 421:521-534.

Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension.* 2001; 38:606-611.

Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 2001; 269 : 131-140.

Cheung DW, Chen G. Calcium activation of hyperpolarization response to acetylcholine in coronary endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992; 12:S120 -S123.

Cheynier V, Fulcrand H, Sani P, Moutonnet M. Application des techniques analytiques à l'étude des composés phénoliques et leurs réactions au cours de leur vinification. *In Vino Analytica Scienta. Analysis Magazine.* 1997; 25 :14-44.

Chinellato A, Pandolfo L, Ragazzi E, Zambonin MR, Froli G, De Biasi M, Caparrotta L, Fassina G. Effect of age on rabbit aortic responses to relaxant endothelium-dependent and endothelium-independent agents. *Blood Vessels.* 1991; 28:358-365.

Chowdhury PK, Halder M, Choudhury PK, Kraus GA, Desai MJ, Armstrong DW, Casey TA, Rasmussen MA, Petrich JW. Generation of fluorescent adducts of malondialdehyde and amino acids: toward an understanding of lipofuscin. *Photochem Photobiol.* 2004; 79:21-25.

Cishek MB, Galloway MT, Karim M, German JB, Kappagoda CT. Effect of red wine on endothelium-dependent relaxation in rabbits. *Clin Sci (Lond).* 1997; 93:507-511.

Clark RA. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis.* 1999; 179: S309-S317.

Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation.* 1995; 92:3337-3349.

Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.* 1994; 46:205-229.

Colmenero J, Bataller R, Sancho-Bru P, Bellot P, Miquel R, Moreno M, Jares P, Bosch J, Arroyo V, Calalleria J, Gines P. Hepatic expression of candidate genes in patients with alcoholic hepatitis: correlation with disease severity. *Gastroenterology.* 2007; 132:687-97.

Corriu C, Feletou M, Canet E, Vanhoutte PM. Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol.* 1996; 119:959-964.

Cosentino F, Barker JE, Brand MP, Heales SJ, Werner ER, Tippins JR, West N, Channon KM, Volpe M, Luscher TF. Reactive oxygen species mediate endothelium-dependent relaxations in tetrahydrobiopterin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:496-502.

Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension.* 1994; 23:229-235.

Coulomb C, Lizzi Y, Coulomb PJ, Roggero JP, Coulomb PO, Agulhon O. Phytoma-La Défense des Végétaux. 1999; 512:41-46

Cowan CL, Cohen RA. Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses. *Am J Physiol.* 1991; 261:H830-H835.

Cremona G, Higenbottam TW, Mayoral A, Alexander G, Demoncheaux E, Borland C, Roe P, Jones GJ. Elevated exhaled nitric oxide in patients with hepatopulmonary syndrome. *Eur Respir J*. 1995; 8:18883-1885.

Csiszar A, Labinskyy N, Orosz Z, Xiangmin Z, Buffenstein R, Ungvari Z. Vascular aging in the longest-living rodent, the naked mole rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . 2007; 293, H919-H927.

Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, Kaley G. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circulation research*. 2002; 90:1159-1166.

Cuevas AM, Guasch V, Castillo O, Irribarra V, Mizon C, San Martin A, Strobel P, Perez D, Germain AM, Leighton F. A high-fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. *Lipids*. 2000; 35:143-8.

D

Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med*. 2003;9: 169-176.

da Luz PL, Serrano Junior CV, Chacra AP, Monteiro HP, Yoshida VM, Furtado M, Ferreira S, Gutierrez P, Pileggi F. The effect of red wine on experimental atherosclerosis: lipid-independent protection. *Exp Mol Pathol*. 1999; 65:150-159.

Dal-Ros S, Bronner C, Schott C, Kane MO, Chataigneau M, Schini-Kerth VB, Chataigneau T. Angiotensin II-induced hypertension is associated with a selective inhibition of EDHF-mediated responses in the rat mesenteric artery. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; 328:478-486.

Danser AH, van Keesteren CA, Bax WA, Tavenier M, Derkx FH, Saxena PR, Schalekamp MA. Prorenin, renin, angiotensinogen, and angiotensin-converting enzyme in normal and failing human hearts. Evidence for renin binding. *Circulation*. 1997; 96 :220-226.

Davidge ST, Hubel CA, McLaughlin MK. Impairment of vascular function is associated with an age-related increase of lipid peroxidation in rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* . 1996; 40:R1625-R1631.

Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109:III27-III32.

Day AP, Kemp HJ, Bolton C, Hartog M, Stansbie D. Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation. *Ann Nutr Metab*. 1997; 41:353-357.

Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007; 115:1285-1295.

De BK, Bandyopadhyay K, Das TK, Das D, Biswas PK, Majumdar D, Mandal SK, Ray S, Dasgupta S. Portal pressure response to losartan compared with propranolol in patients with cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98:1371-1376.

de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*, 2000; 52:415-472.

DeLeo FR, Quinn MT. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol* 1996 ; 60 : 677-91.

De Lano FA, Parks DA, Ruedi JM, Babior BM, Schmid-Schönbein GW. Microvascular display of xanthine oxidase and NADPH oxidase in the spontaneously hypertensive rat. *Microcirculation*. 2006;13: 551-566.

Dell'Agli M, Busciola A, Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Res*, 2004; 63:593-602.

De Gaetano G, De Curtis A, Di Castelnuovo A, Donati MB, Lacoviello L, Rotondo S. Antithrombotic effect of polyphenols in experimental models: a mechanism of reduced vascular risk by moderate wine consumption. *Ann N Y Acad Sci*, 2002; 957:174-188.

Demrow HS, Slane PR, Folts JD. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation*. 1995;91:1182-1188.

Derkach DN, Ihara E, Hirano K, Nishimura J, Takahashi S, Kanaide H. Thrombin causes endothelium-dependent biphasic regulation of vascular tone in the porcine renal interlobar artery. *Br J Pharmacol*. 2000; 131:1635-1642.

Dickinson DA, Forman HJ. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 973:488-504.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R and Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999; 399:601-605.

Ding H, Jiang Y, Triggle CR. The contribution of D-tubocurarine and apamin-sensitive potassium channels to endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation of small arteries from eNOS-/- mice. In: Vanhoutte PM, ed. *EDHF 2002*. London: Taylor and Francis, 2003; 283-296.

Ding H, Kubes P, Triggle C. Potassium- and acetylcholine-induced vasorelaxation in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*. 2000; 129:1194-1200.

Dobrian AD, Davies MJ, Schriver SD, Lauterio TJ, Prewitt RL. Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertension*. 2001; 37:554-560.

Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, Levy AS, Pierce GL, Gates PE, Seals DR. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans : relation to impaired endothelium-dependent dilatation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res*, 2007; 100:1659-1666.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE et Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, 2000; 87: E1-E9.

Dora KA, Doyle MP, Dubling BR. Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:6529-6534.

Doughty J.M., Plane F, Langton P.D. Charybdotoxin and apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: H1107-H1112.

Ducrocq C, Servy C, Cudic M and Blanchard EB. Intervention by nitric oxide, NO, and its oxide derivatives particularly in mammals. *Can J Physiol Pharmacol*. 2001; 79:95-102.

Duffy SJ, Via JA. Effects of pheolic on vascular endothelial function. *Curr Opin Lipidol*, 2003;14, 21-27.

Dzau VJ. Theodore Cooper Lecture : Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease : a unifying hypothesis. *Hypertension*, 2001; 37:1047-1052.

Dzau VJ. Vascular wall renin-angiotensin pathway in control of the circulation. A hypothesis. *Am J Med*. 1984; 77:31-36.

Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlof B, Deanfield J, Diez J, Drexler H, Ferrari R, Van Gilst W, Hansson L, Hornig B, Husain A, Johnston C, Lazar H, Lonn E, Luscher T, Mancini J, Mimran A, Pepine C, Rabelink T, Remme W, Ruilope L, Ruzicka M, Schunkert H, Swedberg K, Unger T, Vaughan D et Weber M. Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2002; 16:149-160.

Dzau VJ, Ellison KE, Brody T, Ingelfinger J et Pratt RE. (1987) A comparative study of the distributions of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and mouse tissues. *Endocrinology*, 120(6), 2334-2338.

E

Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*. 1998; 396:269-272.

Edwards G, Félétou M, Gardener MJ, Thollon C, Vanhoutte PM, Weston AH. Role of gap junctions in the responses to EDHF in rat and guinea-pig small arteries. *Br J Pharmacol* . 1999; 128:1788-1794.

Edwards G, Weston AH. Potassium and potassium clouds in endothelium-dependent hyperpolarizations. *Pharmacol Res*. 2004; 49:535-541.

Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Kuga T, Urabe Y, Takeshita A. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. *Circulation*. 1993; 88:77-81.

Eizawa H, Yui Y, Inoue R, Kosuga K, Hattori R, Aoyama T, Sasayama S. Lysophosphatidylcholine inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and N omega-nitro-L-arginine/indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the porcine coronary artery. *Circulation*. 1995; 92:3520-3526.

Ellis A, Pannirselvam M, Anderson TJ, Triggle CR. Catalase has negligible effects on endothelium-dependent relaxations in mouse isolated aorta and small mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 2003; 140: 1193-1200.

Elmedal B, De Dam MY, Mulvany MJ, Simosen U. The superoxide dismutase mimetic, tempol, blunts right ventricular hypertrophy in chronic hypoxic rats. *Br J Pharmacol*. 2004; 141:105-113.

Elmoselhi AB, Samson SE, Grover AK. SR Ca²⁺ pump heterogeneity in coronary artery: free radicals and IP₃-sensitive and -insensitive pools. *Am J Physiol*. 1996; 271:C1652-1659.

Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000; 35:1270-1277.

Eskurza I, Myerburgh LA, Kahn ZD, Seals DR. Tetrahydrobiopterin augments endothelium-dependent dilatation in sedentary but not in habitually exercising older adults. *J Physiol*. 2005; 568:1057-1065.

Eskurza I, Kahn ZD, Seals DR. Xanthine oxidase does not contribute to impaired peripheral conduit artery endothelium-dependent dilatation with ageing. *J Physiol*. 2006;571:661-668.

Esterbauer H, Geibicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med*. 1992; 13:341-390.

F

Faloia E, Gatti C, Camilloni MA, Sardu C, Garrapa GG, Mantero F, Giacchetti G. Comparison of circulating and local adipose tissue renin-angiotensin system in normotensive and hypertensive obese subjects. *J Endocrinol Invest*, 2002 ; 25 :309-314.

Fallon MB, Abrams GA : Pulmonary dysfunction in chronic liver disease. *Hepatology*. 2000;32: 859-65.

Fallon MB, Abrams GA, Luo B, Hou Z, Dai J, Ku DD. The role of endothelial nitric oxide synthase in the pathogenesis of a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 1997;113:606-614.

Fan TP, Jaggar R, Bicknell R. Controlling the vasculature : angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 1995; 16:57-66.

Fasciolo JC. The experimental observation that led to discovery of angiotensin. 1939 Buenos Aires, Argentina. *Hypertension*, 1990; 16:194-198.

Favaloro JL, Kemp-Harper BK. The nitroxyl anion (HNO) is a potent dilator of rat coronary vasculature. *Cardiovasc Res*. 2007;73:587-596.

Fawzy A A, Vishwanath BS, Franson RC. Inhibition of human non-pancreatic phospholipases A₂ by retinoids and flavonoids. Mechanism of action. *Agents and Actions* . 1988; 25:394-400.

Félicitou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor(s) hyperpolarization(s) coronary smooth muscle. *The Physiologist*. 1985; 48 :325.

Félicitou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1988; 93: 515-524.

Félicitou M, Vanhoutte PM. EDHF : the complete story. *Boca Raton, Fl., Taylor and Francis CRC press*, 2006a; 1-278.

Félicitou M, Vanhoutte PM. EDHF: new therapeutic targets? *Pharmacol Res*. 2004; 49:565-580.

Félicitou M, Vanhoutte P.M. Endothelial dysfunction : a multifaceted disorder. *Am J Physiol*. 2006; 291:H985-1002.

Feillet-Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Cristol JP, Coudray C. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radic Biol Med*. 2009; 46:624-632.

Ferder LF, Inserra F, Basso N. Advances in our understanding of aging: role of the renin-angiotensin system. *Curr Opin Pharmacol*. 2002; 2:189-194.

Fernando B, Marley R, Holt S, Anand R, Harry D, Sanderson P, Smith R, Hamilton G, Moore K. N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat. *Hepatology*. 1998; 28:689-694.

Ferrandiz ML, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents actions*, 1991; 32:283-288.

Ferrandiz ML, Nair AG, Alcaraz MJ. Inhibition of sheep platelet arachidonate metabolism by flavonoids from Spanish and Indian medicinal herbs. *Pharmazie*, 1990; 45:206-208.

Ferrario CM, Iyer SN. Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regul Pept*. 1998; 8:13-18.

Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*, 1997; 30:535-541.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000; 408 : 239-47.

Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol*, 1993; 265:H774-H778.

Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*. 1999; 401:493-497.

Fleming I, Bara AT, Busse R. Calcium signalling and autacoid production in endothelial cells are modulated by changes in tyrosine kinase and phosphatase activity. *J Vasc Res*. 1996; 33:225-234.

Fleming I, Bauersachs J, Busse R. Calcium-dependent and calcium-independent activation of the endothelial NO synthase. *J Vasc Res.* 1997a; 34:165-174.

Fleming I, Busse R. Control and consequences of endothelial nitric oxide formation. *Adv Pharmacol.* 1995; 34:187-206.

Fleming I, Busse R. Tyrosine phosphorylation and bradykinin-induced signaling in endothelial cells. *Am J Cardiol.* 1997b; 80:102A-109A.

Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res.* 1999; 43 :532-541.

Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284:R1-R12.

Fleming I, Fisslthaler B, Michaelis UR, Kiss L, Popp R, Busse R. The coronary endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) stimulates multiple signaling pathways and proliferation in vascular cells. *Pflugers Arch.* 2001b; 442:511-8.

Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res.* 2001a; 88:E68-75.

Fluckiger M. Vorkommen von trommelschlägelförmigen fingerendphalangen ohne chronische veränderungen an der lungen oder am herzen. *Wien Med Wschr.* 1884; 34:1457.

Fukuto JM, Wallace GC, Hszieh R, Chaudhuri G. Chemical oxidation of N-hydroxyguanidine compounds. Release of nitric oxide, nitroxyl and possible relationship to the mechanism of biological nitric oxide generation. *Biochem Pharmacol.* 1992; 43:607-613.

Fulton D, Fontana J, Sowa G, Gratton JP, Lin M, Li KX, Michell B, Kemp BE, Rodman D, Sessa WC. Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. *J Biol Chem* 2002; 277:4277-4284.

Fulton D, Mcgiff JC, Quilley J. Pharmacological evaluation of an epoxide as the putative hyperpolarizing factor mediating the nitric oxide-independent vasodilator effect of bradykinin in the rat heart. *J. Pharmacol Exp Ther.* 1998; 287:497-503.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.

Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr.* 1995; 61:549-554.

Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q 4th, 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.

- Förstermann. U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *Faseb J*. 1998; 12:773-790.
- Fortepiani LA, Zhang H, Racusen L, Roberts LJ II, Reckelhoff JF. Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 2003; 41:640-645.
- Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wähälä K, Montesano R, Schweigerer L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res*, 1997; 57:2916-2921.
- Fraleay AE, Tsimikas S. Clinical applications of circulating oxidized low-density lipoprotein biomarkers in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2006; 17: 502-509.
- 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; 341:454-457.
- Freedman JE, Parker C, 3RD, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, Deak LR, Iafrati MD, Folts JD. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation*, 2001;103:27922-2798.
- Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension*, 1996;28:104-107.
- Frenoux JM, Noirod B, Prost ED, Madani S, Blond JP, Belleville JL, Prost JL. Very high alpha-tocopherol diet diminishes oxidative stress and hypercoagulation in hypertensive rats but not in normotensive rats. *Med Sci Monit*, 2002;8:BR401-BR407.
- Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, Nadal-Ginard B, Anversa P. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res*, 2000; 87 :1123-1132.
- Fujii K, Tominaga M, Ohmori S, Kobayashi K, Koga T, Takata Y, Fujishima M. Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1992; 70:660-669.
- Fujii K, Ohmori S, Tominaga M, Abe I, Takata Y, Ohya Y, Kobayashi K, Fujishima M. Age-related changes in endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery. *Am J Physiol*, 1993; 265/H509-H516.
- Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J* 1989; 3:2007-2018
- Furner S, Brody J, Jankowski L. Epidemiology and aging. In: *Geriatric Medicine, 3d Ed.* Cassel C, Cohen H, Larson E, Meier DE, Resnick N, Rubenstein L, Sorenson L., eds., New York, Springer, 1997; 37-43.

Galati G, Chan T, Wu B, O'Brien PJ. Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. *Chem Res Toxicol*. 1999; 12:521-5.

Galati G, Moridani MY, Chan TS, O'Brien PJ. Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. *Free Radic Biol Med*. 2001; 30:370-382.

Gallis B, Corthals GL, Goodlett DR, Ueba H, Kim F, Presnell SR, Figeys D, Harrison DG, Berk BC, Aebbersold R, Corson MA. 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* 1999; 274:30101-30108.

Gao YJ, Lee RM. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A2 production. *Br J Pharmacol*. 2001; 134: 1639-1646.

Gao Y, Vanhoutte PM. Products of cyclooxygenase mediate the responses of the guinea pig trachea to hydrogen peroxide. *J Appl Physiol*. 1993; 74: 2105-2111.

Garcia ML, Galvez A, Garcia-Calvo M, King VF, Vasquez J, Kaczorowski GJ. Use of toxins to study potassium channels. *J Bioenerg Biomembr*. 1991; 23:615-646.

Garland CJ, and McPherson GA. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarisation and relaxation to acetylcholine in the rat small mesentery artery. *Br J Pharmacol*. 1992; 105: 429-435.

Garland CJ, Plane F. Relative importance of endothelium-driven hyperpolarizing factor for the relaxation of vascular smooth muscle in different arterial beds. In: Vanhoutte PM ed. Endothelium-derived hyperpolarizing factor, Amsterdam: Harwood Academic Publisher.; 1996; 173-179.

Garland CJ, Plane F, Kemp BK, Cocks TM. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16:23-30.

Gatta A, Sacerdoti D, Bolognesi M, Merkel C. Portal hypertension: state of the art. *Ital. J Gastroenterol Hepathol*. 1999; 31:326-445.

Ge T, Hughes H, Junquero D C, Wu KK, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H2 in the SHR aorta. *Circ Res* 1995; 76:1003-1010.

Geary GG, Buchholz JN. Selected contribution: effects of aging on cerebrovascular tone and [Ca²⁺]_i. *J Appl Physiol* 2003; 95:1746-1754.

Gebremedhin D, Ma YH, Falck JR, Roman RJ, VanRollins M, Harder DR. Mechanism of action of cerebral epoxyeicosatrienoic acids on cerebral arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 1992; 263:H519-H525.

Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 8010-4.

Gerhard M, Roddy MA, Creager SJ, Creager MA. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension* 1996; 27:849-853.

Gerassimou C, Kotanidou A, Zhou Z, Simoes DC, Roussos C, Papapetropoulos A. Regulation of the expression of soluble guanylyl cyclase by reactive oxygen species. *Br J Pharmacol.* 2007; 150:1084-91.

Ghisal P, Morel N. Cellular target of voltage and calcium-dependent K⁺ channel blockers involved in EDHF-mediated responses in rat superior mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 2001; 134:1021-1028.

Gluais P, Lonchamp M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Feletou M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: The Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol.* 2005; 146: 834-845.

Gluais P, Paysant J, Badier-Commander C, Verbeuren T, Vanhoutte PM, Feletou M. In SHR aorta, calcium ionophore A-23187 releases prostacyclin and thromboxane A₂ as endothelium-derived contracting factors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291:H2255-H2264.

Gluais P, Vanhoutte PM, Feletou M. Mechanisms underlying ATP-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta. *Eur J Pharmacol.* 2007; 556:107-114.

Goldberg GS, Moreno AP, Bechberger JF, Hearn SS, Shivers RR, MacPhee DJ, Zhang YC, Naus CC. Evidence that disruption of connexon particle arrangements in gap junction plaques is associated with inhibition of gap junctional communication by a glycyrrhetic acid derivative. *Exp Cell Res.* 1996; 222:48-53.

Goldblatt H, Linch J, Hanzal RF et Summerville WW. Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*, 1934; 59:347-379.

Goldfinger RTM. Beyond the french paradox: the impact of moderate beverage alcohol and wine consumption in the préventive of cardioavscualire disease. *Cardiol Clin*,2003; 21, 449-457.

Goligorsky MS, Li H, Brodsky S and Chen J. Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002; 283:F1-F10.

Gómez FP, Barberà JA, Roca J, Burgos F, Gistau C, Rodríguez-Roisin R. Effects of nebulized N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in patients with hepatopulmonary syndrome. [Hepatology](#) 2006;43:1084-1091

- Gorlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res*, 2000; 87:26-32.
- Goto K, Hama H, Kasuya Y. Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn J Pharmacol*. 1996; 72, 261-290.
- Goto K, Fujii K, Onaka U, Abe I, Fujishima M. Renin-angiotensin system blockade improves endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertension*. 2000;36:575- 580.
- Goto K, Fujii K, Kansui Y, Abe I, Iida M. Critical role of gap junctions in endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29:595-602.
- González Bosc LV, Kurnjek ML, Müller A, Terragno NA, Basso N. Effect of chronic angiotensin II inhibition on the nitric oxide synthase in the normal rat during aging. *J Hypertens*. 2001; 19:1403-9.
- Gresele P, Pignatelli P, Guglielmini G, Carnevale R, Mezzasoma AM, Ghiselli A, Momi S, Violi F. Resveratrol, at concentrations attainable with moderate wine consumption, stimulates human platelet nitric oxide production. *J Nutr*. 2008 ;138(9):1602-8.
- Griendling KK, Fitzgerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury . Part I : Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*, 2003a; 108 : 1912-1916.
- Griendling KK, Fitzgerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury . Part II : Animal and humans studies. *Circulation*, 2003b ; 108 :2034-2040.
- Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000a; 20 :2175-2183.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000b; 86:494-501.
- Griffith TM, Chaytor AT, Bakker LM, Edwards DH. 5-Methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin can modulate electronically mediated endothelium-dependent vascular relaxation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102 : 7008-7013.
- Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*, 1995; 57:707-736.
- Griffith TM, Chaytor AT, Edwards DH. The obligatory link: role of gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization. *Pharmacol Res* 2004; 49:551-564.
- Grgic I, Kaistha BP, Hoyer J, Köhler R. Endothelial Ca(2+)-activated K(+) channels in normal and impaired EDHF-dilator responses - relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *Br J Pharmacol*. 2009 Mar 19. [Epub ahead of print]

Grimsrud PA, Picklo Sr MJ, Griffin TJ, Bernlohr DA. Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. *Mol Cell Proteomics*. 2007; 6:624-637.

Grønbaek M, Becker U, Johansen D, Gottschau A, Schnohr P, Hein HO, Jensen G, Sørensen TI. Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer. *Ann Intern Med* 2000 ; 133 :411-419.

Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986; 320, 454-456.

Gusberg RJ, Peterec SM, Sumpio BE, Meier GH. Splenomegaly and variceal bleeding - hemodynamic basis and treatment implications. *Hepatogastroenterology*. 1994; 41, 573-577.

Gustafsson F, Mikkelsen HB, Arensbak B, Thunegerd L, Neve S, Jensen LJ, Holstein-Rathlou NH. Expression of connexin 37, 40 and 43 in rat mesenteric arteriolar and resistance arteries. *Histochem Cell Biol*, 2003 ; 119 : 139-148.

Gutterman DD. Adventitia-dependent influences on vascular function. *Am J Physiol*. 1999, 277:H1265-1272.

Gutterman DD, Miura H, Liu Y. Redox modulation of vascular tone. Focus of potassium channel mechanisms of dilatation. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol*, 2005; 25:671-678.

Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 2000; 86:E85-90.

H

Haidet GC, Wennberg PW, Rector TS. Aging and vasoreactivity: in vivo responses in the beagle hindlimb. *Am J Physiol*. 1995;268:H92-H99.

Halushka PV, Mais DE, Mayeux PR, Morinelli TA. Thromboxane, prostaglandin and leukotrien receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1989;29 :213-239.

Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension*, 2001;37:529-534

Hanes DS, Nahar A, Weir MR. The tissue renin-angiotensin-aldosterone system in diabetes mellitus. *Curr Hypertens Rep*, 2004 ;6 :98-105.

Hannukainen JC, Janatuinen T, Toikka JO, Jarvisalo MJ, Heinonen OJ, Kapanen J, et al. Myocardial and peripheral vascular functional adaptation to exercise training. *Scand J Med Sci Sports*, 2007;17:139-147.

Harlan JM, Levine JD, Callahan KS, Schwartz BR, Harker LA. Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellularly generated hydrogen peroxide. *J Clin Invest.* 1984;73:706-713.

Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxi Redox Signal* 2003 ; 5 :557-761.

Harris MB, Ju H, Venema VJ, Blackstone M, Venema RC. Role of heat shock protein 90 in bradykinin-stimulated endothelial nitric oxide release. *Gen Pharmacol.* 2000, 35, 165-170.

Hashimoto M, Kim S, Eto M, Iijima K, Ako J, Yoshizumi M, Akishita M, Kondo K, Itakura H, Hosoda K, Toba K, Ouchi Y. Effect of acute intake of red wine on flow-mediated vasodilatation of the brachial artery. *Am J Cardiol.* 2001; 88:1457-1460.

Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M. 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,* 1997; 17:2744-2752.

Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* 2000; 87:677-82.

Hecker M, Ullrich V. On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A2 biosynthesis. *J Biol Chem.* 1989; 264:141-150.

Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol.* 1994;481:407-414;

Hegarty VM, May HM, Khaw KT. Tea drinking and bone mineral density in older women. *Am J Clin Nutr.*, 2000; 71:1003-1007.

Heinecke JW. Mechanism of oxidative damage of low-density lipoprotein in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:268-74.

Heller J, Trebicka J, Shiozawa T, Schepke M, Neef M, Hennenberg M, Sauerbruch T. Vascular, hemodynamic and renal effects of low-dose losartan in rats with secondary biliary cirrhosis. *Liver Int.* 2005; 25:657-666.

Helmy A, Newby DE, Jalan R, Johnston NR, Hayes PC, Webb DJ. Nitric oxide mediates the reduced vasoconstrictor response to angiotensin II in patients with preascitic cirrhosis. *J Hepatol* 2003; 38:44-50.

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet,* 1993a; 342-:1007-11.

Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer,* 1993b; 20:21-29.

Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, et al.. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*, 1995; 155:381-386.

Hervé P, Leclerc D, Bredont, Simonneau G, Humbert M, Sitbon O, Duroux P. Pulmonary vascular disorders in portal hypertension. *Eur Respir J*. 1998 ; 11 : 1153-1166.

Heymes C, Habib A, Yang D, Mathieu E, Marotte F, Samuel JL, Boulanger CM. Cyclo-oxygenase-1 and -2 contribution to endothelial dysfunction in ageing. *Br J Pharmacol* 2000; 131, 804-810.

Higgs EA, Moncada S, Vane JR, Caen JP, Michel H, Tobelem G. Effect of prostacyclin (PGI₂) on platelet adhesion to rabbit arterial subendothelium. *Prostaglandins*. 1978, 16:17-22.

Hill CE, Rummery N, Hickey H, Sandow SL. Heterogeneity in the distribution of vascular gap junctions and connexins: implications for function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002; 29:620-625.

Hilgers RH and Webb RC. Reduced expression of SKCa and IKCa channel proteins in rat small mesenteric arteries during angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292:H2275-H2284.

Hobbs AJ, Fukuto JM, Ignarro LJ. Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:10992-10996.

Hodgson JM, Marshall JJ. Direct vasoconstriction and endothelium-dependent vasodilation. Mechanisms of acetylcholine effects on coronary flow and arterial diameter in patients with nonstenotic coronary arteries. *Circulation*. 1989;79:1043-1051.

Hoffman SW, Moore S, Ellis EF. Isoprostanes: free radical-generated prostaglandins with constrictor effects on cerebral arterioles. *Stroke*, 1997; 28: 844-849.

Hollenberg SM, Tong W, Shelhamer JH, Lawrence M, Cunnion RE. Eicosanoid production by human aortic endothelial cells in response to endothelin. *Am J Physiol*. 1994; 267, H2290-H2296.

Hollenberg NK, Price DA, Fisher ND, Lansang MC, Perkins B, Gordon MS, Williams GH, Laffel LM. Glomerular hemodynamics and the renin-angiotensin system in patients with type 1 diabetes mellitus. *Kidney Int*, 2003; 63:172-8.

Holowatz LA, Kenney WL. Local ascorbate administration augments NO- and non-NO-dependent reflex cutaneous vasodilation in hypertensive humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293:H1090-H1096.

Hongo K, Nakagomi T, Kassell NF, Sasaki T, Lehman M, Vollmer DG, Tsukahara T, Ogawa H, Torner J. Effects of aging and hypertension on endothelium-dependent vascular relaxation in rat carotid artery. *Stroke*. 1988; 19:892-897.

Hornych A, Forette F, Bariety J, Krief C, Aumont J, Paris M. The influence of age on renal prostaglandin synthesis in man. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 1991; 43: 191-195.

Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 1995;377:239-242.

Hutchison S. Smoking as a risk factor for endothelial dysfunction. *Can J Cardiol*, 1998; 14:20D-22D.

I

Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther*, 1988; 244:181-9.

Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto K, Kim S, Eto M, Ako J, Liang YQ, Sudoh N, Hosoda K, Nakahara K, Toba K, Ouchi Y. Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation*, 2000; 101, 805-11.

Isaacson TC, Hampl V, Weir EK, Nelson DP, Archer SL. Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol*, 1994; 76, 933-940.

Ito T, Kato T, Iwama Y, Muramatsu M, Shimizu K, Asano H, Okumura K, Hashimoto H, Satake T. Prostaglandin H₂ as an endothelium-derived contracting factor and its interaction with nitric oxide. *J Hypertens* 1991; 9:729-736.

Irvine JC, Ritchie RH, Favalaro JL, Andrews KL, Widdop RE, Kemp-Harper BK. Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29:601-608.

Irvine JC, Favalaro JL, Widdop RE, Kemp-Harper BK. Nitroxyl anion donor, Angeli's salt, does not develop tolerance in rat isolated aortae. *Hypertension*. 2007; 49:885-892.

Irvine JC, Favalaro JL, Kemp-Harper BK. NO⁻ activates soluble guanylate cyclase and Kv channels to vasodilate resistance arteries. *Hypertension*. 2003; 41:1301-1307.

Iwai M, Chen R, Li Z, Shiuchi T, Suzuki J, Ide A, Tsuda M, Okumura M, Min LJ, Mogi M, Horiuchi M. Deletion of Angiotensin II Type 2 Receptor Exaggerated Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Null Mice. *Circulation*, 2005; 112:1636-643.

Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver disease : from the patient to the molecule. *Hepatology* 2006;43:S121-S131.

Iyer SN, Averill DB, Chappell M., Yamada K, Allred AJ, Ferrario CM. Contribution of angiotensin-(1-7) to blood pressure regulation in salt-depleted hypertensive rats. *Hypertension*, 2000; 36, 417-422.

J

Jackson S. The epidemiology of aging. In: *Geriatric medicine and Gerontology*. Fourth Ed. Hazzard W, Blass J, Ettinger W, Halter J, Ouslander J, eds., New York. McGraw-Hill, 1998; 203-225.

Jain SK, Pemberton PW, Smith A, McMahon RF, Burrows PC, Aboutwerat A, Warnes TW. Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease. *J Hepatol* 2002; 36:805-811.

Janssen LJ, Premji M, Netherton S, Catalli A, Cox G, Keshavjee S, Crankshaw DJ. Excitatory and inhibitory actions of isoprostanes in human and canine airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000b; 295: 506-511.

Jermigan NL, Resta TC, Walker BR. Contribution of oxygen radicals to altered NO-dependent pulmonary vasodilation in acute and chronic hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2004a; 286, L947-L995.

Jin N, Parker CS, Rhoades RA. Reactive oxygen-mediated contraction in pulmonary arterial smooth muscle : cellular mechanisms. *Can J Physiol Pharmacol*, 1991; 69: 383-388.

Jin ZG, Ueba H, Tanimoto T, Lungu AO, Frame MD, Berk BC. Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res*, 2003; 93,354-63.

John S, Schmieder RE. Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and differences. *J Hypertens*, 2000; 18:363-374.

Johns A, Freay AD, Adams DJ, Lategan TW, Ryan US, Van Breemen C. Role of calcium in the activation of endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1988;12:S119 -S123.

Johnson DK, Schillinger KJ, Kwait DM, Hughes CV, McNamara EJ, Ishmael F, O'Donnell RW, Chang MM, Hogg MG, Dordick JS, Santhanam L, Ziegler LM, Holland JA. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. *Endothelium*. 2002;9:191-203.

Jung O, Schreiber JG, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation*, 2004; 109:1795- 1801.

K

Kagota S, Tada Y, Kubota Y, Nejime N, Yamaguchi Y, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Peroxynitrite is involved in the dysfunction of vasorelaxation in SHR/NDmcr-cp rats, spontaneously hypertensive obese rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 50:677-685.

Kähönen M, Tolvanen JP, Kalliovalkama J, Wu X, Karjala K, Mäkyänen H, Pörsti I. Losartan and enalapril therapies enhance vasodilatation in the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1999; 368:213-222.

Kalache A, Keller I. Population ageing in developing countries: demographic aspects. In: *Geriatric Medicine*, 2nd Ed. Evans J, Williams T, Beattie B, Michael J, Wilcock G. eds., New York, Oxford University Press. 2000; 26-32.

Kaul TN, Middleton E Jr, Ogra PL.. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J Med Virol* 1985; 15 :71-79.

Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL, Allaman M, Knapp HR, Haynes WG. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Circulation* 1999; 100:1161-1168.

Kane MO*, Etienne-Selloum N*, Dal-Ros S, Madeira SVF, Sarr M, Chataigneau T, Walter A, Schott C, Schini-Kerth V. EDCF(s) mediate the Ang II-induced endothelial dysfunction in the rat aorta: Preventive effect of red wine polyphenols. (soumis, 2009).

Kansui Y, Fujii K, Nakamura K, Goto K, Oniki H, Abe I, Shibata Y, Iida M. Angiotensin II receptor blockade corrects altered expression of gap junctions in vascular endothelial cells from hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H216-224.

Katsuki S, Arnold W, Mittal C and Murad F. 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.* 1977; 3:23-35.

Katusic and Vanhoutte. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factors. *Am J Physiol*, 1989; 257:H33-H37

Katusic ZS, Shepherd JT, Vanhoutte P.M. Endothelium-dependent contractions to calcium ionophore A23187, arachidonic acid, and acetylcholine in canine basilar arteries. *Stroke*, 1988; 19 : 476-479.

Katusic ZS. Mechanisms of endothelial dysfunction induced by aging: role of arginase I. *Circulation research* 2007; 101, 640-641.

Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004; 24:998-1005.

Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001; 41:851-876.

Kennedy TC, Knudson RJ. Exercise-aggravated hypoxemia and orthodexia in cirrhosis. *Chest*, 1977; 72:305-309.

Kim HP, Mani I, Iversen L, Ziboh VA. Effects of naturally-occurring flavonoids and bioflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipooxygenase from guinea-pigs. Prostaglandins Leukot Essent *Fatty Acids* 1998;58:17-24.

Kinsella K, Suzman R, Robine J, Myers G. Demography of older population in developed countries. In: *Geriatric Medicine*, 2nd ED. Evans J, Williams T, Beattie B, Michael J, Wilcock G, eds. New York, Oxford University Press. 2000; 9-19.

Kleschyov AL, Muller B, Keravis T, Stoeckel ME, Stoclet JC. Adventitia-derived nitric oxide in rat aortas exposed to endotoxin: cell origin and functional consequences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000b; 279:H2743-2751.

Kleschyov AL, Muller B, Schott C, Stoclet JC. Role of adventitial nitric oxide in vascular hyporeactivity induced by lipopolysaccharide in rat aorta. *Br J Pharmacol* 1998; 124:623-626

Klöss S, Bouloumié A, Mülsch A. Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. *Hypertension*. 2000 Jan;35(1 Pt 1):43-7.

Koga T, Takada Y, Kobayashi K, Takishita S, Yamashita Y, Fujishima M. Ageing suppresses endothelium-dependent relaxation and generates contraction mediated by the muscarinic receptors in vascular smooth muscle of normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 1988; 6:S243-S245.

Kohler R, Brakemeier S, Kuhn M, Behrens C, Real R, Degenhardt C, Orzechowski HD, Pries AR, Paul M, Hoyer J. Impaired hyperpolarization in regenerated endothelium after balloon catheter injury. *Circ. Res.* 2001; 89:174-179.

Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999; 43:562-571.

Kondo K, Matsumoto A, Kurata H, Tanahashi H, Koda H, Amachi T, Itakura H. Inhibition of oxidation of low-density lipoprotein with red wine. *Lancet*. 1994; 344:1152.

Komori K, Lorenz RR, Vanhoutte PM. Nitric oxide, ACh, and electrical and mechanical properties of canine arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1988; 255:H207-12.

Koshuhara J, Neichi T, Murato S, Lao A, Fujimoto Y, Tatsumo Y. Selective inhibition of 5-lipoxygenase by natural compounds isolated from Chinese plants. *Artemesia rubripes* Nakai. *FEBS Letters* 1983; 158, 41~14.

Kuhlencordt PJ, Rosel E, Gerszten RE, Morales-Ruiz M, Dombkowski D, Atkinson WJ, Han F, Preffer F, Rosenzweig A, Sessa WC, Gimbrone MA, JR, Eert G, Huang PL. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial activation: insights from eNOS knockout endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004; 286: C1195-202.

Kung CF, Luscher TF. Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension*, 1995; 25, 194-200.

Kusama N, Kajiguri J, Yamamoto T, Watanabe Y, Suzuki Y, Katsuya H, Itoh T. Reduced hyperpolarization in endothelial cells of rabbit aortic valve following chronic nitroglycerine administration. *Br. J. Pharmacol.*, 2005 ; 146 :487-497.

Krause KH. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis* 2004 ; 57 : 528-9.

Krowka MJ. Hepatopulmonary syndromes. *Gut*, 2000 ; 40:1-4.

Krowka MJ, Cortese DA. Pulmonary aspects of chronic liver disease and liver transplantation. *Mayo Clin Proc* 1985; 60:407-418.

L

Labinskyy N, Csiszar A, Veress G, Stef G, Pacher P, Oroszi G, Wu J, Ungvari Z. Vascular dysfunction in aging: potential effects of resveratrol, an anti-inflammatory phytoestrogen. *Current medicinal chemistry* 2006; 13, 989-996.

Lacy F, Kailasam MT, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW, Parmer RJ. Plasma hydrogen peroxide production in human essential hypertension: role of heredity, gender, and ethnicity. *Hypertension*, 2000;36:878-884.

Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation*. 2003a; 107:139-46.

Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation*. 2003b; 107:346-54.

Lamontagne D, Konig A, Bassenge E, Busse R. Prostacyclin and nitric oxide contribute to the vasodilator action of acetylcholine and bradykinin in the intact rabbit coronary bed. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992; 20:652-7.

Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:181-9.
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* 2002a; 40:511-515.

Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003; 111:1201-1209.

Landmesser U, Harrison DG. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron Artery Dis*, 2001; 12 : 455-461.

Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B and Drexler H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 2002b; 106:3073-3078.

Langcake P, Pryce RJ. *Physiol. Plant Pathol.*, 1976; 9, 1, 77-86.

Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003;285:R277-R297.

- Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JR, Halliway B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron-reducing ability. *Biochem Pharmacol*, 1991; 42:1673-81.
- 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;95:588-593.
- Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview : overview oh the renin-angiotensin systems- an endocrine and paracrine system. *Endocrinology*, 2003; 144: 2179-83.
- Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM and Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation*, 2002; 106:1614-1617.
- Leung PS, Chappell MC. A local pancreatic renin-angiotensin system : endocrine and exocrine roles. *Int J Biochem Cll Biol*, 2003; 35:838-46.
- Levy JV. Prostacyclin-induced contraction of isolated aortic strips from normal and spontaneously hypertensive rats (SHR). *Prostaglandins* 1980; 19, 517-520.
- Li H, Wallerath T, Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 2002a; 7:132-147.
- Li H, Wallerath T, Munzel T and Forstermann U. Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs. *Nitric Oxide* 2002b; 7:149-164.
- Li HF, Chen SA, Wu SN. Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca²⁺-activated K⁺ current in vascular endothelial cells. *Cardiovasc. Res*, 2000; 45: 1035-45
- Li JM and Shah AM. Endothelial cell superoxide generation : regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regulatory Intergrative Comp Physiol.*, 2004; 287, R1014-R1030.
- Lin H, Cai Y, Deng X, Cai Q, Zhou X. Role of endothelial-derived nitric oxide and its synthase in the development of hypoxic pulmonary hypertension in rat. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 1997;13:163-167.
- Lin KF, Chao L, Chao J. Prolonged reduction of high blood pressure with human nitric oxide synthase gene delivery. *Hypertension*. 1997;30:307-313.
- Linder L, Kiowski W, Buhler FR, Luscher TF. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. *Circulation*, 1990 ; 81, 1762-7.
- Ling Y, Zhang J, Luo B, Song D, Liu L, Tang L, Stockard CR, Grizzle WE, Ku DD, Fallon MB. The role of endothelin-1 and the endothelin B receptor in the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome in the rat. *Hepatology* 2004; 39:1593-1602.

Linseman DA, Benjamin CW, Jones DA. Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995;270:12563-8.

Liu Y, Bubolz AH, Shi Y, Newman PJ, Newman DK, Gutterman DD. Peroxynitrite reduces the endothelium derived hyperpolarizing factor component of coronary flow-mediated dilation in PECAM-1 knock-out mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005 ; 290:R57-R65.

Liu, Y., You, Y., Song, T., Wu, S. & Liu, L. 2007. Impairment of endothelium-dependent relaxation of rat aortas by homocysteine thiolactone and attenuation by captopril. *J Cardiovasc Pharmacol* 50, 155-161.

Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med*, 1996; 74 :297-312.

López-Sepúlveda R, Jiménez R, Romero M, Zarzuelo MJ, Sánchez M, Gómez-Guzmán M, Vargas F, O'Valle F, Zarzuelo A, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Wine polyphenols improve endothelial function in large vessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2008;51:1088-95.

Lou FQ, Zhang MF, Zhang XG, Liu JM, Yuan WL. A study on tea-pigment in prevention of atherosclerosis. *Chin Med J (Engl)*. 1989;102:579-83.

Loufrani L, Henrion D, Chansel D, Ardaillou R, Levy BI. Functional evidence for an angiotensin IV receptor in rat resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 291:583-588.

Luckhoff A, Pohl U, Mulsch A, Busse R. Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 1988;95:189-196.

Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986;315:1046-51.

Luo B, Abrams GA, Fallon MB : Endothelin-1: a potential endocrine mediator of intrapulmonary vasodilatation in a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Hepatology* 1997;26:A390.

Lüscher TF, Cooke JP, Houston DS, Nevers RJ, Vanhoutte P.M. Endothelium-dependent relaxations in human arteries. *Mayo Clin Proc*, 1987a; 62 : 601-606.

Lüscher TF, Raj L, Vanhoutte P.M. Endothelium-dependent responses in normotensive and hypertensive Dahl-rats. *Hypertension*, 1987b; 9 : 157-163.

Lüscher TF, Oemar BS, Yang Z, Noll G. Molecular and cellular mechanisms of arteriosclerosis and restenosis: possibilities of gene therapy. *Z Kardiol*. 1996;85:495-508.

Macarthur H, Westfall TC, Wilken GH. Oxidative stress attenuates No-induced modulation of sympathetic neurotransmission in the mesenteric arterial bed of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294, H183-H189.

Marchenko SM, Sage SO. Smooth muscle cells affect endothelial membrane potential in rat aorta. *Am J Physiol.* 1994;267:H804-H811.

Makita Z, Yanagisawa K, Kuwajima S, Bucala R, Vlassara H, Koike T. The role of advanced glycosylation end-products in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11:31-33.

Mantelli L, Amerini S, Ledda F. Bradykinin-induced vasodilation is changed to a vasoconstrictor response in vessels of aged normotensive and hypertensive rats. *Inflamm Res* 1995; 44, 70-73.

Maron DJ. Flavonoids for reduction of atherosclerotic risk. *Curr Atheroscler Rep.*, 2004; 6:73-8.
Marrelli SP, Eckmann MS, Hunte MS. Role of intermediate conductance Kca channels in cerebral EDHF-mediated dilations. *Am J Physiol.* 2003; 285:H1590-H1599.

Marsili S, Salganik RI, Albright CD, Freel CD, Johnsen S, Peiffer RL, Costello MJ. Cataract formation in a strain of rats selected for high oxidative stress. *Exp Eye Res* 2004; 79: 595-612.

Martin S, Andriambelason E, Takeda K, Andriantsitohaina R. Red wine polyphenol induced endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the PI3kinase /Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO synthase in the isolated porcine coronary artery. *Circulation*, 2003; 108:IV-101

Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1995; 35 : 235-255.

Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa Y, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290:909-13

Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 2000; 106:1521-30

Matz, R.L., de Sotomayor, M.A., Schott, C., Stoclet, J.C., and Andriantsitohaina, R. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. *British journal of pharmacology*, 2000; 131, 303-311.

Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G. Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet* 1994;344:193-194.

Mayhan WG, Faraci FM, Baumbach GL, Heistad DD. Effects of aging on responses of cerebral arterioles. *Am J Physiol*, 1990; 258, H1138-43.

Mazza G. Anthocyanins in grapes et grape products. *Crit Rev Food Sc Nutr.* 1995; 35:p :341-371.

- Meier B, Radeke HH, Selle S. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor- α . *Biochem J*, 1989;263:519-45.
- Merkel C, Gatta A, Arnaboldi L, Zuin R. Splenic haemodynamics and portal hypertension in patients with liver cirrhosis and spleen enlargement. *Clin Physiol*. 1985; 5, 531-539.
- Mezzano SA, Aros CA, Droguett A, Burgos ME, Ardiles LG, Flores CA, Carpio D, Vío CP, Ruiz-Ortega M, Egido J. Renal angiotensin II up-regulation and myofibroblast activation in human membranous nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2003a :539-45.
- Mezzano SA, Aros CA, Droguett A, Burgos ME, Ardiles LG, Flores CA, Carpio D, Vío CP, Ruiz-Ortega M, Egido J. Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2003b :564-70.
- Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 2000; 52:673-751.
- Miller Jr FJ, Gutterman 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.
- Miller VM, Vanhoutte PM. 1985. Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid is mediated by products of cyclooxygenase. *Am J Physiol* 1985; 248:H432- H437.
- Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999 ;263:681-684.
- Minuz P, Patrignani P, Gaino S, Degan M, Menapace L, Tommasoli R. Increased oxidative stress and platelet activation in patients with hypertension and renovascular disease. *Circulation*, 2002;106:2800-2805.
- Mistry DK, Garland CJ. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 1998;124:1131-40
- Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flowinduced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res*. 2003;92: e31-e40.
- Miwa S, Iwamuro Y, Zhang X, Inoki T, Okamoto Y, Okazawa M, Masaki T. Ca^{2+} entry channels in rat thoracic aortic smooth muscle cells activated by endothelin-1. *Jpn J Pharmacol*. 1999; 80, 281-288.
- Miyagawa K, Ohashi M, Yamashita S, Kojima M, Sato K, Ueda R. Increased oxidative stress impairs endothelial modulation of contractions in arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2007; 25, 415-421.
- Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev.*, 1990;70:921-61.

- Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. Effects of Angiotensin II on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide / cGMP signaling. *Circ Res*. 2002 ; 90 : e58-e65.
- Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction : from physiology to therapy. *J Moll Cell Cardiol*, 1999; 31, 61-74.
- Moncada S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci* 1997. 811, 60-67.
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976; 263:663-5
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991; 43:109-42.
- Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. *Pharmacol Rev*, 1979;30:293-331.
- Morgan PE, Sturgess AD, Davies MJ. Increased levels of serum protein oxidation and correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2069-2079.
- Morio Y, Homma N, Takahashi H, Yamamoto A, Nagaoka T, Sato K, et al. Activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor is augmented in monocrotaline-induced pulmonary hypertension of rat lungs. *J Vasc Res* 2007;44:325-35.
- Moritoki H, Hosoki E, Ishida Y. Age-related decrease in endothelium-dependent dilator response to histamine in rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol* 1986; 126, 61-67.
- Morikawa K, Shimokawa H, Matoba T, Kubota H, Akaike T, Talukder MA, Hatanaka M, Fujiki T, Maeda H, Takahashi S, Takeshita A. Pivotal role of Cu,Zn-superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. *J Clin Invest*. 2003;112:1871-1879.
- Morio Y, Homma N, Takahashi H, Yamamoto A, Nagaoka T, Sato K, Muramatsu M, Fukuchi Y. Activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor is augmented in monocrotaline-induced pulmonary hypertension of rat lungs. *J Vasc Res*, 2007;44:325-35.
- Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, Hoult JR. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharm Pharmacol*, 1988; 40:787-92.
- Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sc. U.S.A.* 1992; 89:10721 - 10725.
- Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*. 2007; 42, 271-9.

Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Heistad DD, Harrison DG. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 1991; 69:1293-1300.

Mukamal KJ, Maclure M, Muller JE, Sherwood JB, Mittleman MA. Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. *Circulation*. 2002; 105:2476-2481.

Muller-Delp JM, Spier SA, Ramsey MW, Delp MD. Aging impairs endothelium-dependent vasodilation in rat skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol, Heart Cir Physiol*, 2002; 283:1662-1672.

Mungrue IN, Husain M, Stewart DJ. The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. *Heart Fail Rev*. 2002;7:407-422.

Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mülsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2005; 25 :1551-1557.

Murata T, Sato K, Hori M, Ozaki H, Karaki H. Decreased endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) activity resulting from abnormal interaction between eNOS and its regulatory proteins in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *J Biol Chem*. 2002; 277, 44085-44092.

Murohana T, Yasue H, Ohgushi M, Sakaino N, Jougashaki M. Age related attenuation of the endothelium dependent relaxation to noradrenaline in isolated pig coronary arteries. *Cardiovasc Res*, 1991;25:1002-9.

Murtha YA, Allen BM, Orr JA. The role of protein kinase C in thromboxane A₂-induced pulmonary artery vasoconstriction . *J Biomed Sci*, 1999; 6, 293-5.

N

Nagao T, Vanhoutte PM. Hyperpolarisation as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *J Physiol*. 1992. 445, 355-367.

Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994, 78, 915-8.

Narumiya S, Sugimoto Y and Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*, 1999; 79, 1193-226.

Ndiaye M, Chataigneau T, Andriantsitohaina R, Stoclet JC and Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 310:371-377.

Ndiaye M, Chataigneau T, Chataigneau M and Schini-Kerth VB. 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*, 2004; 142:1131-1136.

Ndiaye M, Chataigneau M, Lobysheva I, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-

kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *FASEB J*. 2005;19:455-7.

Ndiaye M, Chataigneau T, Stoclet JC, Andriantsitohaina R, Schini-Kerth VB. Involvement of reactive oxygen species in EDHF-mediated relaxation induced by red wine polyphenols in the porcine coronary artery. *Circulation*, 2001 ; 104: II-32.

Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1995;268: C799-C822.

Nevala R, Seppo L, Tikkanen MJ, Laakso J, Vanhanen H, Vapaatalo H, Korpela R. Dietary fatty acid composition influences the degree of human LDL oxidation, but has only minor effects on vascular tone in a bioassay system. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2000;10:126-136.

Newby AC, Henderson AH. Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. *Annu Rev Physiol*. 1990;52:661-74.

Newby DE, Wright RA, Dawson P, Ludlam CA, Boon NA, Fox KA, Webb DJ. The L-arginine/nitric oxide pathway contributes to the acute release of tissue plasminogen activator in vivo in man. *Cardiovasc Res* 1998;38:485-492.

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 2001; 74:418-425.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi SI, Matsumura T, Kenneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787-90.

Nunes H, Leclerc D, Mazmanian M, Capron F, Heller J, Tazi KA, Zerbib E, Dulmet E, Moreau R, Dinh-Xuan AT, Simonneau G, Hervé P. Role of nitric oxide in hepatopulmonary syndrome in cirrhotic rats. *An J Crit Care Med*. 2001; 164 : 879-885.



Oak MH, El Bedoui J, Anglard P, Schini-Kerth VB. 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*, 2004; 110:1861-1867.

Oak MH, Chataigneau M, Keravis T, Chataigneau T, Beretz A, Andriantsitohaina R, Stoclet JC, Chang SJ, Schini-Kerth VB. 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*, 2003; 23:1001-1007.

Olmos L, Mombouli JV, Illiano S, Vanhoutte PM. cGMP mediates the desensitization to bradykinin in isolated canine coronary arteries. *Am J Physiol*. 1995;268:H865-70.

Onaka U, Fujii K, Abe I, and Fujishima M. Antihypertensive treatment improves endothelium-dependent hyperpolarization in the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 1998; 98:175-182.

Ohashi M, Satoh K, Itoh T. Acetylcholine-induced membrane potential changes in endothelial cells of rabbit aortic valve. *Br. J. Pharmacol.*, 1999 ; 126,19-26.

Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K, Yamashita T, Ishida T, Inoue N, Sakoda T, Kurihara H, Yazaki Y, Yokoyama M. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 1998;102:2061-2071.

Olshansky S. The demography of aging. In: *Geriatric Medicine, Third Ed.* Cassel C, Cohen H, Larson E, Meier DE, Resnick N, Rubenstein L, Sorenson L. eds, Berlin, Springer, 1997; 29-36.

Orallo F, Alvarez E, Camiña M, Leiro JM, Gómez E, Fernández P. The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol.* 2002;61:294-302.

Orijji GK. Endothelin-induced prostacyclin production in rat aortic endothelial cells: role of calcium. *Prostaglandins Leuk Essent Fatty Acids.* 1999; 61, 45-49.

Ortiz MC, Manriquez MC, Nath KA, Lager DJ, Romero JC, Juncos LA. Vitamin E prevents renal dysfunction induced by experimental chronic bile duct ligation. *Kidney Int* 2003;64:950-961.

Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Terao J, Kondo K. Catechins and their oligomers linked by C4 C8 bonds are major cacao polyphenols and protect low-density lipoprotein from oxidation in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2002; 227:51-56.

Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Legrand A, Beaudoux JL. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism* 2005;54:829-834.

P

Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta.* 1995;235:207-219.

Packham MA, Mustard JF. The role of platelets in the development and complications of atherosclerosis. *Semin Hematol.* 1986;23:8-26.

Paclet MH, Coleman AW, Vergnaud S, Morel F. P67-phox-mediated NADPH oxidase assembly: imaging of cytochrome b558 liposomes by atomic force microscopy. *Biochemistry* 2000;39 : 9302-9310.

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 USA.*, 1997; 94:14483-8.

Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:1372-1376.

Palma DT, Fallon BM. The hepato-pulmonary syndrome. *Journal of hepatology*. 2006, 617-625.

Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988a; 333 :664-666.

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-526.

Palmer RMJ, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 58, 348-352.

Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988b; 153, 1251-1256.

Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*, 1990; 323:22-27.

Paolucci N, Jackson MI, Lopez BE, Miranda K, Tocchetti CG, Wink DA, Hobbs AJ, Fukuto JM. The pharmacology of nitroxyl (HNO) and its therapeutic potential: not just the Janus face of NO. *Pharmacol Ther*. 2007; 113:442-458.

Papamichael CM, Aznaouridis KA, Stamatelopoulos KS, Karatzis EN, Protogerou AD, Papaioannou TG, Lekakis JP, Mavrikakis ME. Endothelial dysfunction and type of cigarette smoked: the impact of 'light' versus regular cigarette smoking. *Vasc Med*. 2004; 9:103-105.

Park JB, Touyz RM, Chen X, Schiffrin EL. 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*, 2002;15:78-84.

Park YK, Kim JS, Kang MH. Concord grape juice supplementation reduces blood pressure in Korean hypertensive men: double-blind, placebo controlled intervention trial. *Biofactors*. 2004; 22:145-7.

Pellegrini N, Pareti FI, Stabile F, Brusamolino A, Simonetti 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.

Peiro C, Redondo J, Rodriguez-Martinez MA, Angulo J, Marin J, Sanchez-Ferrer CF. Influence of endothelium on cultured vascular smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* 1995;25:748-51

Peng N, Clark JT, Prasain J, Kim H, White CR, Wyss JM. Antihypertensive and cognitive effects of grape polyphenols in estrogen-depleted, female, spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289:R771-R775.

Petersen DR, Doorn JA. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 937-945.

Peynet J, Beaudoux JL, Legrand A. Stress oxydant et athérosclérose. In: Delattre J, Beaudoux J-L, Bonnefont D, Rousselot, editors. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. *Tec Doc Lavoisier* Ed.; 2005.

R. Pezet, K. Gindro, O. Viret, J.-L. Spring. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew », *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2004, vol. 65.

Piech A, Dessy C, Havaux X, Feron O, Balligand JL. Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2003;57:456-67.

Pino RZ, Feelisch M. Bioassay discrimination between nitric oxide (NO.) and nitroxyl (NO-) using L-cysteine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;201:54-62.

Pinaud F, Bocquet A, Dumont O., Retailleau K, Baufreton C. Andicantsitokaina R, Loufrani L, Henrion D. Paradoxical role of angiotensin II type 2 receptors in resistance arteries of old rats. *Hypertension.* 2007;50: 96-102.

Prabha PS, Das UN, Koratkar R, Sagar PS, Ramesh G. Free radical generation, lipid peroxidation and essential fatty acids in uncontrolled essential hypertension. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1990;41:27-33.

Price DT, Vita JA, Keaney JF Jr. Redox control of vascular nitric oxide bioavailability. *Antioxid. Redox Signal.*, 2000; 919-935.

Prior HM, Webster N, Quinn K, Beech DJ, Yates MS. K(∅)-induced dilation of a small renal artery: no role for inward rectifier K∅ channels. *Cardiovasc Res.* 1998;37:780 -790.

Pufahl RA, Wishnok JS, Marletta MA. Hydrogen peroxide-supported oxidation of NG-hydroxy-L-arginine by nitric oxide synthase. *Biochemistry.* 1995;34:1930-1941.

Q

Quadt JF, Voss R, ten Hoor F. Prostacyclin production of the isolated pulsatingly perfused rat aorta. *J Pharmacol Methods.* 1982; 7:263-270.

Quignard JF, Féléto M, Edwards G, Duhault J, Weston AH, Vanhoutte PM. Role of endothelial cells hyperpolarization in EDHF-mediated responses in the guinea-pig carotid artery. *Br J Pharmacol.* 2000;129:1103-1112.

Quilley J, McGiff JC. Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 1:121-124.

Rabiller A, Nunes H, Lebrech D, et al. Prevention of Gramnegative translocation reduces the severity of hepatopulmonary syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 514-517.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148,1482-1489.

Rajagopalan S, Kurz S, Münzel 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;97:1916-1923.

Rapoport RM, Williams SP. Role of prostaglandins in acetylcholineinduced contraction of aorta from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension*. 1996, 28, 64-75.

Renaud SC, Gueguen R, Schenker J, d'Houtaud A. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology*, 1998;9:184-8.

Renauld S, De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 1992 ; 339, 1523-6.

Renaud S, Gueguen R. The French paradox and wine drinking. *Novartis Found Symp*, 1998 216:208-217.

Resta TC, Gonzales RJ, Dail WG, Sanders TC, Walker BR. Selective upregulation of arterial endothelial nitric oxide synthase in pulmonary hypertension. *Am J Physiol*. 1997;272:H806-H813.

Reudelhuber TL, Ramla D, Chiu L, Mercure C, Seidah NG. Proteolytic processing of human prorenin in renal and non-renal tissues. *Kidney Int*, 1994;46:1522-1524

Rey FE, Li XC, Carretero OA, Garvin JL and Pagano PJ. Perivascular superoxide anion contributes to impairment of endothelium-dependent relaxation: role of gp91(phox). *Circulation* 2002 ;106:2497-2502.

Rice-Evans C, Miller N. Measurement of the antioxidant status of dietary constituents, low density lipoproteins and plasma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1997;57:499-505.

Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer MJ. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: metaanalysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ*, 1999; 319:1523-8.

Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem pharmacol* 1988; 37:837-841;

Rodríguez-Roisin R, Krowka MJ, Hervé P, Fallon MB; ERS Task Force Pulmonary-Hepatic Vascular Disorders (PHD) Scientific Committee. Pulmonary-Hepatic vascular Disorders (PHD). *Eur Respir J*. 2004;24:861-880.

Rolla G, Brussino L, Colagrande P, Scappaticci E, Morello M, Bergerone S, Ottobrelli A, Cerutti E, Polizzi S, Bucca C. Exhaled nitric oxide and impaired oxygenation in cirrhotic patients before and after liver transplantation. *Ann Intern Med* 1998;129:375-378.

Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999;138:419-20.

Rubanyi GM, Frye RL, Holmes DR, Jr., Vanhoutte PM. Vasoconstrictor activity of coronary sinus plasma from patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1987; 9:1243-1249.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor(s). *Am J Physiol* 1986; 250, H822-H827.

Ruf JC. Wine and polyphenols related to platelet aggregation and atherothrombosis. *Drugs Exp Clin Res*, 1999;25, 125-31.

Rummery NM, Hill CE. Vascular gap junctions and implications for hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31:659-667.

Rummery NM, McKenzie KU, Whitworth JA, Hill CE. Decreased endothelial size and connexin expression in rat caudal arteries during hypertension. *J Hypertens* 2002;20:247-253.

Rusche KM, Spiering MM, Marletta MA. Reactions catalyzed by tetrahydrobiopterin-free nitric oxide synthase. *Biochemistry*. 1998;37:15503-15512.

Russo C, Olivieri O, Girelli D, Faccini G, Zenari ML, Lombardi S, Corrocher R. Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J Hypertens*, 1998;16:1267- 1271.

S

Sametz W, Hummer K, Butter M, Wintersteiger R, Juan H. Formation of 8-iso-PGF₂α and thromboxane A₂ by stimulation with several activators of phospholipase A₂ in the isolated human umbilical vein. *Br J Pharmacol*. 2000; 131: 145-151.

Sakai K, Sigmund CD. Molecular evidence of tissue renin-angiotensin systems : a focus on the brain. *Curr Hypertens Rep*, 2005;7:135-40.

Sagach V, Bondarenko A, Bazilyuk O, Kotsuruba A. Endothelial dysfunction: Possible mechanisms and ways of correction. *Exp Clin Cardiol*. 2006;11:107-10.

Sagar S, Kallo IJ, Kaul N, Ganguly NK, Sharma BK. Oxygen free radicals in essential hypertension. *Mol Cell Biochem*, 1992;111:103-108.

Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 1992; 13, 103-8

Saleem M, Ohshima H. Xanthine oxidase converts nitric oxide to nitroxyl that inactivates the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;315:455-462.

Sandow, Hill. The incidence of myoendothelial gap junction in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in EDHF-mediated responses. *Cir. Res*, 2000 ; 86, 341-346.

Sandow, Hill. Heterogeneity in the distribution of vascular gap junctions and connexins, implication for function. *Clinical and exp. Pharmacol and Physio*. 2002; 29:620-625.

Santhanam L, Lim HK, Lim HK, Miriel V, Brown T, Patel M, Balanson S, Ryoo S, Anderson M, Irani K, Khanday F, Di Costanzo L, Nyhan D, Hare JM, Christianson DW, Rivers R, Shoukas A, Berkowitz DE. Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction. *Circulation research* 2007;101, 692-702.

Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*, 2000; 45-62.

Santos A, Campagnole-Santos MJ, Baracho NC, Fontes MA, Silva LC, Neves LA, Oliveira DR, Caligiorne SM, Rodrigues AR et Gropen C. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull*. 1994; 35: 293-298.

Sarr M, Chataigneau M, Martins S, Schott C, El Bedoui J, Oak MH, Muller B, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res.*, 2006;71:794-802.

Sauzeau V., Rolii-Derkinderen M., Lehoux S., Loirand G., Pacaud P. Sildenafil prevents change in RhoA expression induced by chronic hypoxia in rat pulmonary artery. *Circ. Res.*, 2003; 93, 630-637.

Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, Smith MA. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1997; 68: 2092-2097.

Schenk P, Madl C, Rezaie-Majd S, Lehr S, Müller C. Methylene blue improves the hepatopulmonary syndrome. *Ann Intern Med* 2000; 33:701-706.

Schenk P, Fuhrmann V, Madl C, Funk G, Lehr S, Kandel O et al., Hepatopulmonary syndrome: prevalence and predictive value of various cut offs for arterial oxygenation and their clinical consequences. *Gut*. 2002 ; 51: 853-9.

Schiffrin EL, Touyz RM Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998; 32 Suppl 3, S2-13.

Schiffrin EL, Touyz RM. From bedside to bench to bedside: role of reninangiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 87:H435-446.

Schini-Kerth VB. 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* 1999a; 22:82-88.

- Schini-Kerth VB. Vascular biosynthesis of nitric oxide: effect on hemostasis and fibrinolysis. *Transfus Clin Biol* 1999b; 6:355-363.
- Schini VB, Boulanger C, Regoli D, Vanhoutte PM. Bradykinin stimulates the production of cyclic GMP via activation of B2 kinin receptors in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252:581-585.
- Schini VB, Busse R and Vanhoutte PM. Inducible nitric oxide synthase in vascular smooth muscle. *Arzneimittelforschung* 1994 ;44:432-435.
- Schini VB, Vanhoutte PM. Endothelin-1: a potent vasoactive peptide. *Pharmacol Toxicol*, 1991; 3-9.
- Schini VB, Vanhoutte PM. Role of the L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle. *Eur Heart J* 1993; 14, I:16-21
- Schmidt HH, Hofmann H, Schindler U, Shutenko ZS, Cunningham DD, Feelisch M. No .NO from NO synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 10;93(25):14492-7.
- Senault C, Betoulle D, Luc G, Hauw P, Rigaud D, Fumeron F. Beneficial effects of a moderate consumption of red wine on cellular cholesterol efflux in young men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2000; 10:63-69.
- Seppo L, Karjala K, Nevala R, Korpela R, Lähteenmäki T, Solatunturi E, Tikkanen MJ, Vapaatalo H. A long-term fish diet modifies the toxic properties of human partially oxidized LDL on vascular preparations in vitro. *J Physiol Pharmacol*. 2000; 51:251-265.
- Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr* 1998;128:1003-1007.
- Sharma RC, Hodis HN, Mack WJ. Probucol suppresses oxidant stress in hypertensive arteries. Immunohistochemical evidence. *Am J Hypertens*, 1996;9:577-590.
- Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* 2002; 64:749-74
- Sharpe MA, Cooper CE. Reactions of nitric oxide with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion and peroxynitrite. *Biochem J*. 1998;332:9-19.
- Shirahase H, Usui H, Kurahashi K, Fujiwara M, Fukui K. Endothelium-dependent contraction induced by nicotine in isolated canine basilar artery—Possible involvement of a thromboxane A2 (TXA2) like substance. *Life Sci* 1988;42:437-445.
- Shimizu S, Ishii M, Yamamoto T, Kawanishi T, Momose K, Kuroiwa Y. Bradykinin induces generation of reactive oxygen species in bovine aortic endothelial cell. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1994 ; 84:301-314.
- Shimizu I, Toda N. Alterations with age of the response to vasodilator agents in isolated mesenteric arteries of the beagle. *Br J Pharmacol*. 1986;89:769-778.
- Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, Takeshita A. The importance of the hyperpolarizing mechanism

increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1996 ; 28, 703-711.

Shimokawa H, Matoba T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol Res*, 2004; 49 : 543-549.

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.

Shirai M, Pearson JT, Shimouchi A, Nagaya N, Tsuschimochi H, Ninomiya I, Mori H. Changes in functional and histological distributions of nitric oxide synthase caused by chronic hypoxia in rat small pulmonary arteries. *Br. J. Pharmacol.*, 2003; 139, 899-910.

Shirasaki Y, Su C, Lee TJ, Kolm P, Cline Jr WH, Nickols GA. Endothelial modulation of vascular relaxation to nitrovasodilators in aging and hypertension. *J Pharmacol Exp Ther*, 1986; 239:861-6.

Shirotnani M, Yui Y, Hattori R, Kawai C. U-61,431F, a stable prostacyclin analogue, inhibits the proliferation of bovine vascular smooth muscle cells with little antiproliferative effect on endothelial cells. *Prostaglandins*. 1991, 41:97-110

Si H, Heyken WT, Wolfle SE, Tysiac M, Schubert R, Grgic I, Vilianovich L, Giebing G, Maier T, Gross V, Bader M, de Wit C, Hoyer J, Kohler R. Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Circ Res*, 2006;99:537-44.

Siems W, Quast S, Carluccio F, Wiswedel I, Hirsch D, Augustin W, Hampi H, Riehle M, Sommerburg O. Oxidative stress in chronic renal failure as a cardiovascular risk factor. *Clin Nephrol* 2002; 58: S12-S19.

Sim MK, Qui XS. Angiotensins in plasma of hypertensive rats and human. *Regul Pept* 2003; 111:179-182.

Singleton VL, Drapper DE. The transfer of phenolic compounds from grapes seeds into wine. *Am J Enol Vitic*. 1964, 15, 131-145.

Smit AJ, Lutgers HL. The clinical relevance of advanced glycation endproducts (AGE) and recent developments in pharmaceuticals to reduce AGE accumulation. *Curr Med Chem* 2004;11: 2767-2784.

Smith MA, Sayre LM, Anderson VE, Harris PL, Beal MF, Kowall N, Perry G. Cytochemical demonstration of oxidative damage in Alzheimer disease by immunochemical enhancement of the carbonyl reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 731-735.

Smyth EM, Fitzgerald GA. Human prostacyclin receptor. *Vitam Horm*. 2002, 65:149-165.

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal*. 1997; 11: 287-313.

Soares De Moura R, Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP, Rubenich LM, Carvalho LC, Oliveira RM, Tano T, Gusmão Correia ML. Antihypertensive, vasodilator and Antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J Pharm Pharmacol*, 2002;54:1515-1520.

Sozbach U, Hornig B, Jeserich M, Just H. Vitamin C improves endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in hypertensive patients. *Circulation* 1997; 189:1513-1519.

Soulat T, Philippe C, Bal dit Sollier C, Brézillon C, Berge N, Teissedre PL, Callebert J, Rabot S, Drouet L. Wine constituents inhibit thrombosis but not atherogenesis in C57BL/6 apolipoprotein E-deficient mice. *Br J Nutr*. 2006;96:290-298.

Sowa G, Liu J, Papapetropoulos A, Rex-Haffner M, Hughes TE, Sessa WC. Trafficking of endothelial nitric-oxide synthase in living cells. Quantitative evidence supporting the role of palmitoylation as a kinetic trapping mechanism limiting membrane diffusion. *J Biol Chem* 1999; 274:22524-31

Spier SA, Delp MD, Meininger CJ, Donato AJ, Ramsey MW, Muller-Delp JM. Effects of ageing and exercise training on endothelium-dependent vasodilatation and structure of rat skeletal muscle arterioles. *J Physiol*, 2004;556:947-58.

Stefani ED, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M, Carzoglio JC, Ronco A, Olivera L. Dietary antioxidants and lung cancer risk : a case-control study in Uruguay. *Nutr Cancer*, 1999; 34:100-10.

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;1:1017-1020.

Stupans I, Kirlich A, Tuck KL, Hayball PJ. Comparison of radical scavenging effect, inhibition of microsomal oxygen free radical generation, and serum lipoprotein oxidation of several natural antioxidants. *J Agric Food Chem*. 2002; 50:2464-2469.

Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997; 272: 20963-20966.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Thoo JG, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-924.

Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol*, 2004;500:299-313.

Stoclet JC, Kleschyov A, Andriambeloson E, Diebolt M, Andriantsitohaina R. Endothelial no release caused by red wine polyphenols. *J Physiol Pharmacol*, 1999;50,535-40.

Stojiljkovic MP, Lopes HF, Zhang D, Morrow JD, Goodfriend TL, Egan BM. Increasing plasma fatty acids elevates F2- isoprostanes in humans: implications for the cardiovascular risk factor cluster. *J Hypertens*, 2002;20:1215-1221.

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; 79:123-130.

Strain WD, Chaturvedi N. The renin-angiotensin-aldosterone system and the eye in diabetes. *J Renin Angiotensin Aldosterone syst*, 2002; 3: 243-6.

Strawn WB, Ferrario CM, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury. *Hypertension*, 1999;33:207-211.

Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Wiseman J. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem*, 1991; 266:6259-63.

Spier SA, Delp MD, Stallone JN, Dominguez II JM, Muller-Delp JM. Exercise training enhances flow-induced vasodilation in skeletal muscle resistance arteries of aged rats: role of PGI2 and nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 ; 292: H3119-H3127.

Subramanian R, MacLeod KM. Age-dependent changes in blood pressure and arterial reactivity in obese Zucker rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 477:143-152.

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.

Suzuki H, Chen G. EDHF : an endogenous potassium-channel activator. *News Physiol.Sci.* 1990 ; 5 : 212-15.

Suzuki YJ, Ford GD. Superoxide stimulates IP3-induced Ca²⁺ release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*, 1992; 262 : H114-116.

Swain T. The evolution of flavonoids. In *Progress in Clinical and Biological Research*. Vol. 213. Edited by V. Cody, E. Middleton, Jr and J. B. Harborne. pp. 1-14. Alan R. Liss, New York. 1986

Sztrymf B, Rabiller A, Nunes H, Savale L, Lebrec D, Le Pape A, de Montpreville V, Mazmanian M, Humbert M, Hervé P. Prevention of hepatopulmonary syndrome and hyperdynamic state by pentoxifylline in cirrhotic rats. *Eur Respir J* 2004;23:752-758.

T

Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Pasini AF, Garbin U, Cominacini L, Salvetti. Effect of calcium antagonist or beta blockade treatment on nitric oxide-dependent vasodilation and oxidative stress in essential hypertensive patients. *JHypertens* 2001; 19:1379-1386.

Taddei S, Viridis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation* 1995; 91: 1981-1987.

Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Bernini G, Magagna A, Salvetti A. 2001b. Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension* 2001b; 38, 274.

Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*, 1998; 97:2222-2229.

Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension*, 1997a; 29:274-279.

Taddei S, Viridis A, Mattei P, Ghiadoni L, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. Hypertension causes premature aging of endothelial function in humans. *Hypertension*, 1997b;29: 736-43.

Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Salvetti A. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Nephrol*, 2000; 13: 205-210.

Taddei S, Vanhoutte PM. Role of endothelium in endothelin-evoked contractions in the rat aorta. *Hypertension* 1993 ; 21 :9-15.

Takase H, Moreau P, Küng CF, Nava E, Lüscher TF. Antihypertensive therapy prevents endothelial dysfunction in chronic nitric oxide deficiency. Effect of verapamil and trandolapril. *Hypertension*. 1996;27:25-31.

Tanabe A, Naruse M, Naruse K, Ito F, Yoshimoto T, Seki T, Demura R, Demura H, Toma H, and Inagami T. Angiotensin II type 1 receptor expression in two cases of juxtaglomerular cell tumor: correlation to negative feedback of renin secretion by angiotensin II. *Horm Metab Res* 1999; 31:429-434.

Tang EH, Vanhoutte PM. Prostanoids and reactive oxygen species: Team players in endothelium-dependent contractions. *Pharmacol Ther*. 2009 Mar 12

Tanriverdi H, Evrengul H, Tanriverdi S, Turgut S, Akdag B, Kaftan HA, et al. Improved endothelium dependent vasodilation in endurance athletes and its relation with ACE I/D polymorphism. *Circ J*, 2005;69: 1105-10.

Tanito M, Nakamura H, Kwon YW, Teratani A, Masutani H, Shioji K, Kishimoto C, Ohira A, Horie R, Yodoi J. Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal*, 2004;6:89-97.

Taylor MS, Bonev AD, Gross TP, Eckman DM, Brayder JE, Bond CT, Adelman JP, Nelson MT. Altered expression of small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (SK3) channels modulated arterial tone and blood pressure. *Circ Res*, 2003; 93:124-131

Taylor HJ, Chaytor AT, Evans WH, Griffith TM. Inhibition of the gap junctional component of endothelium-dependent relaxations in rabbit iliac artery by 18 α -glycyrrhetic acid. *Br J Pharmacol*. 1998;125:1-3.

Tesseidre PL, *Biofutur*, 2008.

Thengchaisri N, Hein TW, Wang W, Xu X, Li Z, Fossum TW, Kuo L. Upregulation of arginase by H₂O₂ impairs endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006 ;9:2035-2042.

Thomas WG, Mendelsohn FA. Angiotensin receptors: form and function and distribution. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003;35: 774-779.

Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Silva Vaz MF, Silveira TR, Marroni CA, et al. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food Chem Toxicol* 2007;45:1140-1146.

Tigerstedt R, Bergman PG. Niere und Kreilauf. *Skand Arch Physiol*, 1898; 8:223-271.

Tojo A, Onozato ML, Kobayashi N, Goto A, Matsuoka H, Fujita T. Angiotensin II and oxidative stress in Dahl salt-sensitive rat with heart failure. *Hypertension*, 2002;40:834-839.

Tomera JF. Current knowledge of the death benefits and disadvantages of wine consumption. *Trends in Foods Science and Technology*, 1999; 10:129-138.

Torzewski M, Klouche M, Hock J, Messner M, Dorweiler B, Torzewski J, Gabbert HE, Bhakdi S. Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:369-378.

Touyz RM. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 2000;2:98-105.

Touyz RM. Recent advances in intracellular signalling in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2003a;12:165-174.

Tschudi MR, Mesaros S, Lüscher TF, Malinski T. Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension* 1996; 27: 32-35.

Tschudi MR, Barton M, Bersinger NA, Moreau P, Cosentino F, Noll G, Malinski T, Lüscher TF. Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *J Clin Invest*. 1996; 98:899-905.

Tsuneyama K, Harada K, Kono N, Sasaki M, Saito T, Gershwin ME, Ikemoto M, Arai H, Nakanuma Y. Damaged interlobular bile ducts in primary biliary cirrhosis show reduced expression of glutathione-S-transferasepi and aberrant expression of 4-hydroxynonenal. *J Hepatol* 2002; 37: 176-183.

Tunstall-Pedoe H, Vanuzzo D, Hobbs M, Mahonen M, Cepaitis Z, Kuulasmaa K, Keil U. Estimation of contribution of changes in coronary care to improving survival, event rates, and coronary heart disease mortality across the WHO MONICA Project populations. *Lancet*, 2000; 355:688-700.

U

Ubeda M, Matzilevich MM, Atucha NM, García-Estañ J, Quesada T, Tang SS, et al. Renin and angiotensinogen mRNA expression in the kidneys of rats subjected to long-term bile duct ligation. *Hepatology* 1994;19:1431-1436.

Ungvari Z and Koller A. Endothelin and prostaglandin H₂/tromboxane A₂ enhance myogenic constriction in hypertension by increasing Ca²⁺ sensitivity of arteriolar smooth muscle. *Hypertension*, 2000; 36, 856-61.

Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest.* 1997; 100:2793-9.

V

Vasquez-Vivar J, Duquaine D, Whitsett J, Kalyanaraman B, Rajagopalan S. Altered tetrahydrobiopterin metabolism in atherosclerosis: implications for use of oxidized tetrahydrobiopterin analogues and thiol antioxidants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002;22:1655-1661.

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P and Pritchard KA, Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998; 95:9220-9225.

Vanhoutte PM. Role of the endothelium in control of vascular smooth muscle function. *Verh K Acad Geneesk Belg* 1982; 44:411-418.

Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*, 1989, 13, 658-67.

Vanhoutte PM. Hypercholesterolaemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxing factor by aggregating platelets. *Eur Heart J*, 1991. 12 Suppl E, 25-32.

Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Hypertension* 1996 ; 14 : 583-93.

Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J.* 1997; 18:E19-E29.

Vanhoutte PM. Endothelium-derived free radicals : for worse and for better. *J Clin Invest*, 2001; 107, 23-25.

Vanhoutte PM. Ageing and endothelial dysfunction. *Eur Heart J.* 2002; 4:A8-A17.

Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res*, 1995; 18:87-98.

Vanhoutte PM, Féletou M. Conclusion : existence of multiple EDHF(s)? In : *Vanhoutte PM, ed, Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*, pp. 303-307. Amsterdam : Harwood Academic Publishers, 1996.

Vanhoutte PM, Félétou M, Taddei S. Endothelium-dependant contractions in hypertension. *Br J Pharmacol.*, 2005; 144 : 449-458.

Vanhoutte PM et Katusic ZS. Endothelium-derived contracting factor: endothelin and/or superoxide anion? *Trends Pharmacol Sci*, 1988; 9:229-30.

Vanhoutte PM, Rimele TJ. Role of the endothelium in the control of vascular smooth muscle function. *J Physiol (Paris)* 1982; 78:681-686.

Venema VJ, Marrero MB, Venema RC. Bradykinin-stimulated protein tyrosine phosphorylation promotes endothelial nitric oxide synthase translocation to the cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 226: 703-710.

Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. The ageing endothelium, cardiovascular risk and disease in man. *Exp Physiol.* 2009; 94:317-321.

Vettukattil JJ. Pathogenesis of pulmonary arteriovenous malformations: role of hepatopulmonary interactions. *Heart.* 2002; 88:561-563.

Vidal F, Colomé C, Martínez-González J, Badimon L. Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur J Biochem.* 1998; 252:378-384.

Viridis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens*, 2004; 22:535-542.

Viridis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, Schiffrin EL. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension*, 2002;40:504-510.

W

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.

Waldron GJ, Ding H, Lovren F, Kubes P, Triggle CR. Acetylcholine-induced relaxation of peripheral arteries isolated from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*, 1999 ; 128 : 653-658.

Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K and Forstermann U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 2002; 106:1652-1658.

Wallerath T, Poleo D, Li H and Forstermann U. 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*, 2003;41:471-478.

Walter A, Etienne-Selloum N, Sarr M, Kane MO, Beretz A, Schini-Kerth VB. Angiotensin II induces the vascular expression of VEGF and MMP-2 in vivo: preventive effect of red wine polyphenols. *J Vasc Res*, 2008;45:386-394.

Wang HK, Xia Y, Yang ZY, Natschke SL, Lee KH. Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-VIH agents. *Adv Exp Med Biol*, 1998; 439:191-225.

Wang ZW, Nara M, Wang YX, Kotlikoff MI. Redox regulation of large conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in smooth muscle cells. *J Gen Physiol*. 1997;110:35- 44.

Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer*. 1999; 35:1517-1525.

Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Böhm M, Meinertz T, Münzel T. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation*, 1999; 99, 2027-2033.

Welch WJ, Mendonca M, Aslam S, Wilcox CS. Roles of oxidative stress and AT1 receptors in renal hemodynamics and oxygenation in the postclipped 2 K,1C kidney. *Hypertension*, 2003;41:692-696.

Weston AH, Rihards GR, Burham MP, Félétou M, Vanhoutte PM, Edwards G. K⁺-induced hyperpolarization in the rat mesenteric artery: identification, localization and role of Na⁺/K⁺-ATPases. *Br J Pharmacol*. 2002; 136:918-26.

Wever RM, van Dam T, van Rijn HJ, de Groot F and Rabelink TJ. Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997; 237:340-344.

White DG, Martin W. Differential control and calcium-dependence of production of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin by pig aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 1989, 97:683-90

Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, Hale A. Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clin Chem*. 1995, 41, 32-35.

Wientjes FB, Segal AW, Hartwig JH. Immunoelectron microscopy shows a clustered distribution of NADPH oxidase components in the human neutrophil plasma membrane. *J Leukoc Biol* 1997 ; 61 : 303-12.

Wilcox CS. Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. *Curr Hypert Rep*, 2002;4:160-166.

Williams SP, Dorn GW, Rapoport RM. Prostaglandin I₂ mediates contraction and relaxation of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* . 1994; 267: H796-H803.

Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J*. 1987; 245:243-250.

Wollny T, Aiello L, Di Tommaso D, Bellavia V, Rotilio D, Donati MB, de Gaetano G and Iacoviello L. Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production. *Br J Pharmacol*, 1999; 127:747-755.

Wu KK. Endothelial prostaglandin and nitric oxide synthesis in atherogenesis and thrombosis. *J Formos Med Assoc*. 1996, 95:661-6

Wu R, Millette E, Wu L, de Champlain J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens*, 2001, 19:741-748.

X

Xia Y, Tsai AL, Berka V and Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem*, 1998; 273:25804-25808.

Y

Yamamoto Y, Imaeda K, Suzuki H. Endothelium-dependent hyperpolarization and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles. *J Physiol*. 1999;514:505-513.

Yamamoto Y, Fukuta H, Nakahira Y, Suzuki H. Blockade by 18α -glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles. *J Physiol*. 1998;511:501-518.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Mitsui Y, Kobayashi M, Watanabe TX, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1988 ; 332: 411-418.

Yanagisawa M, Masaki T. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci*, 1989; 10:374-8.

Yang YY, Lin HC, Huang YT, Lee TY, Hou MC, Lee FY, et al. Effect of 1-week losartan administration on bile duct-ligated cirrhotic rats with portal hypertension. *J Hepatol* 2002;36:600-606.

Yang D, Feletou M, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM. A Diffusible Substance(s) Mediates Endothelium- Dependent Contractions in the Aorta of SHR. *Hypertension*, 2003; 41: 143-148.

Yang D, Feletou M, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM. Endothelium dependent contractions to acetylcholine, ATP and the calcium ionophore A 23187 in aortas from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2004a; 18:321-326.

Yasue H, Matsuyama K, Matsuyama K, Okumura K, Morikami Y, Ogawa H. Responses of angiographically normal human coronary arteries to intracoronary injection of acetylcholine by age and segment. Possible role of early coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1990;81:482-490.

Yasuro I, Tomohiro O, Takaatsu K, Yoshihisa M, Kiyohiko S, Ken O. Nitric oxide-dependent vasodilator mechanism is not impaired by hypertension but is diminished with aging in the rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33:756-761.

Yeh HI, Chang HM, Lu WW, Lee YN, Ko YS, Severs NJ, Tsai CH. Age-related alteration of gap junction distribution and connexin expression in rat aortic endothelium. *J Histochem Cytochem*. 2000; 48:1377-1389.

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, 823-828.

Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2696-2701.

Yoshimoto T, Furukawa M, Yamamoto S, Horie T, Watanabe-Kohno S. Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983; 116:612-8.

Z

Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Etayo JC, Diez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 2000;35:1055-1061.

Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J. Oxidative stress in arterial hypertension : role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension*, 2001a; 38:1395-1399.

Zaman MA, Oparil S et Calhoun DA. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov*, 2002; 1: 621-636.

Zarkovic N. 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med*. 2003; 24: 281-291.

Zeiber AM, Drexler H, Saubier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest*. 1993; 92:652-662.

Zenebe W, Pechanova O. Effects of red wine polyphenolic compounds on the cardiovascular system. *Bratisl Lek Listy*, 2002; 103:159-165.

Zenebe W, Pechanova O, Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity. *Physiol Res*, 2003; 52, 452-32.

Zhang J, Ling Y, Luo B, Tang L, Ryter SW, Stockard CR, Grizzle WE, Fallon MB. Analysis of pulmonary heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase alterations in experimental hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology*. 2003; 125 : 1441-1451.

Zhao X, Gu Z, Attele AS, Yuan CS. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. *J Ethnopharmacol*. 1999; 67:279-285.

Zhao G, Adebisi A, Blaskova E, Xi Q, Jaggar JH. Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors mediate UTP-induced cation currents, Ca^{2+} signals, and vasoconstriction in cerebral arteries. *Am J Phys Cell Phys*. 2008; 295: C1376-1394.

Zijp IM, Korver O, Tijburg LB. Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2000; 40:371-398.

Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P et Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 11968-11973.

Zou MH, Cohen RA, Ullrich V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium*, 2004; 11 : 89-97.

Zygmunt PM, Ryman T, Hogestatt ED. Regional differences in endothelium dependent relaxation in the rat: contribution of nitric oxide and nitric oxide-independent mechanisms. *Acta Physiol Scand* 1995;155:257-266.

Valorisation des compétences des docteurs

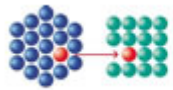
« Un nouveau chapitre de la thèse® »

Au cours de ma troisième année de thèse, j'ai pu grâce à l'Ecole Doctorale de la Vie et de la Santé et à l'Association Bernard Grégory (ABG), réaliser un bilan des compétences. L'ensemble de ce travail de réflexion s'est basé sur la période des quatre années passées (DEA et les 3 premières années de thèse) au sein du laboratoire d'accueil, c'est pourquoi je souhaitais que ce bilan fasse partie intégrante de ma thèse.

Il s'agit réellement d'une analyse profonde de toutes les compétences acquises grâce au doctorat, indépendamment du contenu scientifique.

Ce travail a été réalisé durant ma troisième année de thèse, expliquant les quelques divergences avec la situation actuelle dans le travail scientifique, la poursuite de carrière...

Le mémoire a été soutenu et évalué par un comité, présidé par Mr Bernard Jund et Mme Danielle Haug (directrice du Service d'Information, Orientation et Emploi, représentante de l'ABG) le 20 Juin 2008, un an jour pour jour avant ma soutenance de thèse. Mr Jund a été mon mentor tout au long de cette expérience, je lui renouvelle mes remerciements pour son aide, ses conseils et son soutien.

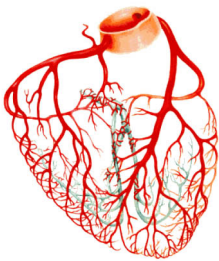


Association Bernard Gregory
De la thèse à l'emploi

Valorisation des compétences des docteurs

« Un nouveau chapitre de la thèse ® »

M^{me} Stéphanie ROS-DAL



Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Université Louis Pasteur de Strasbourg

Mentor : Mr Bernard Jund



« Le vaisseau sanguin au cœur des maladies cardiovasculaires : zoom sur les polyphénols végétaux, un remède contre ces maladies et le vieillissement ? »



Soutenance du « NCT » : 20 juin 2008



Sujet académique de la thèse : « Etude de la fonction endothéliale dans les maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle, le syndrome hépatopulmonaire et le vieillissement : zoom sur le facteur vasorelaxant EDHF. »

Directeur de thèse : Dr Christian BRONNER

Date probable de soutenance de la thèse : printemps 2009

Cadre général, enjeux et présentation de mon projet de recherche

" Il a l'âge de ses artères "... Cette expression qui signifiait la vieillesse a pris un autre sens. On peut être vieux avant l'âge lorsqu'on est affecté d'une **maladie cardiovasculaire**. Ces maladies, comme leur nom l'indique, atteignent le cœur et les vaisseaux sanguins, c'est-à-dire tout le système cardiovasculaire.

Si la France bénéficie d'une position relativement avantageuse en matière de mortalité cardiovasculaire, caractérisée par une baisse des taux de décès d'environ 25% entre 1981 et 1991 pour la tranche d'âge de 35 à 64 ans, les maladies cardiovasculaires demeurent un problème important de santé publique (*source : Programme national de réduction des risques Cardiovasculaires, 2002-2005, Ministère délégué à la Santé*). Elles sont de loin la 1^{ère} cause de décès chez les femmes (93 571, soit 36%) et la 2nde, derrière les cancers chez les hommes (29% contre 32%). Chez les plus de 65 ans, elles représentent la 3^{ème} cause de mortalité prématurée derrière les cancers et les morts accidentelles et violentes (16 et 12% chez les hommes et les femmes respectivement)(*source : La recherche cardio-vasculaire en France, GRRC*).

Au niveau international, les maladies cardiovasculaires constituent là encore la 1^{ère} cause de mortalité. Elles sont responsables chaque année du décès de plus de 17 millions de personnes, soit 30% de la mortalité dans le Monde (*source : Sanofi-Aventis*). L'étude MONICA, placée sous l'égide de l'OMS, a permis de confirmer la baisse de mortalité coronaire dans le Monde au cours des années 80 mais si la mortalité diminue, le nombre de maladies continue de progresser. Aujourd'hui le vieillissement est devenu un sujet de préoccupation, plus d'une personne sur 10 est âgée de 65 ans et plus, chez qui, environ 70% des décès proviennent de maladies cardiaques, d'AVC et de cancers.

L'ensemble de ces pathologies (hypertension artérielle, diabète, athérosclérose...) sont au centre de la recherche effectuée au laboratoire où je réalise ma thèse : « mieux comprendre la fonction endothéliale », c'est-à-dire mieux comprendre les contractions-relaxations des artères « malades ».

Mon projet de recherche

Mes travaux menés durant mon DEA et ma thèse, ont porté sur l'étude de cette fonction endothéliale dans différentes pathologies cardiovasculaires, à l'aide de plusieurs modèles animaux. **L'hypertension artérielle, l'athérosclérose** (collaboration avec l'équipe de Mr Drouet, Hôpital de Lariboisière, Paris), **la cirrhose biliaire et le syndrome hépatopulmonaire, le diabète de type I** (collaboration avec le Ceed, Hautepierre) ainsi que des études sur **le vieillissement** des rats, ont permis de mettre en évidence une dysfonction endothéliale, caractérisée par une altération des relaxations des artères, notamment dû à la diminution des facteurs vasorelaxants NO et surtout EDHF (facteur vasorelaxant peu connu). Ainsi l'ensemble de ces pathologies serait caractérisé par « **une maladie de l'endothélium** ». Nous avons également pu observer que lorsque le corps ne parvient pas à éliminer suffisamment les radicaux libres excédentaires, on parle alors de stress oxydatif. Les antioxydants naturels, à savoir les vitamines C (fruits rouges, épinard, poivron), E (huiles végétales, ex : l'huile de germe de blé, de tournesol, de soja, d'arachide ou d'olive) et le β -carotène (certains fruits et végétaux : poivron, carotte, épinard, laitue, tomate, patate douce, brocoli, courge, abricot) sont considérés être des remèdes contre le stress oxydant. **Les polyphénols végétaux** (vin rouge, thé vert, jus de raisin), de part leur propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-plaquettaires, offrent de grands espoirs. En effet, ils ont déjà démontré leur effet anti-hypertenseur dans des études réalisées au sein du laboratoire, et de nombreuses études épidémiologiques portant sur la consommation de vin et de la mortalité cardio-vasculaire ont montré qu'une consommation **modérée** de vin (de l'ordre de 1 à 3 verres par jour) conduisait à une réduction de cette mortalité de l'ordre de 30 à 50% par rapport aux non consommateurs. Une meilleure connaissance des mécanismes du vieillissement permettrait d'envisager des stratégies susceptibles d'en prévenir les complications (hypertension artérielle, diabète, athérosclérose...).

Ainsi, mon travail a été de mettre en place les différents modèles animaux de pathologies cardiovasculaires, d'en étudier la fonction endothéliale et de déterminer si les polyphénols du vin rouges étaient capables de retarder ou d'améliorer cette maladie de l'endothélium.

Place de ma thèse dans le laboratoire

L'équipe « Pharmacologie et Physiopathologie Cardiovasculaires », sous la responsabilité du Pr. V.B Schini-Kerth s'intègre dans l'UMR 7175 CNRS/ULP et a pour objectif d'améliorer les connaissances concernant les vaisseaux sanguins et la pompe cardiaque dans les

conditions physiologiques (vasomotricité normale) et physiopathologiques (lésions athéroscléreuses, dysfonctions endothéliales, phénomènes inflammatoires), afin d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes du fonctionnement de l'endothélium vasculaire.

L'équipe s'attache en particulier à identifier les effets vasculoprotecteurs et anti-angiogéniques des polyphénols végétaux. L'ensemble de ma thèse aura permis dans un premier temps de mieux comprendre la relation « endothélium et maladies cardiovasculaires » mais aussi de montrer que les polyphénols végétaux sont effectivement un bon « remède » à ces pathologies.

Réseau scientifique dans le cadre de ma thèse

De nombreuses collaborations sont réalisées au sein de notre laboratoire, notamment avec des industriels et des partenaires hospitaliers. Ainsi, nous avons travaillé avec le laboratoire du Pr Drouet à Lariboisière à Paris pour l'étude « athérosclérose chez le porc », avec le Centre Européen d'Etude du Diabète (Dr Sigrist, Ceed, Haute-pierre, Strasbourg) pour le projet diabète, une collaboration avec l'industrie pharmaceutique SERVIER a été développée pour l'étude du fractionnement des polyphénols et l'isolement d'un produit actif, nous testons des jus de fruits de chez GRANINI ainsi que ceux de WELSH (US) afin d'en déterminer les effets biologiques, *ex vivo* et *in vitro*. Enfin, nous collaborons avec le Dr Gény à l'Hôpital civil de Strasbourg pour une étude clinique afin de déterminer les effets d'une prise quotidienne de jus de raisin chez l'Homme.

Concurrence

Dû au problème de Santé publique que représentent les pathologies cardiovasculaires, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) ainsi que de nombreuses équipes de recherche au niveau mondial travaillent afin de mieux comprendre ces pathologies.

Les composés polyphénoliques quant à eux n'ont pris leur essor dans la pharmacopée occidentale que depuis quelques années, même si leur biodisponibilité n'est pas encore complètement élucidée. Aujourd'hui, de nombreuses études sont réalisées et révèlent les effets bénéfiques des polyphénols sur l'organisme. Des chercheurs américains ont publié une étude sur l'effet bénéfique des pommes sur l'état général de l'organisme. Au Pays-Bas, une équipe souligne les effets bénéfiques sur la dilatation des vaisseaux des polyphénols. De nombreuses équipes s'intéressent aux effets du resvératrol (un des composés les plus actifs des polyphénols).

Pourquoi faire une thèse ?

Pour moi, le doctorat a toujours été ce que je souhaitais faire. Tout au long de mon cursus à la faculté des Sciences de la Vie de Strasbourg où j'ai obtenue un DEUG de Biologie, une Licence de Biochimie et une maîtrise de Physiologie générale, mention Neurosciences, j'ai pu réaliser des stages en laboratoire qui ont conforté mon envie de faire une carrière dans la recherche. Certains de ces stages plus moléculaires m'ont permis de me dire que je n'étais pas faite pour les tubes à essais transparents tous identiques ... mais qu'il me fallait bien quelque chose de plus concret : des animaux. J'ai eu la chance en fin de licence de pouvoir réaliser un stage de 3 mois et demi dans un laboratoire de Neurosciences, avec un projet dont j'étais vraiment responsable, me mettant dans l'obligation de gérer mon temps, d'organiser les expériences et m'occuper des animaux... tout en étant bien entendu encadrée. C'est vraiment ce stage qui m'a décidé à continuer dans cette voie. Un des stages obligatoires de maîtrise m'a permis de découvrir le laboratoire dans lequel j'allais par après réaliser mon DEA de pharmacologie et mon Doctorat.

Déroulement, gestion et coût de mon projet de recherche

Préparation et cadrage du projet de recherche

Mon projet de thèse en fait a été dans la continuité de celui de mon DEA où j'ai travaillé sur l'une des pathologies cardiovasculaires : l'hypertension artérielle. Les connaissances du laboratoire sur le modèle animal ainsi que sur les techniques d'étude de la fonction endothéliale m'ont permis d'apprendre et de commencer très rapidement mon étude. La première phase de chacune de mes études a été de réaliser la bibliographie du sujet, de déterminer ce qui a déjà été fait, déjà publié, d'en exploiter les failles et de mettre au point le protocole. Pour cette première partie de mon projet une difficulté financière a été vite un frein à son aboutissement. J'ai réalisé une belle étude *in vivo* et *ex vivo*, en cours de soumission, mais malheureusement ou heureusement pour moi, je n'ai pu aller vraiment en profondeur dans la détermination des voies plus moléculaires et cellulaires impliquées. Il reste en effet des zones d'ombre, mais j'ai du me réorienter, élargir ma thématique de recherche, chercher de nouveaux axes d'étude. C'est ainsi que je me suis mise sur les traces des autres pathologies cardiovasculaires, mis en place grâce à des collaborations avec plusieurs autres personnes de laboratoires différents. Des manipulations préliminaires avec de petits groupes d'animaux, en

mutualisant les expériences et l'utilisation de l'animal dans sa totalité ont permis d'une part de maîtriser les risques d'échecs mais aussi d'avancer grâce aux techniques et modèles animaux d'autres laboratoires, que j'ai donc pu apprendre et maintenant emporter avec moi ailleurs (modèle d'induction du diabète de type I et le syndrome hépatopulmonaire). Le fait de développer des collaborations a effectivement permis d'avancer sur plusieurs études en même temps, de pouvoir approfondir les connaissances sur des versants différents mais complémentaires. Mais il est vrai que sans argent on ne fait rien, c'est mon expérience qui me le fait dire, et qu'il a fallu se replonger dans les demandes de financement, j'ai ainsi pu contribuer à l'écriture de ces rapports et à les défendre devant un auditoire (j'ai notamment pu me trouver un salaire, en décrochant une bourse de valorisation de la Région Alsace pour mes deux dernières années de thèse). Une fois tous ces soucis d'orientation, de collaboration et de financements derrière moi, j'ai pu vraiment commencer mon travail de thèse actuel. Mais il faut savoir que cela m'a fait perdre un an !

Conduite du projet de recherche

Comme je l'ai précisé avant, les projets commencent par les études bibliographiques, des tests préliminaires avec pour ma part de faibles (mais suffisants) groupes d'animaux pour valider nos modèles animaux ainsi que de déterminer la tendance des traitements pour réorienter ou non le passage à des groupes plus importants. Pour ces premières phases, notre équipe se réunit toutes les deux semaines sous forme soit de *journal club* pour parler de deux publications importantes qui viennent de sortir, soit sous forme d'exposés des derniers résultats d'une personne de l'équipe. Au sein de l'UMR 7175 (les 3 équipes réunies dont la notre), nous avons aussi une fois par mois des réunions avec une personne de chaque équipe présentant leurs résultats sujets à discussion. Les points sur l'avancement du projet se font un peu tous les jours en discutant avec mon encadrante puis une fois qu'une grosse partie est terminée on fait un point pour discuter des résultats, continuer ou réorienter ... Gérer un projet demande aussi d'avoir un peu de recul ce qu'à la personne qui m'encadre le plus. Tout au long des différentes études, il faut aussi pouvoir gérer les relations avec les partenaires scientifiques, socio-économiques, industriels. Mon projet de recherche m'a effectivement demandé de rendre des comptes aux personnes extérieures, de planifier et gérer des manip avec d'autres, et par la suite de discuter des résultats et de préparer les publications. En revanche, pour tous les contacts industriels c'est la directrice de notre équipe le Pr. Valérie Schini-Kerth qui les gère.

Voici les grandes étapes de mon projet de thèse :

Année 1 : Poursuite de l'étude sur **l'hypertension artérielle**, *ex vivo* et *in vitro* réalisé en DEA : identification des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la dysfonction endothéliale observée chez les rats hypertendus *in vivo*. Cette première année a permis d'approfondir les résultats obtenus lors de mon DEA, sur la première pathologie, l'hypertension artérielle. Durant les 6 premiers mois de cette année 1, une analyse de différents facteurs pouvant expliquer la dysfonction endothéliale observée chez les animaux hypertendus ont été mis en évidence, j'ai écrit et soumis une publication à différents journaux scientifiques tels que le *Journal of Hypertension* et l'*American Journal of Physiology*. Une soumission à un autre journal est en cours de discussion à l'heure actuelle, puisque le projet ayant été arrêté pour des causes financières, je ne peux réaliser les manips complémentaires que l'on me demande maintenant. Mais l'ensemble de ce travail sur l'hypertension artérielle a tout de même fait l'objet de communications orales et affichées à de nombreux congrès nationaux et internationaux (Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, Société Française de Pharmacologie, French Meeting on NO Research, Symposium on Mechanisms of Vasodilatation and EDHF en Belgique). Les 6 mois suivants, j'ai essayé de monter un modèle cellulaire de ce type hypertension (induite par l'angiotensine II), mais en vain. Ainsi le côté approches moléculaires et cellulaires a été aussi abandonné. Par contre, durant cette période j'ai tout de même pu développer de nouvelles techniques d'immunomarquages (localisation et quantification des protéines), de western-blot (quantification des protéines) et de RT-PCR (quantification de l'ADN) appliquées à mes types de vaisseaux (applicables à mes autres manips *ex vivo* réalisées par la suite). Tout n'est donc pas perdu !

Année 2 : L'arrivée pour un an à mi-temps d'une praticienne de l'hôpital civil, m'a permis de mettre en place une nouvelle étude, réorientant ainsi le sujet de ma thèse, qui ne serait plus uniquement l'étude de la fonction endothéliale dans l'hypertension artérielle mais plutôt un élargissement de celui-ci. Désormais j'ai choisi de baser ma thèse sur plusieurs pathologies cardiovasculaires, me permettant de travailler effectivement sur différentes maladies, d'apprendre de nouveaux modèles animaux. Ainsi, j'ai mis en place au laboratoire un autre modèle de pathologie : **la fonction endothéliale dans un modèle animal de syndrome hépatopulmonaire associé à une cirrhose biliaire chez le rat**. C'est cette année là qui a marqué le tournant et vraiment le départ de ma thèse. L'ensemble de ce travail s'est échelonné sur la deuxième et début de ma troisième année, 3 publications (dont 2 en premier auteur) sont

actuellement en écriture. Après avoir présenté ces résultats par communication affichée aux Journées Campus d'Illkirch en avril 2008, je vais les exposer oralement cette fois-ci au congrès international « 5th International EDHF Symposium. Endothelium, Vasoactive Factors and Inflammation » à Tampere en Finlande à la fin du mois de juin 2008. Ce congrès mettra le point final à ce projet.

Année 3 : Depuis décembre 2007 un nouveau projet a été mis en place, l'étude de **la fonction endothéliale chez l'animal vieux, et les polyphénols végétaux (vin rouge) en tant que remède du vieillissement ?** Cette étude étant longue (7 mois de traitement chronique, changement des biberons de rats tous les deux jours, suivis des poids, tests d'efforts physiques), cela m'a permis de gérer une autre étude simultanément portant sur **la fonction endothéliale dans un modèle de diabète de type I chez le rat.** Ainsi durant cette 3^{ème} année, j'ai pu étudier 2 autres pathologies simultanément, ainsi j'ai pu mutualiser mon temps lors des analyses plus moléculaires et cellulaires (fait en même temps pour les 2 pathologies). Les derniers mois de cette dernière année de thèse (sauf si j'obtiens une nouvelle bourse pour une 4^{ème} année de thèse) seront réservés à l'écriture des derniers articles et de ma thèse.

Evaluation et prise en charge du coût du projet

Tout projet a un coût ! L'ensemble de ma thèse a demandé l'investissement de personnel, pour ma part à 100% de mon temps, ma directrice de l'équipe à 10%, mon directeur de thèse à 10%, pendant trois ans. L'aide d'un maître de conférence pendant la première année à 20%, d'une assistante ingénieur à 20% durant 2 ans et de différents stagiaires (master, stages d'été) l'ensemble évalué à 100% pendant 1 an, une secrétaire à 1%, un animalier à 1%, un informaticien pendant 3 ans. Soit des **ressources humaines de 209000 euros** pour les trois ans.

A côté des frais de personnels s'ajoutent bien entendu **les frais de fonctionnement** pour faire les manip (culture cellulaire, animaux, traitements chroniques, réactifs pour les manip d'organe isolés et de microélectrodes, réactifs pour les manip moléculaires et cellulaires, anticorps et location des matériels techniques pour réaliser les marquages immunohistochimiques, dosages sanguins...et de papeterie) s'ajoutant au frais **d'infrastructure**, soit un total de **77 400 euros** pour les trois ans.

Comme je l'ai dit précédemment, j'ai pu exposer mes résultats lors de congrès nationaux et internationaux. Mon projet étant réalisé avec des collaborations, j'ai du aussi assister à des réunions le plus souvent à Paris. Ceci engendrant **des frais de déplacement de 3000 euros** pour mes trois ans de thèse

Soit **un coût total de 289400 euros pour mon projet de thèse**

Identification, hiérarchisation et illustration des diverses compétences mise en œuvre durant ma thèse

Compétences scientifiques et techniques

J'ai pu, grâce à mon projet de thèse, apprendre et maîtriser des techniques différentes dans les domaines **d'expertise scientifiques et techniques**.

Notamment pour **les modèles *in vivo/ex vivo* de pathologies cardiovasculaires** réalisées par des chirurgies chez le rat : ligature de la voie biliaire commune et mise en place d'une mini pompe osmotique dans la région scapulaire médiane ; j'ai pu aussi mesurer la pression artérielle et fréquence cardiaque par pléthysmographie (brassard à la queue), suivre les traitements chroniques chez les rats, et par la suite réaliser les dissections de différents organes (aorte, artère mésentérique...).

J'ai pu développé une grande expertise pour **l'étude de la réactivité vasculaire** c'est-à-dire la mesure de la contraction et relaxation des artères en chambre à organes isolés (artère fémorale et coronaire de porc, aorte de rat, artère mésentérique de rat).

Durant les 6 derniers mois de la première année de ma thèse j'ai pu développer des nouvelles techniques de **biologie moléculaire et cellulaire** adaptées à mes protocoles et mes petites artères: RT-PCR, Western-blot, immunohistochimie, microscopie à épifluorescence et confocal, ELISA. J'ai aussi appris à faire des **cultures cellulaires** en isolant les **cellules endothéliales** d'artères coronaires de porcs et de cordons ombilicaux humains.

Sans oublier les **outils informatiques** pointus orientés vers l'analyse, l'exploitation la présentation de mes résultats, notamment Uvessels pour la réactivité vasculaire et Laser Sharp 200 pour la visualisation par microscopie confocal.

J'ai eu la chance de pouvoir passer le **diplôme d'expérimentation animale de niveau I** dans le cadre des formations (proposées par notre école doctorale) suivies pour valider des UVs pour ma thèse.

Compétences « humaines »

Outre des compétences acquises dans les domaines techniques, ma thèse avec les rebondissements, les changements d'axe d'études et d'encadrant, m'a vraiment permis de mettre en évidence et de développer des compétences « humaines ».

En effet, pour des raisons d'organisation interne au laboratoire, le suivi a été assez distant mais cela m'a permis d'apprendre à **gérer mon projet** de manière **autonome et indépendante (gérer mon temps, organiser mes manips)**. Du fait que mon projet soit multicentrique (études de plusieurs pathologies simultanément), dans une même journée j'ai dû « jongler » entre les différents protocoles et différents traitements *in vivo*, autant dire que **l'organisation, la planification, la rigueur et la gestion des priorités** étaient les mots d'ordre ! **Gérer l'inconnue et l'incertitude** pour la continuation de ma thèse notamment en fin de première année, mais aussi dans certains protocoles ; **prendre des décisions** en fonction de ses **convictions, résister au stress** face aux manques de moyens et savoir réorienter mes axes de recherches ont nourri mon emploi du temps pendant ces trois dernières années.

J'ai aussi su, de part l'ampleur du projet, **déléguer** une partie de mon travail, envoyer des dosages à faire par des laboratoires plus spécialisés par exemple. Mais déléguer à des stagiaires (formés avant, bien entendu !), tout en sachant que leur formation a demandé de la rigueur, du suivi et du temps, a engendré **une prise de risque** lorsque j'ai décidé de leur confier des expériences, notamment lorsqu'on travaille avec les animaux ! Il faut être à l'écoute, prendre du recul.

Le fait d'avoir pu participer à des congrès nationaux et internationaux, aux réunions de laboratoires et de réaliser des vacances en travaux pratiques de pharmacologie à la faculté de

pharmacie, m'a permis de développer **un esprit de synthèse et un esprit critique** sur mon travail, de **communiquer** (à des spécialistes et non spécialistes) mais aussi de m'informer sur un environnement scientifique plus large.

Certaines de ces compétences m'ont servi dans ma vie plus personnelle (ou bien est-ce cette vie personnelle qui m'a aidé dans ma vie professionnelle ?) pour **la gestion d'un groupe** de danse d'enfants. **La patience, l'adaptabilité** et la transmission du savoir sont les trois mots clé de la « réussite ». Mon implication dans l'Association des Doctorants et Docteurs d'Alsace (l'Addal) en tant que vice-présidente (un an) et présidente de commission Com&Média m'a aussi appris beaucoup, notamment à **défendre des droits, des projets**, et à **gérer de l'argent** (j'en suis la trésorière aussi cette année) et **communiquer**.

Ainsi l'ensemble de ces compétences acquises dans ma vie professionnelle et personnelle m'a permis aujourd'hui de savoir gérer un groupe et un projet.

Résultats et impacts de ma thèse

Sur le plan scientifique, ma thèse a permis de mettre en évidence un lien entre les différentes pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle, l'athérosclérose, le syndrome hépatopulmonaire et le vieillissement, soit la présence d'une « **maladie de l'endothélium** » caractérisée par une perte des relaxations des vaisseaux. Ainsi une meilleure connaissance des mécanismes du vieillissement notamment, permettra d'envisager des stratégies susceptibles d'en prévenir les conséquences (hypertension artérielle, diabète, athérosclérose ...). J'ai pu aussi montrer que **les polyphénols végétaux** tels que ceux du vin rouge **sont capables d'améliorer et d'empêcher** cette « maladie de l'endothélium ». Ces résultats permettent de proposer de nouvelles associations de mesures hygiéno-diététiques et de traitements appropriés, de contribuer à réduire la morbidité et la mortalité attenantes aux maladies cardiovasculaires et ainsi d'en réduire les coûts inhérents à leur prise en charge.

Grâce à l'ensemble des compétences acquises durant mon doctorat, aux collaborations réalisées et à mon implication dans l'Association des Doctorants et Docteurs d'Alsace (Addal), j'ai pu établir des contacts et ainsi émettre des pistes pour ma poursuite de carrière. **Une start-up émergente** *Phytodia* m'intéresse très fortement. *Phytodia* identifie et

développe des actifs végétaux à la haute valeur ajoutée pour la prise en charge nutraceutique des maladies métaboliques. La plate forme technologique de *Phytodia* combine une grande expérience en pharmacognosie avec une gamme unique des tests moléculaires, cellulaires *in vitro* et surtout de modèles *in vivo*, pour l'objectivation rapide des extraits et la validation pharmacologique des principes actifs. Cette start-up serait une bonne continuité de mon travail de recherche. Je pourrais ainsi leur apporter mon expertise dans les modèles animaux, les techniques particulières d'analyses que j'ai pu mettre en place durant mon doctorat. Je pourrais aussi leur apporter mon expertise en polyphénols végétaux en tant que traitement des pathologies cardiovasculaires. *Phytodia* me permettra aussi de découvrir le monde de la recherche privée, l'organisation des petites entreprises... mais aussi dans un premier temps de continuer à être « à la paillasse », de faire des manipulations. Car en effet dans un premier temps en tout cas, je souhaiterais pouvoir continuer à travailler avec les animaux, tout en évoluant dans cette entreprise. Puis à plus long terme, je souhaiterais pouvoir gérer moi aussi mon équipe, mon projet, devenir chef de projet soit dans une start-up soit dans une industrie pharmaceutique.

Mon second projet mettrait à profit une collaboration réalisée durant mon doctorat. J'ai déjà un premier contact avec deux personnes au sein de l'hôpital civil de Strasbourg pour y découvrir peut être **le côté plus clinique** et donc **plus appliqué de la recherche**. Comme précédemment mon expertise dans différents modèles de pathologies cardiovasculaires ainsi que ma capacité à gérer un projet de façon autonome et indépendante pourrait être en ma faveur pour intégrer cette équipe aux vues de leurs axes d'études et de leur fonctionnement interne. **Un poste d'AHU** (assistant hospitalo-universitaire) me serait accessible. Ce poste mêlerait recherche et enseignement, puisque ce type de poste implique une charge d'enseignement en travaux pratiques et dirigés en première année de médecine. Outre ce côté partage de connaissances et apprentissage qui me tien à cœur, le type de recherche y serait mixte, chez l'animal et chez l'Homme. C'est ce côté nouveau, plus clinique et plus appliqué qui m'intéresse. Pour ce second projet, ça serait plutôt le côté universitaire comme poursuite de carrière qui serait envisagé. Les postes de maître de conférence, de chargé de recherche... sont accessibles sur concours.

Mon dernier projet, complètement différent mais qui me tiens réellement à cœur, serait de pouvoir appliquer mes compétences au sein de la police scientifique. Je nourris depuis très longtemps une motivation profonde de la recherche de la vérité, une recherche très appliquée.

C'est aussi l'une des raisons qui m'a poussé à faire une thèse, et à passer le concours national avec mon doctorat en poche, me permettant ainsi d'accéder directement au grade d'expert et non de technicien scientifique. Les experts sont un peu comme des chefs de projet en recherche et développement des industries puisqu'ils gèrent aussi un projet (leur enquête) avec toute une équipe et avec des moyens de plus en plus performants à leurs dispositions. Mettre mes compétences scientifiques et autres au service de la police afin de pouvoir résoudre les affaires.

Voici, les trois pistes de poursuites de carrières que je vais envisager très rapidement, sachant que l'un n'empêche par l'autre. Affaire à suivre !

Remerciements

Merci à mon directeur de thèse Dr Christian Bronner pour son aide, son écoute, son encadrement pendant ces quatre années de thèse. Merci à la directrice de l'équipe « Pharmacologie et Physiopathologie cardiovasculaires » le Pr. Valérie B. Schini-Kerth pour m'avoir permis de réaliser ma thèse et soutenue ces cinq dernières années.

Merci à l'Association Bernard Grégory d'avoir sélectionné ma candidature et m'avoir permis de réaliser ce nouveau chapitre de ma thèse qui intégrera mon mémoire très rapidement. Et un grand merci à mon mentor Mr Bernard Jund pour m'avoir suivi, orienté, conseillé...