

Université de Montréal

**Conséquences d'une restriction de croissance intra-utérine  
sur la réactivité aortique chez le rat en fonction de l'âge et  
du sexe biologique**

par

Yasmine Ennehas

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)  
en Physiologie moléculaire, cellulaire et intégrative

Décembre, 2013

© Yasmine Ennehas, 2013

Université de Montréal

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Conséquences d'une restriction de croissance intra-utérine sur la réactivité aortique chez  
le rat en fonction de l'âge et du sexe biologique**

Présenté par :  
Yasmine Ennehas

Évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jonathan Ledoux : Président-rapporteur

Dr Michèle Brochu : Directeur de recherche

Dr Éric Thorin : Membre du jury

## Résumé

**Antécédents.** Le tonus vasculaire est régulé par plusieurs mécanismes et réagit à plusieurs composés endogènes et exogènes, dont les hormones circulantes et les substances vasoactives libérées par l'endothélium. Plusieurs études ont démontré que les femmes pré-ménopausées seraient moins à risque d'avoir des maladies cardiovasculaires que les hommes et que cette protection serait due aux hormones stéroïdiennes œstrogéniques. De plus, des études démontrent que les artères gagnent en rigidité avec l'âge différemment selon le sexe et que la restriction de croissance intra-utérine (RCIU) prédispose au développement de maladies cardiovasculaires à l'âge adulte différemment chez les hommes et chez les femmes. On a cherché à savoir si la réactivité vasculaire aortique dépend du sexe biologique, de l'âge et de l'environnement intra-utérin et si la rigidité aortique est différente entre les mâles et les femelles. **Méthode.** Des anneaux d'aorte thoracique de rats mâles ou femelles, témoins ou RCIU, de 5, 12 et 20 semaines avec endothélium ont été montés dans des bains à organe isolé. La contraction à des doses croissantes de phényléphrine (Phe) avec ou sans L-Name ainsi que la relaxation à des doses croissantes de carbachol (Cbc) ou de nitroprussiate de sodium (SNP) ont été enregistrées afin d'évaluer la réactivité vasculaire de l'aorte et de comparer les différents groupes. Des anneaux d'aorte thoracique de rats mâles et femelles âgés entre 13 et 17 semaines ont été utilisés pour évaluer la rigidité artérielle. **Résultats.** Chez les rats mâles seulement, la contraction maximale à la Phe en absence et en présence du L-Name est augmentée à 20 semaines chez les témoins et à 12 et 20 semaines chez les RCIU. Chez les femelles, la contraction maximale n'est pas affectée par l'âge et la RCIU. Par contre, un effet du L-Name est observé à l'âge adulte, autant chez les femelles témoins que RCIU. L'effet du L-Name est plus prononcé chez les femelles que chez les mâles. Dans tous les groupes RCIU, la relaxation maximale au Cbc est réduite. Par contre, aucune différence entre les différents groupes n'est observée avec le SNP et aucune différence de rigidité n'est observée entre les mâles et les femelles. **Conclusion.** Les résultats au L-Name suggèrent un rôle plus important du NO chez les femelles et les résultats à la Phe suggèrent que les mâles sont plus réactifs aux stimuli vasoconstricteurs avec l'âge et que ceci est encore plus prononcé lorsque

l'environnement intra-utérin a été défavorable. La différence de contraction maximale entre les mâles et les femelles n'est pas due à la rigidité artérielle.

**Mots-clés:** tonus vasculaire, hormones, sexe biologique, âge, endothélium, rigidité, restriction de croissance intra-utérine, contraction, relaxation, monoxyde d'azote, rat.

## Abstract

**Background.** Vascular tone is regulated by several mechanisms and several exogenous and endogenous stimuli such as circulating hormones and the vasoactive compounds released by the endothelium. Many studies have shown that pre-menopausal women are less likely to develop cardiovascular diseases and that this is due to the protective effects of estrogenic hormones on the cardiovascular system. In addition, some studies have shown that the stiffening of arteries that is associated with aging is different in men and women and that intrauterine growth restriction (IUGR) predisposes to the development of cardiovascular disease in adulthood differently in men and women. We wanted to investigate whether aortic vascular reactivity depends on sex, age and intrauterine environment and whether aortic stiffness is different between males and females. **Methods.** Thoracic aortic rings from 5-, 12- and 20-week old male and female control and IUGR rats with intact endothelium were mounted in isolated organ baths. The contraction to increasing doses of phenylephrine (PE) with or without L-NAME and the dilatation to increasing doses of carbachol (Cbc) or sodium nitroprusside (SNP) were recorded in order to evaluate the vascular reactivity of the aorta and to compare the different groups. Thoracic aortic rings from male and female rats aged between 13 and 17 weeks were used to assess arterial stiffness. **Results.** In male rats only, maximal contraction to PE in absence or presence of L-Name increased at the age of 20 weeks in controls and at the age of 12 and 20 weeks in IUGR. In females, maximal contraction in the absence of L-Name was not affected by age or IUGR. However, maximal contraction to PE in the presence of L-Name increased after puberty. The effect of L-Name was stronger in females. Maximal relaxation in response to Cbc was reduced in IUGR groups. However, no difference was observed with SNP and no difference in stiffness was observed between males and females. **Conclusion.** L-Name experiments suggest that NO has a more important role in females and PE results suggest that males are more responsive to vasoconstrictor stimuli while growing up and this is even more pronounced when they are growth restricted. The difference in maximal contraction between males and females is not due to a difference in arterial stiffness.

**Keywords:** vascular tone, hormones, sex, age, endothelium, stiffness, intrauterine growth restriction, contraction, dilation, nitric oxide, rat.

# Table des matières

Page de présentation du mémoire.....	i
Page de présentation du jury .....	ii
Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures .....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xi
<u>I. INTRODUCTION</u> .....	1
1. STRUCTURE D'UN VAISSEAU.....	2
2. RÉGULATION DU TONUS VASCULAIRE.....	3
2.1. Potentiel membranaire.....	4
2.2 Les facteurs endothéliaux relaxants.....	5
2.3. La dysfonction endothéliale.....	6
2.4. Les hormones sexuelles.....	7
2.5. Contraction du muscle lisse vasculaire.....	7
2.6 : Relaxation du muscle lisse vasculaire.....	10
3. CHANGEMENTS VASCULAIRES, RIGIDITÉ ARTÉRIELLE ET L'ÂGE.....	12
4. DIFFÉRENCES AU NIVEAU CARDIOVASCULAIRE ENTRE LES SEXES.....	13
4.1. Tonus vasculaire.....	13
4.2 Rigidité artérielle.....	14
5. LA RESTRICTION DE CROISSANCE INTRA-UTÉRINE.....	15
5.1.Facteurs maternels pouvant mener à une RCIU.....	17
5.1.1 La cigarette et l'alcool.....	16
5.1.2 Maladies cardiovasculaires et immunitaires.....	17
5.2. Modèles animaux de la RCIU.....	17
5.2.1. L'hypoxie.....	17
5.2.2. Diète faible en protéines (LPD).....	18

5.2.3 Ligature bilatérale des artères utérines .....	18
5.2.4. Le modèle animal de la diète faible en sodium .....	18
5.3 Théorie de la programmation fœtale .....	19
5.3.1. Le rôle du sexe dans la programmation fœtale.....	20
5.4. Conséquences de la RCIU .....	20
5.4.1 Anatomie et réactivité vasculaire .....	20
5.4.2 La dysfonction endothéliale.....	21
6. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	24
<u>II.ARTICLE</u> .....	25
<u>III.EXPÉRIENCE SUPPLÉMENTAIRE</u> .....	42
1. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	43
2. FIGURE .....	44
3. RÉSULTATS.....	45
<u>IV.DISCUSSION</u> .....	46
Limites et perspectives.....	51
<u>V.BIBLIOGRAPHIE</u> .....	i



## Liste des figures

- Figure 1.** Coupe d'une artère.
- Figure 2.** Mécanismes impliqués dans la contraction à la phényléphrine
- Figure 3.** Mécanismes impliqués dans la relaxation à l'acétylcholine.
- Figure 4.** Conséquences de l'administration d'une diète faible en sodium ( $\text{Na}^+$ ) lors de la dernière semaine de gestation chez le rat.
- Figure 5.** Courbe de la tension (en grammes) en fonction du rapport entre la circonférence interne et la circonférence interne sans tension ( $L/L_0$ ).

### Figures de l'article

- Figure 1.** Contractile response of aortic rings to phenylephrine (Phe), with or without L-Name, in male and female rats, control and IUGR, 5, 12 and 20 week-old.
- Figure 2.** Relaxation of aortic rings in response to carbamylcholine chloride (carbachol or Cbc), in male and female rats, control and IUGR, 5, 12 and 20 week-old.
- Figure 3.** Relaxation of aortic rings in response to sodium nitroprusside (SNP), in male and female rats, control and IUGR, 5, 12 and 20 week-old.

## Liste des abréviations

ACh	:	Acétylcholine
AMPC	:	3',5' adénosine monophosphate cyclique
ATP	:	Adénosine triphosphate
BK <sub>ca</sub>	:	<i>Large conductance Calcium-Activated Potassium Channel</i> (Canal potassique de grande conductance activé par le calcium)
Ca <sup>2+</sup>	:	Ions calcium
CaV	:	Canal calcique voltage-dépendant
Cbc	:	Carbamylcholine chloride ou Carbachol
COX	:	Cyclo-oxygénase
EDHF	:	<i>Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor</i> (Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium)
EETs	:	Acides époxyeicosatriénoïques
GTP	:	Guanosine triphosphate
GMPc	:	Guanosine 3',5'monophosphate cyclique
IP <sub>3</sub>	:	Inositol 1,4,5-triphosphate
IP <sub>3</sub> R	:	Récepteur de l'IP <sub>3</sub>
K <sup>+</sup>	:	Ion potassium
Kca	:	Canal potassique activé par le calcium
LDL	:	<i>Low-Density lipoprotein</i> (Lipoprotéine de faible densité).
L-Name	:	N-nitro-L-arginine méthyl ester

LPD	:	<i>Low Protein Diet</i> (Diète faible en protéines)
LSD	:	<i>Low Sodium Diet</i> (Diète faible en sodium)
MHC	:	<i>Myosin Heavy Chain</i> (Chaîne lourde de myosine)
NA	:	Noradrénaline
Na <sup>+</sup>	:	Ions sodium
NO	:	Oxyde nitrique ou monoxyde d'azote
eNOS	:	NO synthase endothéliale
MLV	:	Muscle lisse vasculaire
mV	:	MilliVolts
O <sub>2</sub>	:	Oxygène
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	:	Anion superoxyde
Phe ou Pe	:	Phényléphrine
PGI <sub>2</sub>	:	Prostacycline
PKG	:	Protéine kinase G
PMCA	:	<i>Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase</i> (Pompe calcique-ATPase membranaire)
RCIU	:	Restriction de croissance intra-utérine
RCPG	:	Récepteur couplé à la protéine G
ROS	:	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Dérivés réactifs de l'oxygène)
RS	:	Réticulum sarcoplasmique
RyR	:	Récepteur de la ryanodine
SERCA	:	<i>Sarco-endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase</i> (Pompe

calcique-ATPase du réticulum sarco-endoplasmique)

SNP : Nitroprussiate de sodium

SRAA : Système rénine-angiotensine-aldostérone

TRPV4 : *Transient receptor potential cation channel, subtype V4*

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier tous les membres de ma famille pour leur soutien, leur présence et leurs précieux encouragements.

Un très grand merci à ma directrice de recherche Dr. Michèle Brochu qui m'a accueillie dans son laboratoire pour mon stage puis pour ma maîtrise et qui m'a permis d'étendre mes connaissances en physiologie, tout en partageant son amour pour la recherche avec moi. Je lui suis très reconnaissante pour sa compréhension, sa patience et ses conseils. Elle n'a jamais hésité à m'encourager dans mon projet et à m'aider à m'intégrer et me sentir à l'aise dans le laboratoire.

Je tiens également à remercier Benoit Sicotte qui m'a enseigné les techniques nécessaires pour réaliser et travailler sur mon projet et qui m'a guidé tout le long des expériences.

Finalement, je remercie mes collègues de laboratoire Émilie Bigonnesse, Cynthia Gravel et Ève Mailhot-Daye qui ont fait de cet environnement un lieu de travail très agréable.

# **I. INTRODUCTION**

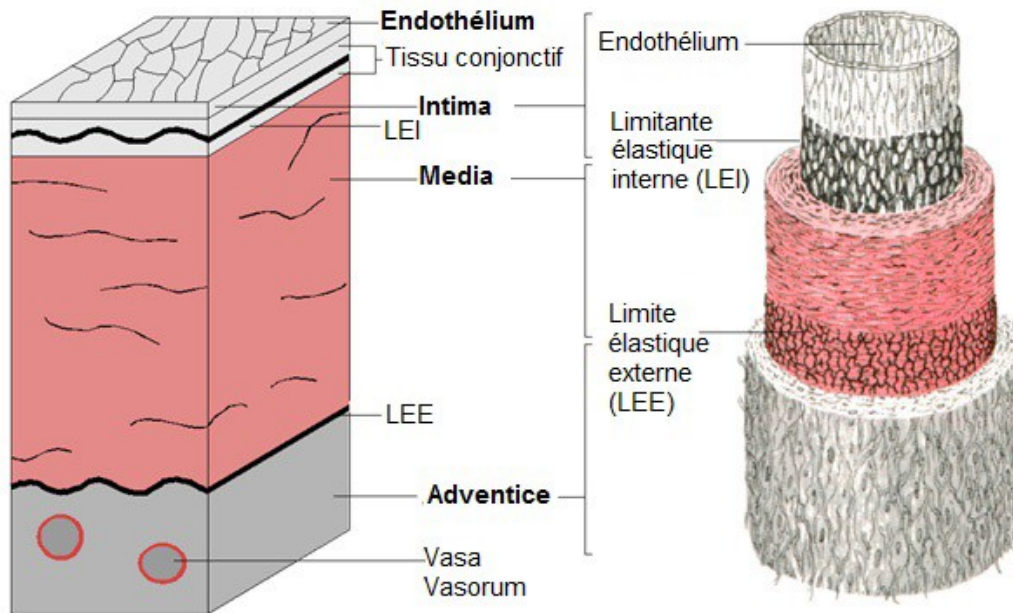
Il est connu que l'incidence des maladies cardiovasculaires est plus grande chez les hommes que chez les femmes pré-ménopausées et qu'elle augmente avec l'âge. On peut donc dire que le sexe biologique masculin et l'âge sont des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. Depuis la fin des années 1990, il est de plus en plus accepté qu'un environnement fœtal défavorable prédispose au développement de maladies à l'âge adulte. C'est dans ce contexte que se situe mon travail de recherche. À l'aide d'un modèle animal développé dans le laboratoire, nous voulons comprendre l'importance du sexe biologique, de l'environnement fœtal et de l'âge sur la réactivité vasculaire aortique. Nous ferons, tout d'abord, une courte revue de la littérature sur la structure des vaisseaux, la réactivité vasculaire et l'effet des différents composés pharmacologiques utilisés dans celle-ci. Ensuite, nous aborderons la rigidité artérielle et les différences entre les sexes au niveau cardiovasculaire. Finalement, nous parlerons de la restriction de croissance intra-utérine (RCIU), de son étiologie, de ses conséquences ainsi que des différents modèles animaux dont celui développé dans notre laboratoire.

## **1. STRUCTURE D'UN VAISSEAU**

Un vaisseau sanguin comporte trois tuniques concentriques : l'intima, la média et l'adventice (Fig.1). L'intima, tunique la plus interne, est constituée d'endothélium et de tissu conjonctif sous-endothélial. L'endothélium possède des propriétés anticoagulantes renforcées par, entre autres, la sécrétion de monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO) et de prostacycline et joue un grand rôle dans la modulation du tonus vasculaire (1). La média est composée d'une grande quantité de gaines élastiques fenestrées et de faisceaux de cellules musculaires lisses (2). Enfin, l'adventice, tunique la plus externe, comprend des fibres de collagène, des vaisseaux sanguins qui assurent une partie de la nutrition de la paroi vasculaire (vasa vasorum), des nerfs, et des vaisseaux lymphatiques (1) (2). Cette division en tuniques est commune à tous les vaisseaux mais l'importance relative de chacun des éléments la constituant varie d'un type de vaisseau à l'autre et détermine les propriétés différentes de chaque secteur vasculaire (2).

Dans les vaisseaux dits de distribution comme l'artère mésentérique et qui permettent la distribution sélective du sang vers les différents organes selon leurs besoins (2), la média contient moins de composants élastiques et plus de fibres musculaires lisses que celle des

artères de conductance comme l'aorte (2). Dans cette dernière, la couche dominante est la média dans laquelle on retrouve beaucoup de gaines élastiques fenestrées (2). L'aorte est une artère élastique qui conduit le sang oxygéné du cœur vers les capillaires qui irriguent les différents organes et se divise en crosse aortique, aorte thoracique, et aorte abdominale (2). L'aorte thoracique, située dans la cavité thoracique, est celle régulièrement utilisée dans les études de réactivité vasculaire et a été utilisée dans ce travail de recherche.



**Figure 1.** Coupe d'une artère.

(Schéma de Dr. Jérôme LÉONI, Université de Franche-Comté, Besançon, France. <<http://www.123bio.net/revues/jleoni/1chap2.html>>)

## 2. RÉGULATION DU TONUS VASCULAIRE

Le tonus vasculaire est régulé par des mécanismes intrinsèques aux vaisseaux ainsi que des mécanismes extrinsèques tels que le système nerveux autonome et les hormones circulantes. Afin de contribuer à cette régulation, l'endothélium vasculaire libère un grand nombre de médiateurs vasoactifs en réponse aux stimuli physicochimiques et neurohormonaux. Ces médiateurs diffusent vers le MLV sous-jacent et provoquent sa contraction ou relaxation (3). L'ajustement de la résistance vasculaire par ces mécanismes est essentiel pour bien assurer les besoins métaboliques régionaux(4). Nous reviendrons plus loin à la relation cellule musculaire lisse et cellule endothéliale (voir les sections 2.1, 2.2 et 2.5).



## 2.1. Potentiel membranaire

Le potentiel de membrane de la cellule musculaire lisse joue un rôle crucial dans la régulation du tonus vasculaire. Le potentiel de repos oscille normalement entre -30 et -60 mV selon le type de vaisseau (1). La concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique est plus faible que la concentration extracellulaire et que celle à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique (RS)(1). Une dépolarisation (augmentation du potentiel) correspond à une augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique et à la contraction du MLV, alors que l'hyperpolarisation (baisse du potentiel) correspond à une baisse de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique et à la relaxation(1).

L'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique se fait par l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants (CaV) et par la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS via deux types de canaux : le récepteur de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>R) et le récepteur de la ryanodine (RyR) (5). La fixation d'agonistes sur leurs récepteurs membranaires couplés à une protéine G (RCPG) induit la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) par la phospholipase C. L'IP<sub>3</sub> se fixe sur son récepteur (IP<sub>3</sub>R) sur le RS et induit la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  qui permet la contraction(5). Le RyR, malgré le fait qu'il favorise l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique, a un effet hyperpolarisant et permet la relaxation. En effet, il est activé par le  $\text{Ca}^{2+}$  qui entre dans la cellule par les canaux calciques voltage-dépendants (CaV) et permet de libérer le  $\text{Ca}^{2+}$  du RS, ce qui active des canaux potassiques sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) qui favorisent la sortie du potassium ( $\text{K}^+$ ) intracellulaire (6), permettent l'hyperpolarisation et limitent l'influx du  $\text{Ca}^{2+}$  par les CaV (5; 6). Les  $\text{K}_{\text{Ca}}$  peuvent être également ouverts par le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor) (6) dont nous allons parler dans la section 2.2.

La baisse de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique se fait également lors de l'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  par les pompes PMCA (Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase) et de la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS via des pompes SERCA (Sarcoendoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases) (1; 5).

Au niveau des artères de résistance, il existe des communications dont les canaux TRPV4 entre les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales qui déterminent la pression artérielle diastolique (242, 243). Ainsi, l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le muscle lisse entraîne une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'endothélium, et donc la production de monoxyde

d'azote (NO), de facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) et de prostacycline (242, 243).

## **2.2 Les facteurs endothéliaux relaxants**

Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO) est le médiateur prédominant de la relaxation du MLV(6). C'est un gaz soluble synthétisé par la monoxyde d'azote synthase endothéliale (eNOS) à partir de la L-arginine(6). La eNOS est une enzyme activée par une augmentation du  $Ca^{2+}$ -cytoplasmique(1). Le NO diffuse des cellules endothéliales vers les cellules musculaires lisses et active la guanylate cyclase soluble transformant le GTP en GMPc qui, à son tour, active la protéine kinase G (PKG) qui phosphoryle de manière réversible entre autres, les pompes SERCA (1). Les pompes SERCA diminuent le taux de  $Ca^{2+}$  intracytoplasmique par pompage vers le RS, ce qui entraîne une hyperpolarisation et donc la relaxation du MLV (1). De plus, le NO active directement les canaux  $K_{Ca}$  et contribue à l'hyperpolarisation par extrusion du  $K^+$  (1; 7).

Le NO est libéré de manière continue du fait des forces de cisaillement générées par l'écoulement du sang au contact de l'endothélium (5). Sa production est également stimulée par les agonistes de la eNOS (Acétylcholine, bradykinine, ADP, ATP etc) et est diminuée lors du vieillissement, de l'hypoxie, de l'hypercholestérolémie et par les LDL (244). Le NO joue un rôle important dans la modulation du tonus vasculaire dans la circulation et empêche l'agrégation et l'adhésion plaquettaires(8).

Afin de supprimer l'implication du NO dans les tests de réactivité vasculaire, le L-Name (N-nitro-L-arginine methyl ester), qui est un inhibiteur de la synthase de l'oxyde nitrique (eNOS), peut être utilisé. Il est structurellement analogue à la L-arginine qui est utilisée comme substrat par la eNOS pour la formation du NO. Le L-Name fait compétition à la L-arginine et inhibe la synthèse du NO (9) et la relaxation du MLV due au NO endothélial.

Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF : Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor) est également un médiateur important de la relaxation du MLV. Il est stimulé par les forces de cisaillement (10; 11) et les substances neurohormonales telles que la bradykinine (12; 13) et l'acétylcholine (14; 15). Son identité et son mécanisme d'action exacts demeurent inconnus. Toutefois, il a été démontré que l'action de l'EDHF implique les canaux  $K_{Ca}$  qui sont inhibés par la combinaison de l'apamine et de charybdotoxine (16-19).

Il semble exister plusieurs EDHFs, dont l'ion  $K^+$  (19-22) et les produits issus du métabolisme dépendant de l'endothélium de l'acide arachidonique par le cytochrome P450 tel que l'acide 11,12-époxyeicosatriénoïques (11,12 EETs) (23; 24).

La prostacycline ( $PGI_2$ ) est un vasodilatateur dérivé des prostaglandines (245). La cyclo-oxygénase (COX) permet la formation de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique libéré à partir des phospholipides membranaires par la phospholipase (245). La prostacycline-synthétase permet la formation de  $PGI_2$  à partir des prostaglandines (245). Les cellules endothéliales sont le site majeur de production de la  $PGI_2$  qui induit une relaxation du muscle lisse vasculaire par activation de l'adénylyl cyclase et augmentation de la production d'un nucléotide, la 3',5' adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (245). La  $PGI_2$  facilite la libération endothéliale de NO qui, en retour, potentialise l'action de la  $PGI_2$  au niveau musculaire lisse par inhibition de la phosphodiesterase qui ne peut plus inactiver l'AMPC (246). Toutefois, la contribution de la  $PGI_2$  à la relaxation endothélium-dépendante est beaucoup moins importante que celle du NO (247, 248).

### **2.3. La dysfonction endothéliale**

La dysfonction endothéliale est un facteur prédictif de la survenue de maladies cardiovasculaires et se manifeste par une réduction de la réponse dilatatrice du vaisseau et par un état pro-inflammatoire et pro-thrombotique (25). Elle est associée au diabète (31), au syndrome métabolique (32) ainsi qu'à la plupart des maladies cardiovasculaires, telles que l'hypertension (26), l'athérosclérose (27), l'insuffisance cardiaque chronique (28; 29) et l'insuffisance rénale chronique (30).

La caractéristique principale de la dysfonction endothéliale est une réduction de la biodisponibilité du NO (33), qui peut être due soit à la réduction de l'expression et/ou de l'activité de la eNOS, au « découplage » de la eNOS (en l'absence du substrat L-arginine ou du cofacteur  $BH_4$ ), à l'augmentation de la capture ou de la dégradation du NO ou à l'altération de la transmission des événements signalétiques initiés par le NO (34; 35). La principale cause de la baisse de la biodisponibilité du NO semblerait toutefois être la réaction du NO avec un des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) : l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) (36). En effet, un déséquilibre entre la génération des ROS et leur destruction par les enzymes antioxydantes permet leur augmentation. Les  $O_2^{\bullet-}$  se combinent alors au NO pour former le peroxynitrite (35; 37). Ce dernier est un oxydant cytotoxique ayant de nombreux effets délétères dont la

participation au découplage de la eNOS et à l'oxydation des LDL, pouvant induire l'athérosclérose (38-40). L'excès de ROS contribue également à la lésion endothéliale menant à la mort cellulaire programmée (apoptose) et à l'anoikis (forme de l'apoptose caractérisée par un détachement des cellules endothéliales) (41) et à la baisse de la biodisponibilité du NO (40).

#### **2.4. Les hormones sexuelles**

Les hormones sexuelles, dont l'œstrogène et la testostérone, figurent parmi les composés endogènes ayant des propriétés vasodilatatrices. L'action vasodilatatrice de l'œstrogène peut être expliquée, en partie, par l'action inhibitrice qu'elle exerce sur les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants dans les cellules du MLV (42) et par sa stimulation de la synthèse du NO (43-45). L'action vasodilatatrice de la testostérone, elle, se fait en partie via la libération endothéliale de NO (46; 47), l'activation des canaux potassiques sensibles à l'ATP (48) et des canaux potassiques à grande conductance activés par le calcium ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) (49).

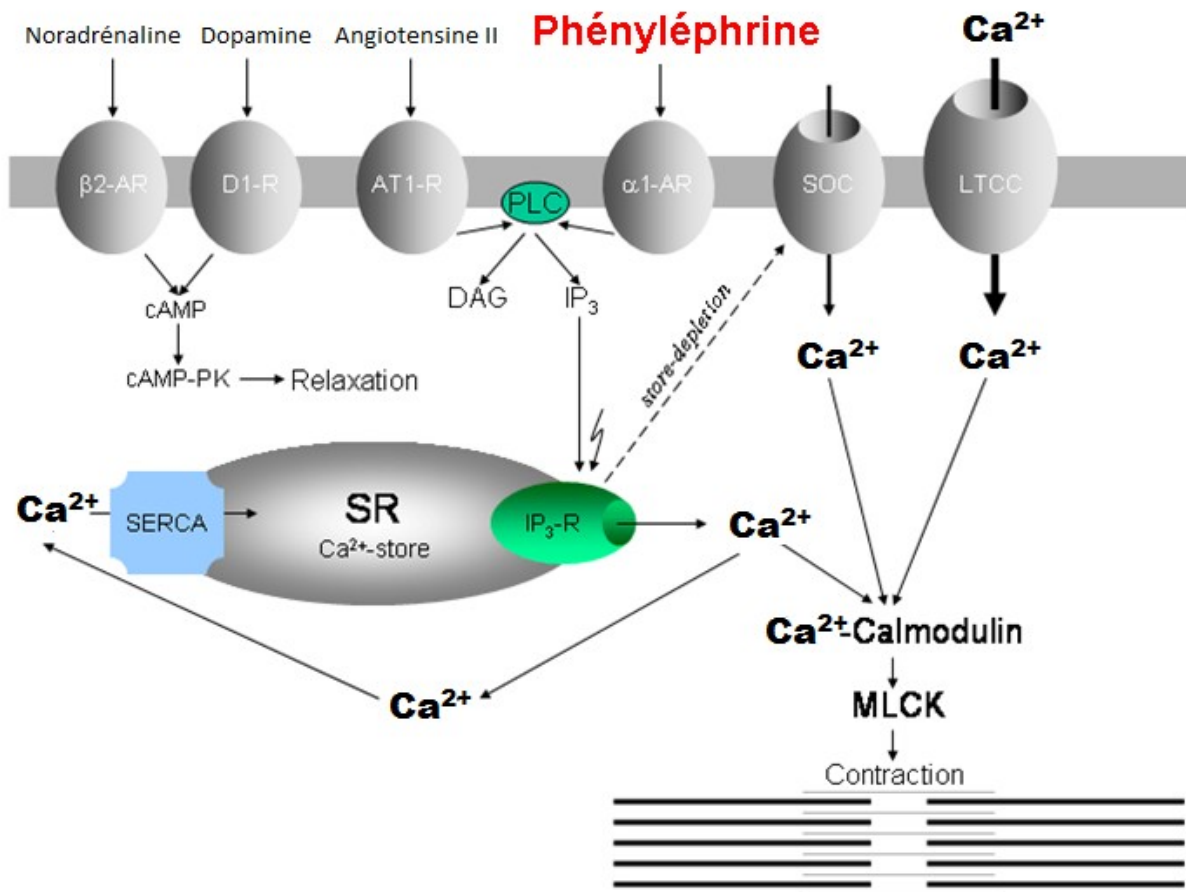
#### **2.5. Contraction du muscle lisse vasculaire (MLV)**

Des jonctions communicantes unissant les cellules musculaires lisses permettent la synchronisation de la contraction, et la lame basale entourant les cellules permet la transmission des forces entre ces dernières(2). Les cellules musculaires lisses sont fusiformes, effilées et possèdent un noyau central. Elles sont, entre autres, formées de filaments d'actine fins, de filaments intermédiaires de desmine et de vimentine, et d'épais filaments de myosine de type II(2). Cette dernière est une protéine dimérique composée de deux chaînes lourdes et de quatre chaînes légères (50). La contraction de la cellule musculaire lisse est régulée par la phosphorylation  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante de l'une des chaînes légères de la myosine(2). En effet, l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire permet la liaison de celui-ci à la calmoduline et à la formation du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline (2) tel que montré sur la figure 2. Celui-ci active la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK), ce qui permet la phosphorylation, l'élongation puis l'assemblage en filaments des chaînes légères de myosine et l'exposition du site de fixation à l'actine(2; 50). La myosine fixée aux filaments d'actine mène alors à la contraction de la cellule musculaire. La baisse de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire entraîne la déphosphorylation des chaînes légères de myosine et permet la relaxation MLV(2).

La contraction du MLV peut être modulée par des récepteurs membranaires activant des seconds messagers (51), tels que les récepteurs alpha-adrénergiques (52), les récepteurs

muscariniques(52) et les récepteurs de l'angiotensine (53) qui permettent l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Voir Fig.2).

La phényléphrine (Phe) est un agoniste puissant des adrénoccepteurs  $\alpha_1$  (54; 55) dont une grande partie de l'effet contractile dépend de la modulation des réserves intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$ , tel qu'illustré sur la figure 2. En effet, l'activation des  $\alpha_1$ -adrénoccepteurs active la phospholipase C qui hydrolyse un phospholipide membranaire, le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, en deux seconds messagers : l'inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) et le diacylglycérol. L' $\text{IP}_3$  lie des récepteurs localisés sur le RS et permet la libération des réserves de  $\text{Ca}^{2+}$ . La libération des réserves de  $\text{Ca}^{2+}$  et l'ouverture conséquente de canaux calciques membranaires permettant l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire induisent la contraction (42).



**Figure 2.** Mécanismes impliqués dans la contraction à la phényléphrine.

$\beta_2$ -AR : récepteur  $\beta_2$ -adrénergique;  $\alpha_1$ -AR : récepteur  $\alpha_1$ -adrénergique; AT1-R : récepteur de type 1 de l'angiotensine II; SOC : store-Operated calcium channel (canal sensible à la libération du Ca<sup>2+</sup> des réserves intracellulaires); LTCC : L-type calcium channel (canal calcique de type L); SERCA : Sarcoendoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPases; SR : Réticulum sarcoplasmique; MLCK : Myosin light-chain Kinase; IP<sub>3</sub>-R : récepteur à l'IP<sub>3</sub>.

Les canaux SOC et LTCC permettent l'entrée du Ca<sup>2+</sup> extracellulaire.

(Adapté de : Voltage-Gated Calcium Channels <<http://calcium.ion.ucl.ac.uk/l-type-pharmacology.html>>)

Dans le lit vasculaire mésentérique, la stimulation des adrénorécepteurs  $\alpha_1$  du MLV par la Phe, et donc la contraction de ce dernier, sont associées à une activation indirecte des cellules endothéliales qui libèrent alors du NO et de l'EDHF. L'augmentation de la concentration en Ca<sup>+</sup> dans la cellule musculaire lisse associée à la contraction permet la

diffusion du  $\text{Ca}^+$  vers la cellule endothéliale via les jonctions myoendothéliales. Le  $\text{Ca}^+$  permet alors l'activation de la eNOS (241) mais également l'activation des canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$  dans l'endothélium et la sortie du  $\text{K}^+$  (56; 57). Le  $\text{K}^+$  qui sort de la cellule endothéliale agit alors sur des  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPases}$  (249) se trouvant sur les cellules musculaires lisses et permet d'atténuer la contraction de ces dernières. Cette atténuation est toutefois principalement permise par le NO car elle est abolie lorsque la synthèse de ce dernier est bloquée par l'ajout de L-Name(57).

Des concentrations de l'ordre du nanomolaire (nm) de Phe permettent également d'activer des adrénoccepteurs  $\alpha_1$  présents sur les cellules endothéliales du lit vasculaire mésentérique, ce qui active la eNOS et permet la relaxation du MLV (58).

## **2.6 : Relaxation du muscle lisse vasculaire**

L'endothélium, lorsqu'activé par exemple par les forces de cisaillement ou des composés pharmacologiques, libère plusieurs médiateurs physiologiques de la relaxation vasculaire, dont le facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF), identifié comme étant le NO, la prostacycline et l'EDHF(59).

La relaxation du MLV est, comme vu précédemment, due à une baisse du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire mais également à l'extrusion d'ions  $\text{K}^+$  qui hyperpolarise le potentiel membranaire(1). Les médiateurs libérés par l'endothélium activent plusieurs canaux et pompes du MLV (7; 18; 60) responsables de la sortie du  $\text{K}^+$ , dont les  $\text{K}_{\text{Ca}}$  (voir section 2.2) et la pompe  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ .

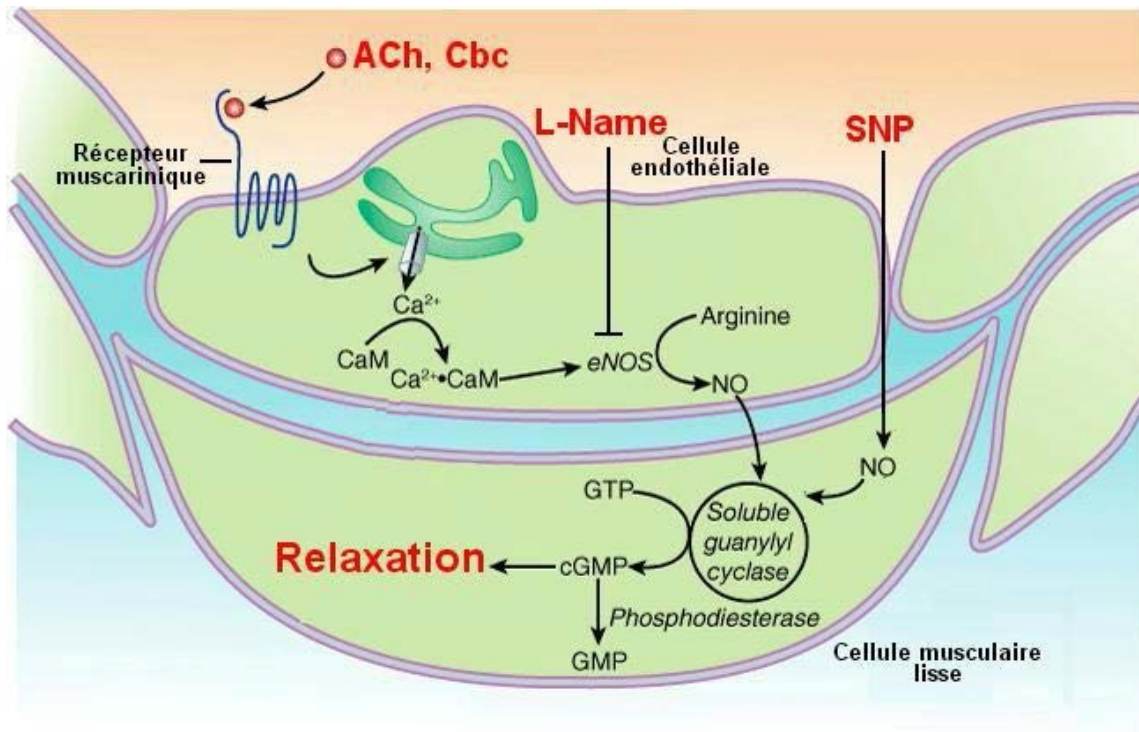
La  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  est une pompe membranaire qui joue un grand rôle dans la régulation du tonus vasculaire. Une augmentation de son activité engendre une hyperpolarisation et une relaxation du MLV qui peut être induite par la réduction du flux de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers les CaV membranaires (61). Il a été démontré que des souris transgéniques surexprimant la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  ont une pression sanguine plus faible (62), alors qu'une baisse de l'expression de son isoforme  $\alpha$  résulte en un état hypercontractile (63) et que l'inhibition pharmacologique de son activité mène à une vasoconstriction(64).

La carbamylcholine chloride, ou carbachol (Cbc), est un ester de choline qui fait partie des composés pharmacologiques permettant la libération du NO par l'endothélium. Elle agit sur les récepteurs muscariniques se trouvant sur la surface externe de la cellule endothéliale et cause ainsi des effets pharmacologiques parasympathiques, similaires à ceux de l'acétylcholine (ACh) (65). L'ACh, tout comme le Cbc, se fixe sur son récepteur membranaire

qui active une protéine Gq, puis la phospholipase C responsable d'une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol, ce qui permet l'activation de la eNOS et la libération de NO qui diffuse vers les cellules musculaires lisses (1)(voir Fig. 3).

Il existe également des composés pharmacologiques de synthèse qui agissent directement sur le MLV et permettent sa relaxation. Parmi ceux-ci, le nitroprussiate de sodium (SNP) est un composé nitroso (nitroferricyanure) employé depuis longtemps comme traitement dilatateur en clinique (66; 67). C'est un agent vasodilatateur, donneur d'oxyde nitrique (NO), qui agit directement sur le MLV, indépendamment de l'endothélium (68). Dans les systèmes biologiques, la génération du NO par le SNP se fait par des enzymes membranaires qui se trouvent sur le MLV (66; 69). Le NO généré par le métabolisme du SNP induit une hyperpolarisation membranaire et stimule la guanylate cyclase soluble. Celle-ci augmente la synthèse de GMP cyclique (cGMP), qui, par une cascade d'évènements, incluant une hyperpolarisation membranaire qui mène à la diminution du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique et donc à la relaxation du MLV (70; 71).





**Figure 3.** Mécanismes impliqués dans la relaxation à l'acétylcholine. Voie de signalisation de l'oxyde nitrique (NO) et action de l'acétylcholine (ACh), de la carbamylcholine chlorure (Cbc), du L-Name et du nitroprussiate de sodium (SNP).

(Adapté de Basic & Clinical Pharmacology, 11ème édition, par Katzung BG, Masters SB et Trevor AJ.)

### 3. CHANGEMENTS VASCULAIRES, RIGIDITÉ ARTÉRIELLE ET L'ÂGE

La rigidité vasculaire est décrite par une baisse de distensibilité, donc de compliance (72). Cette dernière est la capacité du vaisseau à changer de volume en fonction de la pression hydrostatique appliquée à l'intérieur de celui-ci (73) et la distensibilité est une caractéristique intrinsèque de sa paroi (74).

Avec l'âge, plusieurs changements structurels de la paroi des artères ont lieu, dont l'augmentation de l'épaisseur de l'intima-média aussi bien chez le rat (dans l'aorte (75) et l'artère mésentérique (76)) que chez l'humain (dans l'artère fémorale (77), l'artère coronaire (78), la carotide (79) et l'aorte (80)), l'augmentation de dépôts de collagène, fracture de fibres d'élastine dans la média de l'aorte et de l'artère pulmonaire (81; 82) et l'augmentation de la perméabilité vasculaire aortique (83) chez le rat. De plus, il y a une augmentation dans

l'intima-média de l'expression des métalloprotéinases matricielles 2 et 9 (MMP-2 et MMP-9), autant chez le rat (75; 84) que chez l'être humain (85; 86). Ces enzymes entraînent la dégradation de l'élastine entre autres, augmentant ainsi la rigidité artérielle de l'aorte entre autres (84). Chez l'être humain, il existe une relation linéaire positive entre la rigidité des artères principales et l'âge (87; 88), alors que la rigidité des artères périphériques augmente peu ou pas du tout avec l'âge (88; 89).

La rigidité des grosses artères est reconnue comme un facteur de risque indépendant pour le développement des maladies cardiovasculaires (90). Plusieurs conditions physiologiques, autres que l'âge prédisposent à la rigidité artérielle : le faible poids à la naissance (91), le manque d'activité physique(92), la cigarette (97) ou un historique parental d'hypertension (93), mais également les diabètes de type 1 (94) et 2 (95), l'obésité, le syndrome métabolique (96) et certaines maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension (98), l'hypercholestérolémie (99) ou l'insuffisance cardiaque (100).

#### **4. DIFFÉRENCES AU NIVEAU CARDIOVASCULAIRE ENTRE LES SEXES**

##### **4.1. Tonus vasculaire**

Plusieurs études ont démontré que l'incidence de maladies cardiovasculaires est plus grande chez les hommes que chez les femmes pré-ménopausées (8; 101) et que ceci serait dû à un effet protecteur des œstrogènes. Ces derniers agissent sur l'endothélium et stimulent la synthèse d'agents vasodilatateurs tels que la prostacycline et le NO (101; 102) et baissent la production d'agents vasoconstricteurs tels que certains dérivés de la cyclo-oxygénase (comme les prostaglandines H<sub>2</sub> et F<sub>2α</sub> (242) les espèces réactives de l'oxygène, l'angiotensine II et l'endothéline-1 (102; 103). Certaines études *in vivo* et *in vitro* démontrent que les œstrogènes induisent une augmentation de la production de NO en augmentant l'activité de la eNOS et/ou l'expression de son gène, ce qui contribuerait à leurs effets protecteurs sur le système cardiovasculaire (101; 102). De même, il a été démontré que la production basale de NO est plus grande dans l'aorte thoracique isolée de femelles que dans celle des mâles aussi bien chez le rat (8) que chez le lapin (104).

Les œstrogènes agissent également directement sur le MLV en favorisant son hyperpolarisation. En effet, les œstrogènes induisent une vasodilatation par inhibition de canaux CaV (notamment les L-type Ca<sup>2+</sup> channels) et par activation de canaux potassiques

(notamment les BK<sub>Ca</sub>) (102; 105-107). De plus, il a été démontré que les œstrogènes baissent l'expression de CaV dans l'artère coronaire ce qui limite la vasoconstriction (108).

Tel que décrit, dans la section 2.5, la pompe Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase est un régulateur du tonus vasculaire. L'expression de cette pompe peut être modulée par des mécanismes hormonaux et neurogéniques (63). Les femelles exprimeraient plus l'isoforme  $\alpha$ -2 de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase et cette expression serait induite par les œstrogènes (61) et pourrait ainsi contribuer au maintien d'un tonus basal plus bas chez la femelle.

La différence de l'incidence de maladies cardiovasculaires entre les sexes a souvent été attribuée à tort aux effets de la testostérone. Cette dernière, comme l'illustrent plusieurs études récentes, peut avoir des effets protecteurs sur le système cardiovasculaire et un niveau bas de testostérone pourrait être associé à une plus grande incidence de maladies cardiovasculaires chez les hommes (109-114). La testostérone, comme nous l'avons vu dans la section 2.4, a des effets vasodilatateurs sur les vaisseaux en inhibant les canaux calciques et en favorisant l'ouverture des canaux potassiques (49; 115-117).

Ainsi, il est de plus en plus évident que des différences existent entre les mâles et les femelles au niveau cardiovasculaire mais ces différences ne peuvent être seulement attribuées aux effets protecteurs des œstrogènes. Le mécanisme exact à l'origine de ces différences n'est pas connu et l'âge de leur apparition n'est pas déterminé.

#### **4.2 Rigidité artérielle**

Il existe des différences au niveau de la rigidité artérielle entre les sexes et en fonction de l'âge mais elles sont peu documentées et les mécanismes à leur origine sont peu connus. Les rares études sont contradictoires.

Ahimastos et ses collaborateurs ont démontré en mesurant la compliance artérielle systémique et la vitesse de l'onde de pouls que chez les filles pré-pubères, les grosses artères sont plus rigides et la pression pulsée plus grande que chez les garçons; ils ont attribué ceci à des différences génétiques et intrinsèques entre les sexes(118). Après la puberté, la rigidité devient la même chez les deux sexes : les artères des filles acquerraient en distensibilité grâce aux œstrogènes et à la progestérone et celles des garçons en rigidité grâce à la testostérone(118). En effet, l'action des hormones sur la structure vasculaire peut se faire sur la prolifération et la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires (120) et sur la composition de la matrice extracellulaire (121; 122).

Une étude faite sur la carotide chez des enfants par ultrasonographie vient contredire celle d'Ahimastos et démontre qu'il n'y a pas de différence dans la rigidité aortique avant la puberté (123). Ces deux études ont utilisé des méthodes différentes pour la mesure de la rigidité artérielle, et les artères étudiées sont différentes. En effet, Marlatt KL et ses collaborateurs n'étudient que la carotide alors qu'Ahimastos étudie les grandes artères en général (sans préciser lesquelles). Or, certaines artères pourraient gagner en rigidité avec l'âge et d'autres non (89).

Chez les personnes âgées, des études faites chez des personnes hypertendues (124) ou normotendues (125) de plus de 65 ans démontrent que les femmes ont une compliance artérielle plus faible caractérisée par un arc aortique plus rigide (124; 125) et une pression différentielle carotidienne et brachiale plus grande que les hommes, bien que ces derniers aient une pression artérielle moyenne plus élevée (124). Puisque seules les femmes auraient une augmentation plus prononcée de la rigidité selon le temps(126), leurs artères sont plus rigides que celles des hommes après la ménopause et une thérapie hormonale de remplacement à l'œstrogène permettrait d'améliorer la compliance et de baisser la rigidité artérielle (127). À l'opposé, une étude faite sur des aortes de personnes de plus de 65 ans démontre que la rigidité est plus prononcée chez les hommes (128).

## **5. LA RESTRICTION DE CROISSANCE INTRA-UTÉRINE**

La restriction de croissance intra-utérine (RCIU) est une complication de la grossesse ayant des conséquences sur le développement du fœtus et à long terme sur la santé de la progéniture à l'âge adulte. Elle est associée à la mortalité et à la morbidité périnatales ainsi qu'à un plus petit poids à la naissance.

Un petit poids à la naissance est défini chez l'humain comme étant de moins de 2500g à la naissance, indépendamment de l'âge gestationnel (129). Moins de la moitié des fœtus nés plus petits que la normale correspond à des RCIU, la petite taille et petit poids pouvant tout simplement être dus à des facteurs déterminés par l'ethnicité, le poids ou la taille de la mère (130).

La RCIU peut être due à des défauts chromosomiques, peut prédisposer à des malformations et peut coexister avec ces dernières à cause de facteurs étiologiques communs (131). La fréquence de la RCIU est de 22% chez les enfants ayant des malformations (131).

Elle peut également être due à des facteurs maternels tels que la pré-éclampsie, les infections, la mauvaise alimentation, la déficience en nutriments (protéines, acide folique, vitamine A, B, C, zinc, calcium, magnésium (132)), la cigarette et les narcotiques. Dans certains cas, elle peut être due à une transfusion gémellaire (133).

## **5.1 Facteurs maternels pouvant mener à une RCIU**

### **5.1.1 La cigarette et l'alcool**

La cigarette peut causer une nécrose de la décidua (muqueuse utérine lors de la grossesse), une apoptose placentaire, un infarctus placentaire et donc une RCIU en affectant les échanges entre la mère et le fœtus (134; 135). Une analyse histologique de placentas provenant de femmes qui fument pendant la grossesse démontre que la cigarette cause, entre autres, la dégénération des cytotrophoblastes et des cellules endothéliales dans les capillaires des villosités placentaires (136) et dans le cordon ombilical (137). Ces altérations seraient en partie la conséquence de l'effet vasoconstricteur de la nicotine, de l'augmentation de la résistance vasculaire (138) et de la diminution du flux sanguin utéro-placentaire qui en résultent (136; 139-141). La cigarette, de par sa composition en nicotine, en monoxyde de carbone et en cadmium, a donc des effets néfastes sur le placenta et sur la circulation utéro-placentaire et des conséquences nocives autant chez la mère que chez le fœtus (142).

La dose minimale d'alcool pouvant avoir des conséquences chez la femme enceinte n'est pas connue (143). L'alcool (éthanol) a des effets multiples, surtout sur le placenta. Par exemple, des villosités de placentas humains exposées *in vitro* à de l'éthanol puis mises en contact avec des marqueurs du stress oxydant démontrent une augmentation de ce dernier dans les trophoblastes (144). De plus, dans des placentas humains perfusés et exposés à de l'éthanol, la production de thromboxane B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>) et donc la vasoconstriction sont augmentées (145). Chez le rat, il a été démontré que l'éthanol peut détruire les cellules trophoblastiques du placenta, compromettre l'invasion trophoblastique en inhibant l'expression d'enzymes régulatrices de la motilité et de la migration (146) et diminuer le flux sanguin utéro-placentaire (145; 147). La consommation d'alcool pendant la grossesse affecterait donc les échanges materno-fœtaux et aboutirait ainsi en une RCIU (148). De plus, l'éthanol traverse rapidement le placenta (149) et affecte le développement du fœtus chez lequel ceci peut, à long terme, causer plusieurs dommages physiques, cognitifs et émotionnels,

regroupés sous le nom de ‘‘Fetal Alcohol Spectrum Disorders’’ (FASD), dont la forme la plus sévère s’appelle ‘‘Fetal Alcohol Syndrome’’ (FAS) (150; 151).

### **5.1.2 Maladies cardiovasculaires et immunitaires**

Les principaux facteurs maternels à l’origine de la RCIU sont les maladies vasculaires (130; 152) dont la pré-éclampsie, le diabète mellitus, les maladies rénales (130; 152), les lésions de la vasculature intra-placentaire et les pathologies vasculaires de l’utérus(153).

Les infections maternelles dont celles dues au cytomegalovirus, au virus de l’herpès simplex (HSV) et à la varicelle, causent 5 à 10% des cas de RCIU (130). Elles peuvent altérer l’expression des gènes trophoblastiques, réduire l’invasion trophoblastique ou induire l’apoptose. En altérant la fonction trophoblastique, elles induisent ainsi une RCIU (154).

## **5.2. Modèles animaux de la RCIU**

Plusieurs modèles d’induction de la RCIU ont été élaborés afin d’étudier les mécanismes et les conséquences de cette dernière. Je ferai un bref survol des différents modèles.

### **5.2.1. L’hypoxie**

L’hypoxie (10.5% d’O<sub>2</sub> entre 6–21 jours de gestation) chez la rate gestante mène à une augmentation de la pression artérielle, une invasion trophoblastique anormale et un remodelage vasculaire utéroplacentaire chez la mère(187). Les échanges materno-fœtaux sont alors affectés ce qui résulte en une RCIU chez la progéniture et en des symptômes pré-éclamptiques via l’endothéline-1 (ET-1) chez la mère (187). Lorsqu’induite pendant la dernière semaine de gestation, l’hypoxie (13-14% d’O<sub>2</sub> ou 11.5% d’O<sub>2</sub>) provoque une RCIU chez les fœtus (188; 189). Si après le sevrage, ces animaux RCIU reçoivent une diète riche en gras, la concentration de leptine plasmatique est augmentée par rapport aux animaux témoins ayant reçu la même diète (189). Une hyperlipidémie et une résistance à l’insuline sont aussi observées suggérant un syndrome métabolique chez les RCIU (189).

Le modèle de l’hypoxie est valable puisqu’elle cause une RCIU chez l’humain également. En effet, chez celui-ci, l’hypoxie chronique mène à une RCIU, qu’elle soit préplacentaire (la mère et le fœtus sont dans des conditions hypoxiques (ex. en haute-altitude)), utéroplacentaire (oxygénation maternelle normale mais la circulation utéro-placentaire altérée (ex pré-éclampsie)) ou postplacentaire (seulement le fœtus est hypoxique)

(190; 191). L'hypoxie est aussi associée à une ischémie du myocarde et ainsi, à une baisse de la fonction cardiaque fœtale (191).

### **5.2.2. Diète faible en protéines (LPD)**

La diète faible en protéines (8% de caséine) chez les rats avant l'accouplement et pendant la gestation ou pendant la gestation seulement induit une RCIU (192; 193) ainsi que de l'hypertension à l'âge adulte chez la progéniture (192). Toujours chez le rat, cette diète (9% à 10% de caséine) induit une réduction du nombre de cardiomyocytes dans le cœur fœtal par apoptose ce qui affecte la fonction cardiaque après la naissance puis à l'âge adulte (194; 195). Une LPD (8% de caséine) administrée tout au long de la gestation mène également à une baisse de la prolifération cellulaire, de la taille des îlots de Langerhans et de leur vascularisation à 21.5 jours de gestation et altère la sécrétion de l'insuline à l'âge adulte, suggérant des dommages dans la structure et dans la fonction du pancréas endocriné (196).

### **5.2.3 Ligature bilatérale des artères utérines**

La ligature bilatérale des artères utérines entraîne une diminution de la perfusion placentaire, affectant ainsi la distribution de nutriments et d'oxygène au fœtus. Plusieurs études utilisent ce modèle qui conduit à une RCIU. Lorsque la ligature est faite au 18<sup>ème</sup> jour de gestation chez la rate, les fœtus aux jours gestationnels 18, 19, 20, et 21 souffrent d'hypoglycémie, d'hypoxie et d'acidose (197). Lorsque la ligature est faite au 19<sup>ème</sup> jour de gestation, le nombre de cellules  $\beta$  pancréatiques baisse avec l'âge et la masse relative de ces cellules ne représente plus que 50% de la normale à 15 semaines. La progéniture développe ainsi, entre 7 et 10 semaines, une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline (198).

### **5.2.4. Le modèle animal de la diète faible en sodium**

Lors de la gestation normale chez la rate, il y a une augmentation du volume circulant et de l'activité du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) au cours de la dernière des 3 semaines de gestation. D'autre part, l'organogénèse chez le rat se fait principalement durant les deux premières semaines de gestation (199). En donnant une diète faible en sodium (LSD)

au cours de la dernière semaine de gestation (à partir du jour 15), nous avons développé un modèle de RCIU (200) (Voir Figure 4). Cette diète entraîne une augmentation plasmatique de la concentration d'aldostérone et de l'activité de la rénine mais une expansion volumique moindre que chez la rate gestante sous diète normale (200). De plus, le diamètre des artères utérines arquées et les placentas sont plus petits, ce qui suggère une baisse de la perfusion placentaire pouvant affecter la croissance du fœtus (201). La prise de poids chez la mère est plus faible mais n'est pas due à une diminution de consommation de nourriture (200). La consommation d'eau, quant à elle, est diminuée (202). La LSD n'affecte pas le nombre de fœtus et n'entraîne pas de malformation.

Chez le fœtus, les poids du cerveau et du cœur sont augmentés par rapport au poids total (203). La synthèse des catécholamines et la stéroïdogenèse fœtales sont altérées et l'expression des gènes impliqués dans l'hypoxie, le stress oxydant et la réponse inflammatoire est augmentée (204). À 8 semaines, les rats ayant eu une RCIU ont une pression sanguine légèrement supérieure à celle des témoins (203). Chez les femelles à 12 semaines de vie, une augmentation du volume des cardiomyocytes et une diminution de leur contractilité suggèrent un remodelage des cardiomyocytes (205). Les femelles seules démontrent une baisse du taux d'aldostérone plasmatique et une augmentation du taux de créatinine plasmatique suggérant une baisse de la filtration glomérulaire (205).

### **5.3 Théorie de la programmation fœtale**

En 1986, Barker et ses collaborateurs ont observé que les individus nés avec un faible poids ont un taux de mortalité dû à des maladies cardiovasculaires plus élevé à l'âge adulte que ceux nés avec un poids approprié à l'âge gestationnel (155). Ils ont alors proposé la théorie de la programmation fœtale qui stipule qu'une atteinte pendant une ou des période(s) critique(s) de la vie prénatale mènerait à des changements permanents dans plusieurs structures et fonctions physiologiques du fœtus qui cherche à adapter sa croissance et son métabolisme à un environnement défavorable (156). Cette adaptation l'exposerait à un plus grand risque de développer des maladies chroniques après la naissance (156). Ainsi, une atteinte *in utero* a des séquelles à long terme sur la santé de l'individu.

Depuis, plusieurs études ont démontré une association entre un faible poids à la naissance et des maladies cardiovasculaires à l'âge adulte comme l'hypertension artérielle (157; 158) et la résistance à l'insuline (163; 164) ainsi que des maladies associées à un risque



cardiovasculaire telles que le diabète de type 2 (159; 160), l'obésité (161; 162) et les maladies métaboliques (165).

### **5.3.1. Le rôle du sexe dans la programmation fœtale**

La réponse à l'atteinte *in-utero* s'exprime différemment chez les deux sexes *ex-utero*. Par exemple, lorsque des enfants de 7 à 9 ans nés avec un faible poids de naissance sont comparés à des enfants nés avec un poids normal, lors d'un stress psychosocial de 10 minutes (Trier Social Stress Test for Children), les réactions du système cardiovasculaire sont différentes. Chez les garçons, on observe une augmentation de la pression artérielle et de la résistance vasculaire systémique (mesurée à l'aide d'un tonomètre) alors que les filles ont une augmentation de l'activation sympathique du cœur (166).

Des modèles animaux ont permis de démontrer que les conséquences d'une RCIU peuvent être spécifiques au sexe. Ainsi, suite à une restriction de protéines modérée chez la rate gestante (167) ou une insuffisance placentaire causée par une baisse de perfusion utérine (168), une augmentation de la pression artérielle est observée uniquement chez la progéniture mâle à l'âge adulte. Dans un modèle d'insuffisance placentaire similaire, seuls les mâles développent de l'hypertension à l'âge adulte. Toutefois, l'effet semblerait être hormonal car l'ovariectomie augmente significativement la pression artérielle chez la descendance femelle et la castration abolit l'hypertension observée chez la descendance mâle. Ce serait donc, selon cette étude, la testostérone qui contribuerait à augmenter la réponse hypertensive chez les mâles RCIU et l'œstradiol jouerait un rôle protecteur chez les femelles RCIU (169; 170). Chez la progéniture âgée de 7 mois d'une rate ayant subi une hypoxie (12% d'O<sub>2</sub>) durant la dernière semaine de gestation, le tonus myogénique (mesuré en appliquant des pressions croissantes à des segments artériels montés dans un artériographe) est augmenté dans les artères mésentériques de rats mâles seulement (171) suggérant que seuls ces derniers ont subi les conséquences de la RCIU sur la réactivité des artères mésentériques.

## **5.4. Conséquences de la RCIU**

### **5.4.1 Anatomie et réactivité vasculaire**

La RCIU est associée à des changements structurels du système cardiovasculaire postnatal, notamment des vaisseaux sanguins. Chez l'être humain, la RCIU est associée à un épaissement persistant de la paroi aortique qui est un marqueur précurseur du

développement de l'athérosclérose (172; 173) et qui est mesurable à l'aide d'ultrasons. Ainsi, chez les fœtus ayant eu une RCIU, l'épaisseur des couches intima-média de l'aorte abdominale est plus grande que chez les témoins *in utero*, 18 mois après la naissance (174; 175) et est toujours présente à l'âge de 24-25 ans (176). Chez des enfants de 9 à 11 ans, de 8 et 13 ans et chez de jeunes adultes de 24-25 ans, il a été observé à l'aide d'une technique non invasive aux ultrasons que la capacité de l'artère brachiale à dilater en réponse à une augmentation du flux sanguin est plus faible chez les RCIU, suggérant une altération de la fonction endothéliale (173; 176; 177). La RCIU a été également associée, chez de jeunes adultes âgés entre 22 et 25 ans, à une baisse du diamètre de l'aorte ascendante et une augmentation de la pression aortique (178). Chez un autre groupe de jeunes adultes de 24-25 ans, la RCIU a été associée à une augmentation du taux de triglycérides et de LDL qui sont des marqueurs de l'inflammation dans l'athérosclérose (176).

La RCIU est donc associée à des changements à long terme de la fonction vasculaire, changements qui se manifestent dès l'enfance et qui peuvent influencer le risque à long terme de développer des maladies cardiovasculaires.

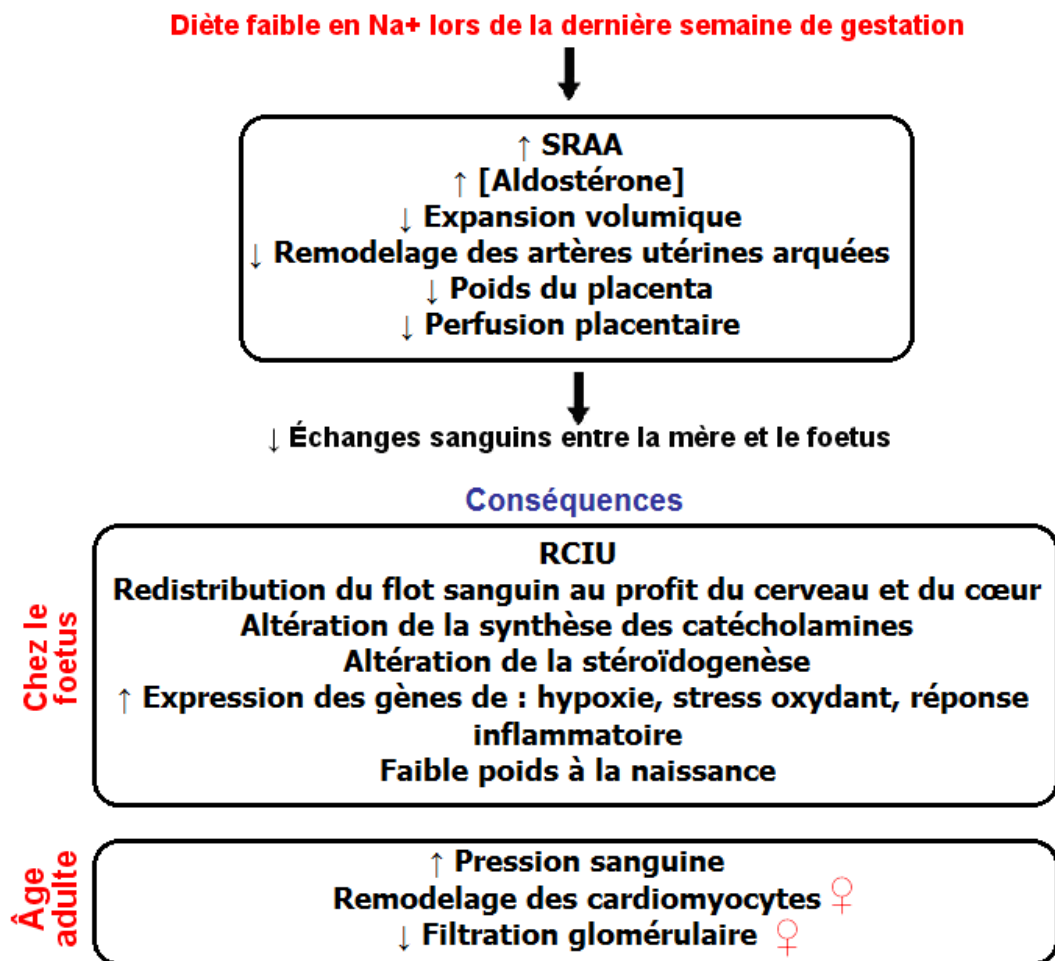
#### **5.4.2 La dysfonction endothéliale**

Chez l'être humain, une baisse de l'expression du transporteur hCAT-1 de la L-arginine et de l'expression de la eNOS (179; 180) a été rapportée dans une expérience sur des cellules endothéliales de la veine ombilicale prélevées et mises en culture (179). Ceci suggère une formation de NO réduite dans les grossesses RCIU (179). De plus, la vasodilatation dépendante de l'endothélium à l'insuline et au peptide relié au gène calcitonine (CGRP) est plus faible dans les artères et veines ombilicales et dans les artères chorioniques provenant de grossesses RCIU (180). À long terme, comme vu dans la section 5.4.1, la dilatation dépendante de l'endothélium de l'artère brachiale mesurée à l'aide d'une technique non invasive est plus faible chez les êtres humains nés avec une RCIU (173; 181).

On observe chez la descendance mâle de rates ayant reçu 50% de la diète normale pendant la gestation, une baisse de l'expression génique de la eNOS et une baisse de son activité (mesurée par la conversion de  $^3\text{H-L-arginine}$  en  $^3\text{H-L-citrulline}$ ) (182). Chez des rats issus de mères exposées à un milieu hypoxique (11.5% d' $\text{O}_2$ ) lors de la dernière semaine de gestation, la vasodilatation induite par un flux de solution physiologique généré par des

pompes péristaltiques et mimant le flux sanguin *in vivo* est plus faible à 12 semaines dans les artères mésentériques que chez les rats témoins (183). La dilatation à l'acétylcholine (ACh) est réduite dans l'artère mésentérique à 1 an chez la descendance femelle de rates ayant reçu une diète faible en protéines (6%) tout au long de la gestation (184), ainsi qu'à 4, 8 et 12 semaines dans les aortes de la descendance mâle d'un modèle d'insuffisance placentaire (185).

La RCIU est donc associée à une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium et à une réduction de l'activité de la eNOS autant dans le placenta que chez la descendance (186). Les mécanismes à l'origine de cette association restent méconnus.



**Figure 4.** Résumé des conséquences de l'administration d'une diète faible en sodium (Na<sup>+</sup>) lors de la dernière semaine de gestation chez le rat.

SRAA : Système rénine-angiotensine-aldostérone; ♀ changements chez la femelle seulement.

Le premier rectangle résume les changements maternels, alors que les deuxième et troisième rectangles décrivent les conséquences chez la progéniture à l'âge fœtal et à l'âge adulte. Les comparaisons se font avec le groupe témoin ayant eu une croissance intra-utérine normale.

## **6. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS**

Tel que nous venons de le décrire, il existe une différence entre les sexes au niveau cardiovasculaire et l'environnement fœtal a des conséquences à long terme. Afin de mieux comprendre les liens entre le sexe biologique, l'environnement fœtal, l'âge et l'hypertension, nous avons étudié la réactivité aortique dans le modèle RCIU.

Ainsi, nous émettons l'hypothèse que l'environnement fœtal et l'âge affectent la réactivité aortique et ce, de façon spécifique au sexe biologique.

Nos objectifs spécifiques sont :

- Étudier l'effet de l'âge, du sexe et de l'environnement fœtal sur la réactivité vasculaire aortique en utilisant des rats mâles et femelles RCIU et témoins à 5, 12 et 20 semaines de vie.
- Étudier l'effet du sexe sur la rigidité aortique en utilisant des rats mâles et femelles témoins entre 13 et 17 semaines de vie.

## **II. ARTICLE**

## **Influence of age, sex and intrauterine growth restriction on aortic vascular reactivity in rats**

Y. Ennehas, B Sicotte and M. Brochu

*Department of Physiology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada*

**Abstract.** Men are more vulnerable to cardiovascular diseases than premenopausal women. Epidemiological and studies with animal model demonstrated an association between intrauterine growth restriction and the development of cardiovascular diseases at an adult age. Therefore, we hypothesized that vascular reactivity, in response to vasoactive agents, is different between males and females and affected by intrauterine growth restriction. The aim of the current study was to measure the effect of sex, foetal environment and age on contraction and relaxation of rat aortic rings. Response to phenylephrine (PE) with or without L-NAME, to carbachol (Cbc) or to sodium nitroprusside (SNP) were measured in thoracic aortic rings from control or intrauterine growth restricted (IUGR) male and female rats aged 5, 12 and 20 weeks. In male rats only, maximal contraction to PE in absence or presence of L-Name was increased at 20 weeks in controls but earlier at 12 weeks in IUGR. Maximal contraction was similar in all female groups and was increased in presence of L-Name at 12 and 20 weeks of age. The effect of L-Name was stronger in females than in males. Maximal dilation in response to Cbc was reduced in IUGR rats and in male rats. However, no difference was observed in response to SNP. Together, these data demonstrate that the effect of age and uterine environment on vascular reactivity is sex-specific.

## **Introduction**

Many studies reported that cardiovascular diseases are more frequent in men than in premenopausal women (13; 29). These observations lead to conclude that estrogens could be cardioprotective. Indeed, in cultured ovine fetal pulmonary artery endothelial cells, oestrogens upregulate endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression (17) and activity (4) thus producing NO that is vasorelaxant. Moreover, in cultured human saphenous veins smooth muscle cells, oestrogens inhibit smooth muscle cell migration and proliferation (6). Dilation in response to sodium nitroprusside was greater in thoracic aortic rings from female spontaneously hypertensive rats (SHR) than from males (14). This suggests that female vascular smooth muscle cells are more sensitive to NO independently of its production by endothelium. Using isolated and cultured aortic smooth muscle cells, it was observed that migration of those from WKY and SHR male rats are faster than the ones from females, and that the doubling time and cell cycle were shorter, especially in SHR males (1). Taken together, these studies showed that cardiovascular system regulation is sex-specific.

Since the 1990s, many epidemiological, clinical and experimental studies have linked intrauterine growth restriction (IUGR) and adverse prenatal events to the increased risk of cardiovascular disease in adult life (9; 18; 31). In a rat model of IUGR induced by maternal undernutrition, hypertension was present in both male and female offspring, but was more severe in male rats (11). It was also demonstrated that the activity of eNOS in aorta isolated from both male and female rats of this model was decreased but diminished gene expression of this enzyme was present only in tissues from male rats (11). This suggests that intrauterine environment alters endothelium-dependent responses in aortas in adulthood differently in males and females.

Endothelial dysfunction is characterized by reduced nitric oxide bioavailability and increased pro-inflammatory and pro-thrombotic state (23) and has been associated with most cardiovascular diseases such as hypertension (19), atherosclerosis (8), chronic heart failure (15; 30) and chronic renal failure (3). Endothelial dysfunction has been reported in adult rats (10-12) and children who suffered of IUGR (10; 16).

In order to better understand the role of the fetal environment on cardiovascular disease, our laboratory developed a model in which a low-sodium diet is given to pregnant rats for the last 7 days of gestation. This leads to reduced maternal plasma volume expansion and



fetal growth restriction. The offspring rats exhibit higher systolic blood pressure, higher activity of the renin–angiotensin–aldosterone system and renal dysfunction as adults (2).

Our hypothesis is that vascular reactivity, in response to vasoactive agents, is different between males and females and affected by intrauterine growth restriction. The aim of the current study was to measure the effect of sex, foetal environment and age on contraction and relaxation of rat aortic rings. Phenylephrine was used in order to allow contraction in the presence or absence of L-Name, an eNOS blocker. The vasodilatation was obtained by using carbamylcholine chloride, an acetylcholine analogue, which stimulates the endothelium to produce NO. Sodium nitroprusside, which is a NO donor, was used to evaluation the endothelium-independant relaxation..

## **Materials and Methods**

### **Animals**

This study was approved by the local Animal Care Committee, which is accredited by the Canadian Council on Animal Care. Male and Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, Saint-Constant, QC, Canada) were used. Control rats ( $n=41$ ) were the male and female offspring of dams maintained on a normal diet containing 0.2% sodium (basal diet 5755; PMI Feed, Ren's Feed and Supplies, Oakville, Ontario, Canada) and tap water. The experimental animals who suffered of intrauterine growth restriction (IUGR) ( $n=35$ ) were the offspring of dams placed on a 0.03% sodium diet (low-sodium diet 5881; PMI Feed) and demineralized water for the last week of gestation (26). After birth, all offspring received normal rat chow (0.2% sodium) and tap water. At 5, 12 and 20 weeks of age, animals were killed by decapitation (at 9.00–9.30 AM) after isoflurane anesthesia (4% in O<sub>2</sub>) for 5 minutes. Thoracic aorta was removed and immersed in cold Krebs-bicarbonate solution (KBS) for *in vitro* assays.

### **Organ bath assays**

Vascular reactivity was measured, as described previously (22) in thoracic aortic rings of 5, 12 and 20 week-old male and female control and IUGR rats. Thoracic aorta was cleaned of fat

and extraneous tissues, and cut into eight consecutive rings (2–3 mm), taking special care to avoid endothelium damage.

The rings were mounted in individually jacketed tissue baths (15 ml; Radnotti Glass, Monrovia, CA), maintained at 37°C, and equilibrated for 1 h under 2.0 g passive tension with frequent washing and tension adjustment. The tissues were bathed in KBS of the following composition (in mM): 118 NaCl, 4.65 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.18 MgSO<sub>4</sub>, and 5.55 dextrose. The solution was bubbled with a mixture of 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>; pH was 7.4. After 1 h equilibration, tissues were challenged with 10<sup>-6</sup> M phenylephrine (PhE). At plateau response, 10<sup>-4</sup> M carbachol (Cbc) was added to confirm endothelium presence. Tension was measured by force displacement transducers (Kent Scientific Corporation) and recorded on a computerized data-acquisition system (WinDaq Pro DI-720).

After return to baseline (~60 min), with frequent washing, cumulative concentration-response curves to PE (10<sup>-11</sup> to 10<sup>-6</sup> M for 5 week-old rats and 10<sup>-11</sup> to 10<sup>-4</sup> M for 12 and 20-week old rats) were obtained in four baths and to Cbc (10<sup>-8</sup> to 10<sup>-4</sup> M) after stimulation with 10<sup>-6</sup> M PE in four other baths. Then, after frequent washings and return to baseline (~60 min), in order to determine if NO is produced in opposition to the contraction induced by PE, four rings from each animal were pre-incubated with 1.0 μM L-Name added 10 min before initiating the curve to PE (10<sup>-11</sup> to 10<sup>-6</sup> M for 5 week-old rats and 10<sup>-11</sup> to 10<sup>-4</sup> M for 12 and 20-week old rats). The four other rings were challenged with 10<sup>-7</sup> M phenylephrine PE and a cumulative concentration-response curve to sodium nitroprusside (SNP) (10<sup>-11</sup> to 3\*10<sup>-7</sup> M) was obtained.

### **Statistical analysis**

Each concentration-response curve was analyzed by computer fitting to a four-parameter logistic equation with the Prism 5.0 program (GraphPad Software, San Diego, CA) to evaluate the maximum response ( $E_{max}$ ) and the sensitivity corresponding to the concentration producing 50% of  $E_{max}$  (EC<sub>50</sub>). The relaxation is represented by the response to Cbc or SNP in percentage of initial contraction to PE (10<sup>-7</sup> M). Data are expressed as means ± SEM experimental points along the best curve fitted to these points. In the figure legends,  $n$  is the number of animals used in each group. The statistical analysis has been done while considering the different factors (age, sex and IUGR) and interactions between them by the General Linear Model

Univariate Analysis procedure (SPSS Statistics 16; IBM Company, Chicago, IL, USA). In the experiments with phenylephrine, there are four factors : L-Name, IUGR, sex and age. In the other experiments, there are three factors : IUGR, sex and age. When significant interactions were found, they were analyzed separately for sex, age or foetal environment. Pairwise comparisons were thus performed, followed by the Tukey's HSD (honestly significant difference) test when needed. Statistical significance was assumed when the difference reached the probability level of 5% ( $P < 0.05$ ).

### **Drugs and chemicals.**

PhE, Cbc and L-Name were purchased from Sigma (St. Louis, MO). SNP was obtained from Fisher Scientific Company (Fair Lawn, NJ). Components of the KBS solution were obtained from Tyco (Phillipsburg, NJ), EM science (Gibbstown, NJ), Fisher Scientific Company (Fair Lawn, NJ) and Sigma (St-Louis, MO).

## **Results**

### **Effect of age, sex and uterine environment on contraction**

Maximal contraction of aortic rings from male rats in response to PE increases with age in both groups (Fig. 1A and 1B, Table I). However, in the IUGR males, maximal response was already reached at 12 weeks of age. Maximal contraction in response to PE was increased in presence of L-Name (illustrated in insets, Fig. 1) at 20 weeks in control males and at 12 and 20 weeks in IUGR rats, suggesting that NO production in response to PE is present earlier in aortic rings of IUGR than of control male rats. Sensitivity to PE decreases after puberty in both groups (between 5 and 12 weeks of age, Fig. 1A and 1B, Table I).

Contrary to the males, neither the age nor the foetal environment affect the contractile response to PE in aortic rings from females (Fig. 1C and Fig 1.D, Table I). However, the effect of L-Name is more important in 12 week-old and 20 week-old control and IUGR females than in males (Fig. 1C and 1D vs 1A and 1B, Table I). Aortic rings from 20 week-old control males depict higher maximal contraction than females of the same age (Fig 1A and Fig 1C) while in IUGR animals, 12 and 20 week-old IUGR males have a higher maximal contraction than

females of the same age (Fig. 1B and 1D). As in males, sensitivity to PE decreases after puberty (Fig. 1C and 1D).

### **Effect of age, sex and uterine environment on relaxation**

In both sexes, maximal relaxation in response to Cbc is not affected by age but is decreased in IUGR animals compared to controls (Fig. 2B and 2D). Females have a higher maximal relaxation to Cbc than males (Table I). Sensitivity to Cbc increases after puberty in all groups (Table I).

Maximal relaxation to SNP is not affected neither by age, sex nor foetal environment (Fig. 3). However, sensitivity to SNP increases with age (Table I).

### **Discussion**

This study was conducted to determine the impact of sex, age and IUGR on vascular reactivity of aorta. We have shown 1) a higher maximal contractile response to PE in male rats compared to females 2) an increased contractile response to PE with age in male rats appearing at a younger age in IUGR 3) the importance of the production of NO in 12- and 20-week-old female controls as suggested by the contractile response to PE in presence of L-Name and by the maximal response to Cbc.

Maximal contraction in response to PE is dependent of sex. Indeed, in males but not in females, maximal contraction to PE increased with age. Moreover, the response was higher in males at 12 and 20 weeks for IUGR groups and at 20 weeks for the control ones in comparison with females of the same group and the same age. Increase of maximal contraction to PE in presence of L-Name was higher in females than in males. This suggests that eNOS may be more important in females. However, L-Name and L-Arginine analogues could also inhibit other pathways of vasorelaxation than eNOS. Indeed, L-NMMA (NG-Monomethyl L-arginine) inhibits the vasodilation induced in aortic rings from rats by amiloride and dibutyryl cyclic AMP that cause an endothelium-independent relaxation (28). Furthermore, L-Name inhibits  $Mg^{2+}$ -induced relaxation in the absence of endothelium in rings from aorta and pulmonary artery of 3 month-old rats (7). In the present study, maximal relaxation to Cbc was higher in females than in males and no effect was observed with SNP, suggesting that the

production of NO and not the sensitivity to NO is higher in females than in males. This sex-difference is in agreement with previous studies using 4 and 5 months-old Sprague-Dawley rats in which the contractile response to PE of endothelium-intact aortic rings from male was significantly stronger than the response of females (25). They also showed that contraction of rings from which the endothelium was removed was significantly stronger than contraction of intact rings from both male and female rats and that the difference of maximal contraction between denuded and intact vessels was more pronounced in female than in male rats (25). Combined with our results, this suggests that the contribution of endothelial NO is more important in females.

Maximal contraction in response to PE is dependent of uterine environment. In fact, we observed an increased maximal contraction to PE in 12 week-old IUGR male rats, suggesting a long-term effect of adverse uterine environment on vascular reactivity. This is in accordance with previous studies in a model of reduced uteroplacental perfusion (23). Indeed, maximal contraction to PE of endothelium-intact aortic strips was increased in IUGR compared to control rats at 4, 8 and 12 weeks of age (20). We did not observe any difference at the age of 5 weeks and this is probably due to the different growth restriction model and the use of rings instead of strips. The higher maximal contraction to PE observed in 12 week-old IUGR male rats compared to their aged-matched controls could be explained by an alteration of the NO pathway. In fact, as shown in Figure 2, maximal relaxation to Cbc is decreased in aortic rings from IUGR rats. This is in accordance with findings in a model of IUGR induced by placental insufficiency where relaxation to acetylcholine was diminished in aortic strips of IUGR offspring (21).

In conclusion, this study had shown that fetal environment has sex-specific effects on vascular reactivity and this occurs after puberty in this animal model.

### **Figures' legend.**

**Figure 1.** Dose-response curve of aortic rings to phenylephrine (PE) without L-Name, in male and females rats, control and IUGR, 5, 12 and 20 week-old. The inset represents  $\Delta E_{max}$ , which corresponds to the difference between  $E_{max}$  in presence of L-Name and  $E_{max}$  in absence of L-Name. Panel A : Control Males, Panel B : IUGR Males, Panel C : Control females, Panel D : IUGR females. n=23 for male controls, n=15 for male IUGR, n=18 for female control and n=18 for female IUGR. n represents the number of aortas used.

**Figure 2.** Dose-response curve of aortic rings in response to carbamylcholine chloride (carbachol or Cbc), in male and females rats, control and IUGR, 5, 12 and 20 week-old. Panel A : Control males, Panel B : IUGR males, Panel C : control females, Panel D : IUGR females. n=21 for male controls, n=16 for male IUGR, n=18 for female control and n=19 for female IUGR. n represents the number of aortas used.

The maximal relaxation is calculated as a percentage of phenylephrine-induced contraction.

**Figure 3.** Dose-response curve of aortic rings in response to sodium nitroprusside (SNP), in male and females rats, control and IUGR, 5, 12 and 20 week-old. Panel A : Control males, Panel B : IUGR males, Panel C : control females, Panel D : IUGR females. n=20 for male controls, n=16 for male IUGR, n=18 for female control and n=19 for female IUGR. n represents the number of aortas used. The maximal relaxation is calculated as a percentage of phenylephrine-induced contraction.

## References

1. **Bacakova L and Kunes J.** Gender differences in growth of vascular smooth muscle cells isolated from hypertensive and normotensive rats. *Clin Exp Hypertens* 22: 33-44, 2000.
2. **Battista MC, Oligny LL, St-Louis J and Brochu M.** Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E124-E131, 2002.
3. **Bolton CH, Downs LG, Victory JG, Dwight JF, Tomson CR, Mackness MI and Pinkney JH.** Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 16: 1189-1197, 2001.
4. **Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME and Shaul PW.** Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103: 401-406, 1999.
5. **Cozma A, Orasan O, Sampelean D, Fodor A, Vlad C, Negrean V, Rednic N and Zdrenghia D.** Endothelial dysfunction in metabolic syndrome. *Rom J Intern Med* 47: 133-140, 2009.
6. **Dai-Do D, Espinosa E, Liu G, Rabelink TJ, Julmy F, Yang Z, Mahler F and Luscher TF.** 17 beta-estradiol inhibits proliferation and migration of human vascular smooth muscle cells: similar effects in cells from postmenopausal females and in males. *Cardiovasc Res* 32: 980-985, 1996.

7. **Das R, Kravtsov GM, Ballard HJ and Kwan CY.** L-NAME inhibits Mg(2+)-induced rat aortic relaxation in the absence of endothelium. *Br J Pharmacol* 128: 493-499, 1999.
8. **Davignon J and Ganz P.** Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109: III27-III32, 2004.
9. **Demicheva E and Crispi F.** Long-Term Follow-Up of Intrauterine Growth Restriction: Cardiovascular Disorders. *Fetal Diagn Ther* 2013.
10. **Franco MC, Christofalo DM, Sawaya AL, Ajzen SA and Sesso R.** Effects of low birth weight in 8- to 13-year-old children: implications in endothelial function and uric acid levels. *Hypertension* 48: 45-50, 2006.
11. **Franco MC, Arruda RM, Dantas AP, Kawamoto EM, Fortes ZB, Scavone C, Carvalho MH, Tostes RC and Nigro D.** Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. *Cardiovasc Res* 56: 145-153, 2002.
12. Grandvuillemin I, Ligi I, Buffat C., Boubred F, Dignat-George F, and Simeoni U. Early Endothelium-Dependent Vasodilatory Dysfunction Innormotensive, Intra-Uterine Growth Restricted Rats is Restored by L-Arginine and Inhibition of Arginases. *Pediatr.Res* 68, 204. 2010.
13. **Guo X, Lu X, Ren H, Levin ER and Kassab GS.** Estrogen modulates the mechanical homeostasis of mouse arterial vessels through nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1788-H1797, 2006.



14. **Kahonen M, Tolvanen JP, Sallinen K, Wu X and Porsti I.** Influence of gender on control of arterial tone in experimental hypertension. *Am J Physiol* 275: H15-H22, 1998.
15. **Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, Williams RE and Heifetz SM.** Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation* 84: 1589-1596, 1991.
16. **Leeson CP, Whincup PH, Cook DG, Donald AE, Papacosta O, Lucas A and Deanfield JE.** Flow-mediated dilation in 9- to 11-year-old children: the influence of intrauterine and childhood factors. *Circulation* 96: 2233-2238, 1997.
17. **MacRitchie AN, Jun SS, Chen Z, German Z, Yuhanna IS, Sherman TS and Shaul PW.** Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circ Res* 81: 355-362, 1997.
18. **Mumdzhev H and Slancheva B.** [Intrauterine hypotrophy and programming the health status. Late problems in newborns with intrauterine hypotrophy]. *Akush Ginekol (Sofia)* 52: 40-47, 2013.
19. **Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr. and Epstein SE.** Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 323: 22-27, 1990.
20. **Payne JA, Alexander BT and Khalil RA.** Reduced endothelial vascular relaxation in growth-restricted offspring of pregnant rats with reduced uterine perfusion. *Hypertension* 42: 768-774, 2003.

21. **Payne JA, Alexander BT and Khalil RA.** Decreased endothelium-dependent NO-cGMP vascular relaxation and hypertension in growth-restricted rats on a high-salt diet. *Hypertension* 43: 420-427, 2004.
22. **Provencher M, Houde V, Brochu M and St-Louis J.** Mineralocorticoids participate in the reduced vascular reactivity of pregnant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H1195-H1201, 2012.
23. **Raij L.** Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 8: 30-39, 2006.
24. **Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan ML, Valentini U, Cimino A, Girelli A, Rodella L, Bianchi R, Sleiman I and Rosei EA.** Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 103: 1238-1244, 2001.
25. **Robert R, Chagneau-Derrode C, Carretier M, Mauco G and Silvain C.** Gender differences in vascular reactivity of aortas from rats with and without portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol* 20: 890-894, 2005.
26. **Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J and Brochu M.** Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 180: 608-613, 1999.
27. **Skilton MR, Gosby AK, Wu BJ, Ho LM, Stocker R, Caterson ID and Celermajer DS.** Maternal undernutrition reduces aortic wall thickness and elastin content in offspring rats without altering endothelial function. *Clin Sci (Lond)* 111: 281-287, 2006.

28. **Thomas G and Ramwell PW.** Interaction of non-arginine compounds with the endothelium-derived relaxing factor inhibitor, NG-monomethyl L-arginine. *J Pharmacol Exp Ther* 260: 676-679, 1992.
29. **Thompson J and Khalil RA.** Gender differences in the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30: 1-15, 2003.
30. **Treasure CB, Vita JA, Cox DA, Fish RD, Gordon JB, Mudge GH, Colucci WS, Sutton MG, Selwyn AP, Alexander RW and .** Endothelium-dependent dilation of the coronary microvasculature is impaired in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 81: 772-779, 1990.
31. **Visentin S, Grisan E, Zanardo V, Bertin M, Veronese E, Cavallin F, Ambrosini G, Trevisanuto D and Cosmi E.** Developmental programming of cardiovascular risk in intrauterine growth-restricted twin fetuses according to aortic intima thickness. *J Ultrasound Med* 32: 279-284, 2013.

Figure 1

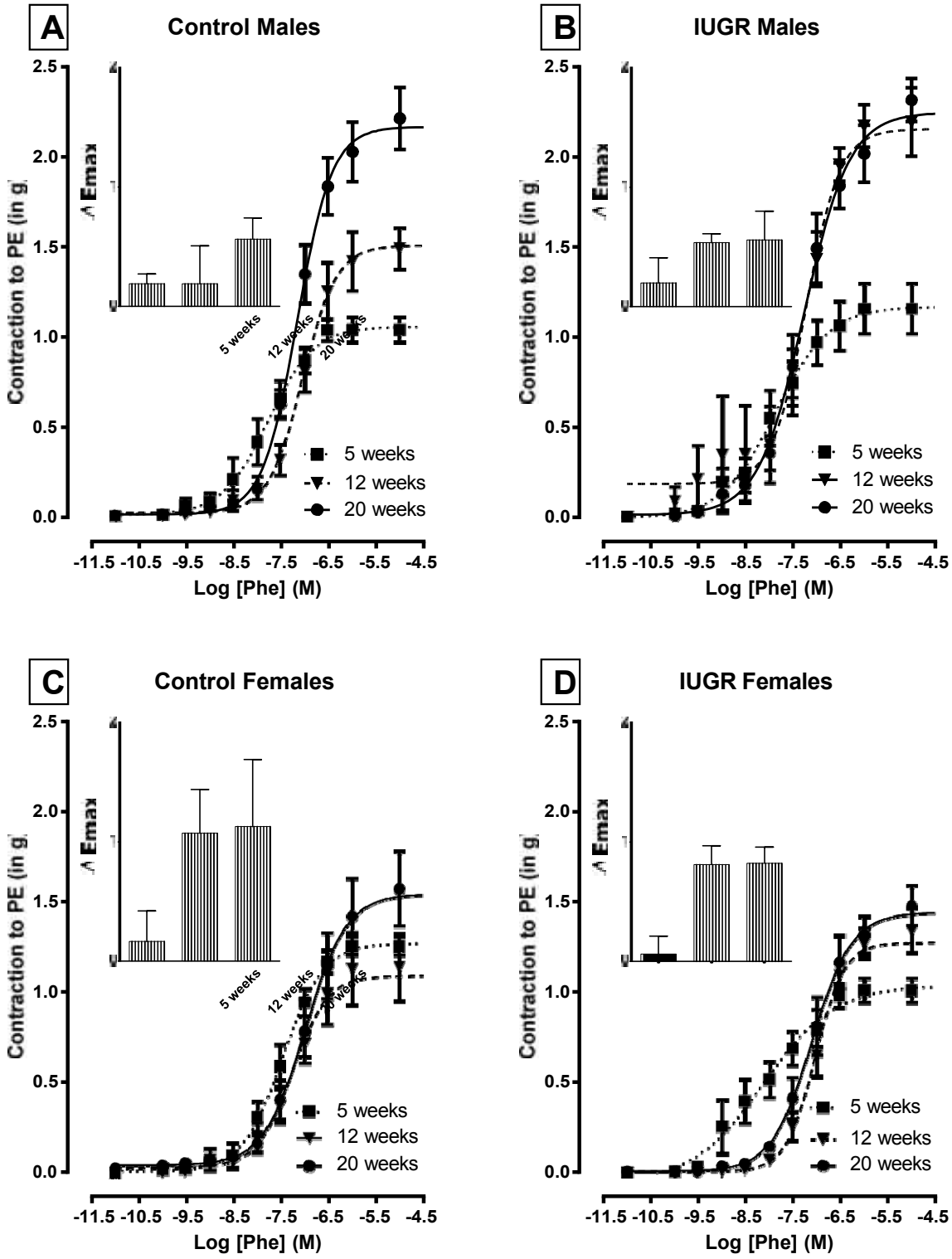


Figure 2

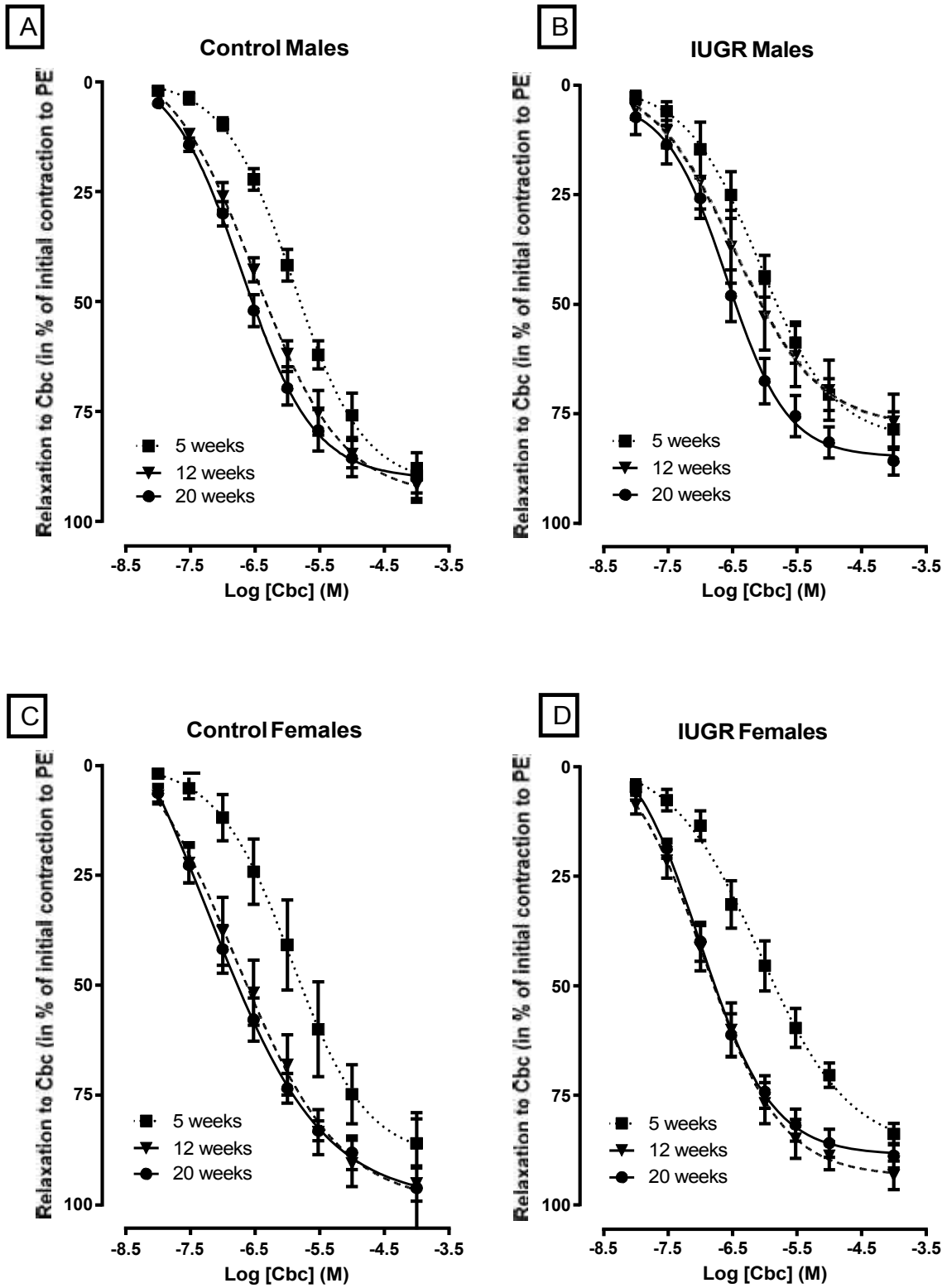
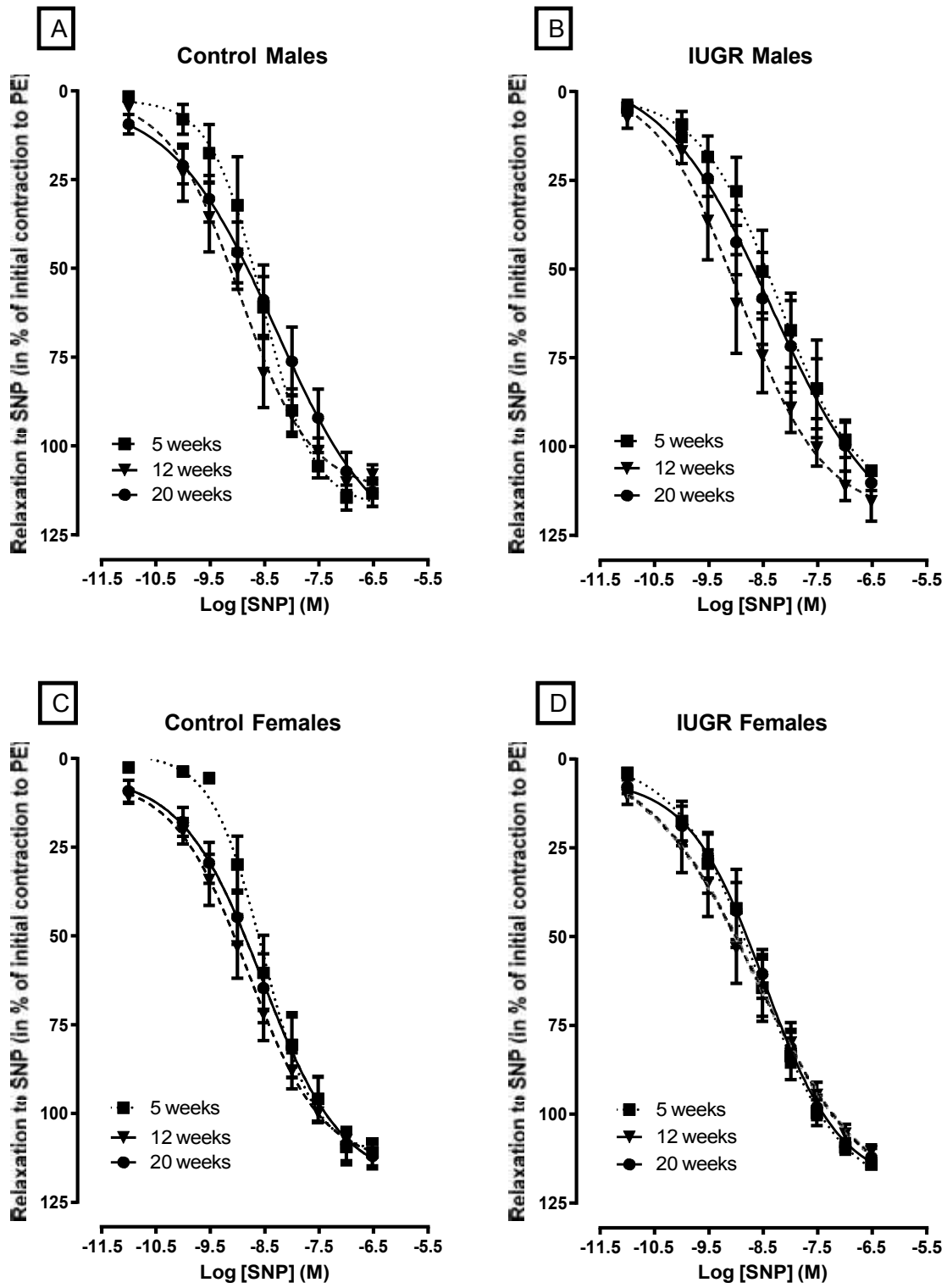


Figure 3



**Table 1**

Table 1. Effects of IUGR, age and sex: Statistical analysis

General Linear Model Univariate Analysis of Variance								
	IUGR effect	Age effect	Sex effect	L-Name effect	IUGR and Age interaction	IUGR and sex interaction	Age and sex interaction	Interaction between the three factors (IUGR, Age and Sex)
E <sub>max</sub> PE	---	↑ ***	↑ **	↑ ***	↑ **	↑ **	↑ **	---
EC <sub>50</sub> PE	---	↓ ***	---	↑ ***	---	---	---	---
E <sub>max</sub> Cbc	↓ **	---	↓ *	NA	---	---	---	---
EC <sub>50</sub> Cbc	---	↑ ***	---	NA	---	---	---	---
E <sub>max</sub> SNP	---	---	---	NA	---	---	---	---
EC <sub>50</sub> SNP	---	↑ *	---	NA	---	---	---	---

Analysis was done by the General Linear Model Univariate Analysis procedure. Dose-response curves to PE, Cbc and SNP were compared between groups. L-Name effect on contraction to PE was also analyzed.

Sex Effect : Male rats vs Female rats

Age Effect : 20 weeks and 12 weeks vs 5 weeks

\*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001

NA : Non Applicable

### **III. EXPÉRIENCE SUPPLÉMENTAIRE**



## 1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des rats Sprague-Dawley mâles (n=5) et femelles (n=5) âgés entre 13 et 17 semaines<sup>1</sup> ont été anesthésiés par inhalation à l'isoflurane (4% dans de l'oxygène pendant 5 minutes) et sacrifiés par décapitation. L'aorte thoracique a été rapidement prélevée et placée dans une solution physiologique Krebs bicarbonate (KBS) contenant (en mM) 118 NaCl, 1,18 MgSO<sub>4</sub>, 1,18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 4,65 KCL, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 5,55 dextrose et aérée avec un mélange de 95% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub>. L'aorte, débarrassée du tissu conjonctif et du gras, a été ensuite coupée en 8 anneaux de 2 à 3 mm, délicatement afin de ne pas endommager l'endothélium.

**Bain à organe isolé pour micro-vaisseaux.** Dans chaque expérience, 8 anneaux de la même aorte ont été utilisés. Les anneaux ont été montés dans des bains individuels (5 ml, Kent Scientific Corporation, Torrington, CT) maintenus à 37°C et contenant du KBS aéré (95% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub>). Le diamètre de chaque anneau a été mesuré puis les anneaux ont été équilibrés pendant 30 minutes sous une tension passive de 2g, avec lavage à toutes les 10 minutes. Après équilibration, la présence de l'endothélium a été confirmée par la relaxation des anneaux au carbachol (10<sup>-4</sup>M) suite à une pré-stimulation à la phényléphrine (10<sup>-6</sup>M). La tension a été mesurée à l'aide de transducteur de force (Kent Scientific Corporation) et enregistrée sur ordinateur à l'aide du logiciel LabChart (AD Instruments).

**Protocole expérimental.** Les anneaux ont alors été lavés puis équilibrés pendant 40 minutes avec lavages à toutes les 10 minutes. Ensuite, la tension a été ramenée à 0g et une courbe des étirements de 200µm effectués à toutes les 3 minutes jusqu'à atteindre une tension de 3g a été enregistrée.

Les changements de tension ont été mesurés à l'aide de transducteurs de force et enregistrés sur ordinateur, comme ci-dessus.

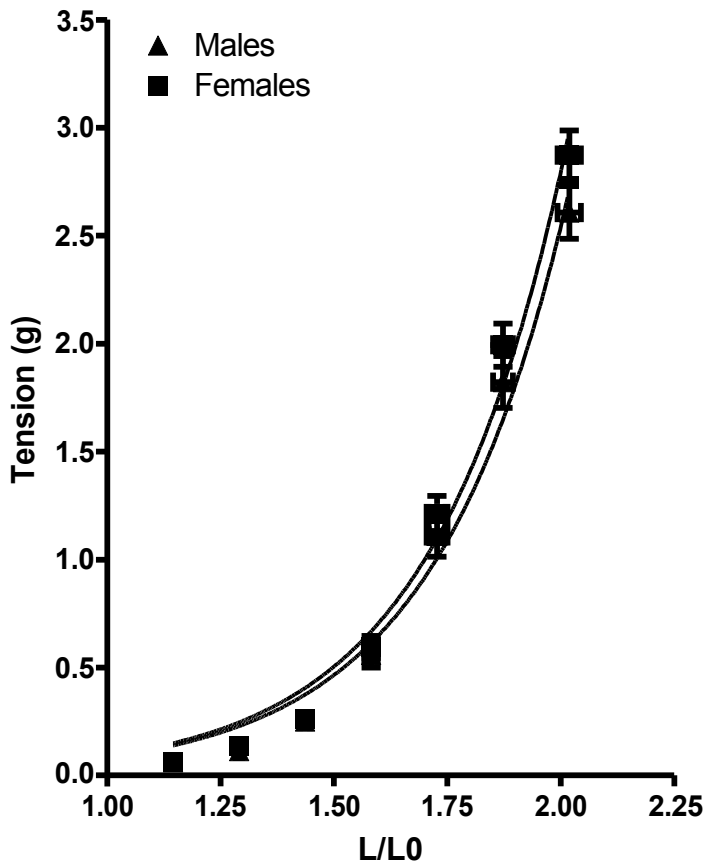
**Analyse de données.** La tension (en grammes) a été mesurée en fonction du rapport entre la circonférence interne (L) pour chaque étirement de 200 µ et la circonférence interne sous tension 0 (L<sub>0</sub>, afin de normaliser): L/L<sub>0</sub>. Les mesures utilisées sont celles prises lors des

---

<sup>1</sup> Cette expérience a été faite afin de déterminer les différences de rigidité artérielle entre de jeunes adultes mâles et femelles.

étirements. La courbe a été construite et analysée en utilisant le logiciel Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA). La comparaison se fait entre mâles et femelles.

## **2. FIGURE**



**Figure 5.** Courbe de la tension (en grammes) en fonction de l'étirement ( $L/L_0$ ).  $n=5$  pour chaque groupe.

### 3. RÉSULTATS

La rigidité artérielle est évaluée en mesurant la tension en fonction de l'étirement et qui est représenté par le rapport entre la circonférence interne et la circonférence interne sans tension  $L/L_0$ . Ce paramètre est la relation longueur-tension (ou longueur-force) (length-tension relationship) qui traduit les propriétés mécaniques et qui sert de mesure pour la rigidité de la paroi vasculaire (250; 251). Les aortes des rats mâles et femelles ont la même rigidité artérielle entre l'âge de 13 et 17 semaines.

## **IV. DISCUSSION**

Nos expériences ont permis de démontrer que la contraction maximale à la Phe est plus grande chez les mâles que chez les femelles, qu'il existe une augmentation de la contraction maximale avec l'âge chez les mâles et qui apparaît plus tôt chez les RCIU, et finalement que le rôle du NO endothélial est plus important chez les femelles à 12 et 20 semaines.

### **L'effet de l'âge**

Nos travaux ont démontré que la réponse contractile à la Phe des anneaux aortiques de rats mâles augmente avec l'âge. Ceci concorde avec des travaux où une augmentation de contraction maximale en réponse à différents agents vasoconstricteurs dont la noradrénaline (NA) et la Phe a été observée dans des bandelettes aortiques de rats mâles de 5 et 50 semaines (206). Toutefois, certains résultats indiquent une baisse de la contraction maximale aortique, notamment à la Phe et à la 5-hydroxytryptamine (5-HT ou sérotonine) chez des rats mâles de 24 mois en comparaison à des rats de 8 à 9 semaines (207). Ces résultats qui peuvent paraître contradictoires proviennent d'étude comparant des rats jeunes à des rats sénescents et beaucoup plus âgés que ceux de nos expériences puisque les rats que nous utilisons ont 5 semaines (pubères), 12 et 20 semaines (adultes). À notre connaissance, aucune étude n'a auparavant comparé la contraction aortique entre des rats pubères et des rats jeunes adultes.

L'endothélium module la réponse à différents agonistes constricteurs, tels que la NA et le 5-HT et une suppression de l'endothélium augmente la réponse contractile (208). On ne peut attribuer l'augmentation de la contraction avec l'âge chez les mâles à une baisse de la fonction de la eNOS, car la relaxation au Cbc n'est pas dépendante de l'âge chez les rats utilisés dans nos expériences. Cette augmentation de la contraction pourrait être due à une modification de l'affinité et de la densité des  $\alpha_1$ -Adrénoccepteurs mais, dans la carotide de rats de 3 et 18 mois, il ne semble pas y avoir de différences de ces paramètres (209). De plus, la sensibilité à la Phe baisse après la puberté (voir Fig. 1 et tableau 1). Puisque nos rats sont jeunes, nous pensons que l'augmentation de la contractilité est due à un effet hormonal qui se met en place après la puberté. En effet, la différenciation des cellules musculaires lisses et leur maturation sont régulées par les hormones, dont la testostérone (210; 211). De plus, la testostérone induirait l'expression des canaux calciques de type L dont le rôle est primordial dans la contraction vasculaire, tel qu'il a été démontré dans les artères coronaires porcines (252). À un âge plus vieux, nos rats auraient peut-être eu une baisse de la contraction

maximale à la Phe comme rapportée dans l'étude de Christ G.J. (207) après le plafonnement de la contraction maximale qui est d'ailleurs visible entre 12 et 20 semaines chez nos rats RCIU.

La contraction maximale à la Phe n'augmente pas avec l'âge chez les femelles. Rappelons que l'endothélium joue un rôle dans la régulation du tonus vasculaire en atténuant la contraction (217; 218). Puisque l'effet du L-Name est plus important chez les femelles comme démontré par nos résultats et ceux de l'étude d'Aloysius U.I. (216), nous croyons qu'entre autres, l'action de la eNOS pourrait être responsable de cette absence d'augmentation de la contraction avec l'âge chez les femelles. Un autre facteur pouvant expliquer cette dernière serait le rôle des œstrogènes dans l'expression des canaux impliqués dans la régulation du tonus vasculaire. Les femelles, grâce aux œstrogènes, exprimeraient, plus que les mâles, l'isoforme  $\alpha$ -2 de la  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ATPase qui participe à l'hyperpolarisation de la cellule (253). Nous pouvons penser que ces mécanismes qui se mettent en place après la puberté peuvent participer à contrecarrer une augmentation de la contractilité chez les femelles.

L'âge n'a pas d'influence sur la relaxation maximale au Cbc dans nos expériences. Pourtant plusieurs études rapportent une baisse de relaxation maximale aux vasodilatateurs dépendants de l'endothélium avec l'âge. C'est ainsi que la relaxation à l'ACh et la relâche du NO baissent entre 5-6 mois, 18-19 mois et 32-33 mois dans des aortes isolées de rats (219). Dans le lit artériel mésentérique de rats de 2, 12 et 22 mois, il y a une baisse de la fonction endothéliale vasodilatatrice au carbachol à 22 mois (220) et à l'ACh entre 14 semaines et 11 mois (221). Cette baisse de la relaxation maximale avec l'âge ne serait pas due à une baisse du nombre de récepteurs (dans ce cas-ci, muscariniques) ou à une baisse de l'affinité du composé pharmacologique pour son récepteur (222), car il y a également une baisse de la relaxation dépendante de l'endothélium à d'autres ligands endogènes tels que l'ATP (221) et l'histamine (223; 224). Elle serait plutôt due à une baisse de la fonction endothéliale (baisse de l'activité de la eNOS (225), de la synthèse de NO (226) et de la libération de NO (226)) ou à une inhibition de l'accès du NO aux cellules musculaires lisses causée par l'épaississement de la néointima avec l'âge (226). Nous pourrions expliquer le fait que la relaxation maximale au Cbc ne baisse pas avec l'âge chez nos rats car ils ne sont pas assez âgés pour développer une dysfonction endothéliale.

### **L'effet du sexe**

La réponse contractile est plus grande chez les mâles en comparaison avec les femelles à 12 et 20 semaines chez les rats RCIU et à 20 semaines chez les rats témoins. Après ajout du L-Name, la différence de la réponse contractile entre les deux sexes chez les témoins à 20 semaines disparaît. Ceci nous amène donc à dire que la différence entre mâles et femelles chez les témoins serait due entre autres à une réponse endothéliale due au NO qui vise à atténuer la contraction chez les femelles. Chez les mâles RCIU de 12 semaines et 20 semaines, la contraction maximale est plus grande en comparaison aux femelles du même âge. Après ajout du L-NAME, cette différence est encore observée même si l'effet du L-Name reste plus fort chez les femelles que chez les mâles, ce qui veut dire que la différence entre mâles et femelles RCIU ne se situe pas uniquement au niveau de la eNOS. Il serait donc bon de vérifier si l'expression de canaux impliqués dans le tonus vasculaire comme cités ci-dessus ou les propriétés structurelles du muscle lisse vasculaire sont différentes entre les mâles et les femelles RCIU. Il a auparavant été démontré que la RCIU a des effets différents sur la réactivité vasculaire selon le sexe (185; 231; 232) mais les mécanismes exacts n'ont pas encore été élucidés.

### **L'effet de la RCIU**

Dans nos expériences, nous avons vu que la RCIU augmente la contraction maximale à la Phe chez les rats mâles de 12 semaines seulement et qu'à 5 et 20 semaines, la contraction maximale ne diffère pas de celle des témoins. L'effet de l'environnement fœtal sur la réactivité vasculaire à la Phe a été proposé auparavant, mais les études proposent des résultats différents selon l'âge des rats. L'environnement fœtal, par exemple, n'a pas d'influence sur la contraction maximale à la Phe à 6 mois chez des rats issus de mères mises sous diète riche en gras, bien que ces rats présentent une rigidité aortique plus élevée que les témoins (235). Ceci concorde avec nos résultats puisqu'en effet, la contraction à la Phe n'est pas significativement différente entre RCIU et témoins à 5 mois (20 semaines) (Voir Fig.1A et 1B). Par contre, un effet de la RCIU à 12 semaines a déjà été démontré dans une étude ne séparant pas les mâles des femelles et dans laquelle la contraction à la Phe est plus grande chez le rat RCIU que chez le rat témoin (185).

L'effet de la RCIU sur la contractilité suggère qu'il y aurait des changements structurels des cellules musculaires aortiques qui ont lieu plus tôt chez les rats RCIU et qui affectent la réponse contractile. Ces changements auraient lieu après 5 semaines de vie ex-utéro chez les rats RCIU, et après 12 semaines chez les rats contrôles. Chez les rats témoins, ce serait une maturation normale qui se fait avec l'âge, alors que chez les rats RCIU, elle serait précoce. La RCIU est associée à des changements structurels de la matrice extracellulaire. Par exemple, des rats de 2 mois issus de mères ayant été exposées à 50% de la diète normale présentent une augmentation significative de collagène (236). Chez des rats mâles de 10 semaines normotendus issus de mères ayant reçu une diète faible en protéines, l'expression de collagène I dans l'aorte est significativement plus grande que chez les rats témoins du même âge (238). Or, il a été démontré qu'une augmentation du collagène renforçait la contractilité des cellules musculaires lisses pulmonaires (254) et que des changements dans la matrice extracellulaire pouvaient influencer la contractilité des cellules musculaires lisses (255). Il a été démontré que chez des cochons d'Inde ayant subi une RCIU provoquée par une insuffisance placentaire, le taux de chaînes lourdes de myosine (MHC) a augmenté par rapport aux cochons d'Inde ayant eu une croissance intra-utérine normale (256). Or, la MHC joue un grand rôle dans la réactivité vasculaire et des mutations de celle-ci altèrent la réponse contractile aortique chez des souris (257). On pourrait donc penser que de tels changements dans l'appareil contractile des cellules musculaires lisses pourraient être responsables d'une augmentation de la contraction maximale chez des rats RCIU. Il a également été démontré que les rats ayant subi une RCIU auraient des vaisseaux plus rigides que ceux des rats ayant eu une croissance intra-utérine normale et que ceci affecte leur réactivité vasculaire (237). Les mécanismes impliqués ne sont toutefois pas connus.

L'augmentation de la contraction maximale à la Phe chez les mâles RCIU pourrait également être expliquée par une altération endothéliale et ceci est justifié par nos résultats au Cbc puisque la relaxation maximale au Cbc est plus faible chez les rats RCIU. La RCIU altérerait donc la relaxation maximale dépendante de l'endothélium, et ceci a été démontré dans plusieurs études dans lesquelles la relaxation maximale à l'acétylcholine (ACh) a été mesurée. L'ACh et le Cbc agissent tous les deux sur des récepteurs muscariniques sur l'endothélium et permettent l'activation de la eNOS et donc la production de NO. Il a été démontré dans deux études différentes sur des rats mâles de 5 à 6 semaines dont les mères ont



subi une diète faible en protéines que la RCIU baisse la relaxation maximale à l'ACh (231; 232). De même, il a été démontré que chez les rats RCIU de 6 mois, le volume des cellules endothéliales est plus petit et la relaxation endothélium dépendante à l'ACh (235) est plus faible que chez les témoins. Les RCIU présentent donc une baisse de la fonction endothéliale. Il a été démontré, chez des rats de 14 semaines d'un modèle de restriction nutritionnelle, que cette baisse serait due à une baisse de l'expression du gène eNOS chez le mâle seulement, à une baisse de l'activité d'eNOS chez le mâle et la femelle ainsi qu'à une altération de la synthèse de l'œstrogène chez les femelles (182).

L'âge, le sexe et la RCIU n'ont pas d'effet sur la relaxation maximale au SNP. Ceci suggère que l'activité de la guanylate cyclase soluble dans le muscle lisse aortique n'est pas changée. Par contre, la sensibilité de l'aorte au SNP augmente avec l'âge, tout comme chez le cochon d'Inde (239), suggérant ainsi une maturation des mécanismes intracellulaires induisant la réponse au SNP dont la guanylate cyclase soluble et le cGMP. Les différences observées au niveau de la contraction à la Phe et de la relaxation au Cbc ne seraient donc pas dues à la sensibilité du muscle lisse au NO.

En conclusion, nous avons pu démontrer que l'environnement foetal affecte la fonction endothéliale mais a un effet spécifique au sexe masculin sur la contractilité et qui se met en place après la puberté. De plus, les différences de contractilité sont observées entre mâles et femelles et seraient principalement dus à une différence de la fonction endothéliale.

### **Limites et perspectives**

La grande limite de cette étude réside dans le fait que le nombre d'aortes utilisées n'est pas grand. En effet, l'accouplement des rats, la gestation et la croissance des rats prennent du temps et l'espace alloué à l'animalerie n'est pas assez suffisant pour abriter beaucoup d'animaux. De plus, les anneaux aortiques qui ne relaxaient pas assez bien<sup>2</sup> ont été supprimés de l'analyse statistique alors qu'il est possible que certains vaisseaux aient un endothélium

---

<sup>2</sup> Il y a eu rejet des courbes de réponse au Cbc et à la Phe lorsqu'en testant la présence de l'endothélium, la relaxation au Cbc représente moins de 50% de la réponse initiale de la Phe.

constitutivement dysfonctionnel. Finalement, afin d'avoir plus de données statistiques significativement différentes, il aurait fallu prendre, en plus des rats utilisés, des rats âgés de plus de 20 semaines.

Notre étude a démontré que la RCIU a un effet seulement chez les mâles à 12 semaines et que la contraction maximale n'augmente avec l'âge que chez les mâles. De plus, la relaxation dépendante de l'endothélium est baissée par la RCIU et le sexe mâle. Les mécanismes moléculaires et cellulaires restent à être élucidés afin de clarifier le lien entre le sexe, l'environnement foetal et l'âge.

En perspective, il faudrait prendre, entre autres, des rats âgés. La rigidité devrait être mesurée en absence de  $Ca^{2+}$  afin de ne prendre en compte que les éléments élastiques (non myogéniques) de l'artère. La rigidité aortique chez les rats de 5, 12 et 20 semaines ainsi que chez des rats pré-pubères et des rats âgés pourrait être évaluée afin de voir si l'âge a un effet sur la rigidité artérielle, puisque les études à propos de l'effet de l'âge sur celle-ci sont rares et contradictoires. La rigidité devrait également être mesurée chez les rats ayant subi une RCIU à différents âges, mais surtout à 12 semaines pour faire la comparaison entre mâles témoins et RCIU afin de voir si elle est à l'origine de la différence de contraction maximale à la Phe. Afin d'élucider les différences de réactivité entre les différents groupes, nous pourrions aussi mesurer, tout en prenant en compte les différents facteurs, l'expression et la densité des alpha-1-adrénocepteurs (médiators de la réponse à la Phe) et celle des récepteurs muscariniques (médiators de la réponse au Cbc), mais également la densité et l'expression des canaux qui permettent la relaxation et la contraction, tels que les  $CaV$  et les  $BK_{Ca}$ . On pourrait par ailleurs mesurer la fonction de la Na-K-ATPase dans l'aorte entre témoins et RCIU puisque l'on sait qu'elle joue un rôle dans la relaxation du MLV et dans les différences entre mâles et femelles dans la réactivité vasculaire (64; 240; 241). Il serait également intéressant de bloquer l'effet de l'endothélium sur la relaxation au Cbc et au SNP à l'aide du L-Name pour mieux comprendre la contribution de l'endothélium à la relaxation.

## V.    **BIBLIOGRAPHIE**

1. **Martin C., Riou B. and Vallet B.** *Physiologie humaine appliquée*. 2006, p. p. 96-97.
2. **Kierszenbaum A.L.** *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique*. 2006, p. p. 326-327.
3. **Guénard H.** *Physiologie humaine*. 241, 2001,
4. **Akata T.** General anesthetics and vascular smooth muscle: direct actions of general anesthetics on cellular mechanisms regulating vascular tone. *Anesthesiology* 106: 365-391, 2007.
5. **Lacolley Patrick.** *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux*. 2007, p. p. 119-122.
6. **Abraham D. and Handler C.** *Advances in Vascular Medicine*. 2010, p. p. 191-192.
7. **Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ and Cohen RA.** Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368: 850-853, 1994.
8. **Thompson J and Khalil RA.** Gender differences in the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30: 1-15, 2003.
9. **Stefan Offermanns and Walter Rosenthal.** *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. 2008, p. p. 679.
10. **Takamura Y, Shimokawa H, Zhao H, Igarashi H, Egashira K and Takeshita A.** Important role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in shear stress--induced endothelium-dependent relaxations in the rat mesenteric artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 34: 381-387, 1999.
11. **Zhao HY, Liu Q and Chi BR.** [Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in shear stress-induced endothelium-dependent relaxations of rats]. *Yao Xue Xue Bao* 40: 491-495, 2005.

12. **Inokuchi K, Hirooka Y, Shimokawa H, Sakai K, Kishi T, Ito K, Kimura Y and Takeshita A.** Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human forearm circulation. *Hypertension* 42: 919-924, 2003.
13. **Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA and Vanhoutte PM.** Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J Clin Invest* 92: 2867-2871, 1993.
14. **Chen G, Suzuki H and Weston AH.** Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* 95: 1165-1174, 1988.
15. **Ozkan MH and Uma S.** Inhibition of acetylcholine-induced EDHF response by elevated glucose in rat mesenteric artery. *Life Sci* 78: 14-21, 2005.
16. **Andersson DA, Zygmunt PM, Movahed P, Andersson TL and Hogestatt ED.** Effects of inhibitors of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels, inwardly-rectifying potassium channels and Na(+)/K(+) ATPase on EDHF relaxations in the rat hepatic artery. *Br J Pharmacol* 129: 1490-1496, 2000.
17. **Petersson J, Zygmunt PM and Hogestatt ED.** Characterization of the potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 120: 1344-1350, 1997.
18. **Zygmunt PM, Edwards G, Weston AH, Larsson B and Hogestatt ED.** Involvement of voltage-dependent potassium channels in the EDHF-mediated relaxation of rat hepatic artery. *Br J Pharmacol* 121: 141-149, 1997.
19. **Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ and Weston AH.** K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396: 269-272, 1998.
20. **Komori K and Vanhoutte PM.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Blood Vessels* 27: 238-245, 1990.
21. **Knot HJ, Zimmermann PA and Nelson MT.** Extracellular K<sup>(+)</sup>-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K<sup>(+)</sup> channels. *J Physiol* 492 ( Pt 2): 419-430, 1996.

22. **Quignard JF, Feletou M, Thollon C, Vilaine JP, Duhault J and Vanhoutte PM.** Potassium ions and endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig carotid and porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 127: 27-34, 1999.
23. **Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I and Busse R.** Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 401: 493-497, 1999.
24. **Bolz SS, Fisslthaler B, Pieperhoff S, De WC, Fleming I, Busse R and Pohl U.** Antisense oligonucleotides against cytochrome P450 2C8 attenuate EDHF-mediated Ca(2+) changes and dilation in isolated resistance arteries. *FASEB J* 14: 255-260, 2000.
25. **Hingorani AD, Cross J, Kharbanda RK, Mullen MJ, Bhagat K, Taylor M, Donald AE, Palacios M, Griffin GE, Deanfield JE, MacAllister RJ and Vallance P.** Acute systemic inflammation impairs endothelium-dependent dilatation in humans. *Circulation* 102: 994-999, 2000.
26. **Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr. and Epstein SE.** Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 323: 22-27, 1990.
27. **Davignon J and Ganz P.** Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109: III27-III32, 2004.
28. **Treasure CB, Vita JA, Cox DA, Fish RD, Gordon JB, Mudge GH, Colucci WS, Sutton MG, Selwyn AP, Alexander RW and .** Endothelium-dependent dilation of the coronary microvasculature is impaired in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 81: 772-779, 1990.
29. **Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, Williams RE and Heifetz SM.** Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation* 84: 1589-1596, 1991.
30. **Bolton CH, Downs LG, Victory JG, Dwight JF, Tomson CR, Mackness MI and Pinkney JH.** Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 16: 1189-1197, 2001.

31. **Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan ML, Valentini U, Cimino A, Girelli A, Rodella L, Bianchi R, Sleiman I and Rosei EA.** Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 103: 1238-1244, 2001.
32. **Cozma A, Orasan O, Sampelean D, Fodor A, Vlad C, Negrean V, Rednic N and Zdrengea D.** Endothelial dysfunction in metabolic syndrome. *Rom J Intern Med* 47: 133-140, 2009.
33. **Raij L.** Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 8: 30-39, 2006.
34. **Hosenpud J.D. and Greenberg B.H.** *Congestive Heart Failure*. 2007, p. p. 227-228.
35. **Pellegrin M., Mazzolai L., Berthelot A. and Laurant P.** Dysfonction endothéliale et risque cardiovasculaire. L'exercice protège la fonction endothéliale et prévient la maladie cardiovasculaire. *Sciences & Sports* 24: 63-73, 2009.
36. **Munzel T, Daiber A, Ullrich V and Mulsch 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* 25: 1551-1557, 2005.
37. **Wassmann S, Wassmann K and Nickenig G.** Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44: 381-386, 2004.
38. **Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H and Beckman JS.** Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 5: 834-842, 1992.
39. **Griendling KK and FitzGerald GA.** Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108: 1912-1916, 2003.
40. **Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG and Dikalov S.** Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 278: 22546-22554, 2003.

41. **Suzuki T, Fukuo K, Suhara T, Yasuda O, Sato N, Takemura Y, Tsubakimoto M and Ogihara T.** Eicosapentaenoic acid protects endothelial cells against anoikis through restoration of cFLIP. *Hypertension* 42: 342-348, 2003.
42. **Castillo C, Castillo EF, Lopez J and Lopez RM.** [Testosterone inhibits the contractile responses to phenylephrine associated with the release of intracellular calcium in rat aorta]. *Gac Med Mex* 142: 1-8, 2006.
43. **Chambliss KL and Shaul PW.** Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev* 23: 665-686, 2002.
44. **Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R and Saruta T.** Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 360: 291-293, 1995.
45. **Sanchez A, Gomez MJ, Dorantes AL, Rosales JL, Pastelin G, Diaz V, Posadas F and Escalante B.** The effect of ovariectomy on depressed contractions to phenylephrine and KCl and increased relaxation to acetylcholine in isolated aortic rings of female compared to male rabbits. *Br J Pharmacol* 118: 2017-2022, 1996.
46. **Ong PJ, Patrizi G, Chong WC, Webb CM, Hayward CS and Collins P.** Testosterone enhances flow-mediated brachial artery reactivity in men with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 85: 269-272, 2000.
47. **Kang SM, Jang Y, Kim J, Chung N, Cho SY, Chae JS and Lee JH.** Effect of oral administration of testosterone on brachial arterial vasoreactivity in men with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 89: 862-864, 2002.
48. **Chou TM, Sudhir K, Hutchison SJ, Ko E, Amidon TM, Collins P and Chatterjee K.** Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. *Circulation* 94: 2614-2619, 1996.
49. **Deenadayalu V, Puttabyatappa Y, Liu AT, Stallone JN and White RE.** Testosterone-induced relaxation of coronary arteries: activation of BKCa channels via the cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H115-H123, 2012.



50. **Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C.A and Darnell J.** *Biologie moléculaire de la cellule.* 2005,
51. **Stevens A and Lowe J.** *Histologie humaine.* 1997,
52. **Hill J and Olson E.** *Muscle : Fundamental Biology and Mechanisms of Disease.* 2012,
53. **Freeman EJ and Tallant EA.** Vascular smooth-muscle cells contain AT1 angiotensin receptors coupled to phospholipase D activation. *Biochem J* 304 ( Pt 2): 543-548, 1994.
54. **Martin W, Furchgott RF, Villani GM and Jothianandan D.** Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* 237: 529-538, 1986.
55. **Hussain MB and Marshall I.** Characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 122: 849-858, 1997.
56. **Dora KA, Doyle MP and Duling BR.** Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6529-6534, 1997.
57. **Dora KA, Hinton JM, Walker SD and Garland CJ.** An indirect influence of phenylephrine on the release of endothelium-derived vasodilators in rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 129: 381-387, 2000.
58. **Filippi S, Parenti A, Donnini S, Granger HJ, Fazzini A and Ledda F.** alpha(1D)-adrenoceptors cause endothelium-dependent vasodilatation in the rat mesenteric vascular bed. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 869-875, 2001.
59. **Mechoulam R, Fride E, Ben-Shabat S, Meiri U and Horowitz M.** Carbachol, an acetylcholine receptor agonist, enhances production in rat aorta of 2-arachidonoyl glycerol, a hypotensive endocannabinoid. *Eur J Pharmacol* 362: R1-R3, 1998.

60. **Koh SD, Campbell JD, Carl A and Sanders KM.** Nitric oxide activates multiple potassium channels in canine colonic smooth muscle. *J Physiol* 489 ( Pt 3): 735-743, 1995.
61. **Palacios J, Marusic ET, Lopez NC, Gonzalez M and Michea L.** Estradiol-induced expression of N(+)-K(+)-ATPase catalytic isoforms in rat arteries: gender differences in activity mediated by nitric oxide donors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1793-H1800, 2004.
62. **Pritchard TJ, Parvatiyar M, Bullard DP, Lynch RM, Lorenz JN and Paul RJ.** Transgenic mice expressing Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in smooth muscle decreases blood pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1172-H1182, 2007.
63. **Shelly DA, He S, Moseley A, Weber C, Stegemeyer M, Lynch RM, Lingrel J and Paul RJ.** Na<sup>+</sup> pump alpha 2-isoform specifically couples to contractility in vascular smooth muscle: evidence from gene-targeted neonatal mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C813-C820, 2004.
64. **Gupta S, McArthur C, Grady C and Ruderman NB.** Stimulation of vascular Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *Am J Physiol* 266: H2146-H2151, 1994.
65. **Riviere J.E. and Papich M.G.** *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2009,
66. **Bonaventura D, Lunardi CN, Rodrigues GJ, Neto MA and Bendhack LM.** A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. *Nitric Oxide* 18: 287-295, 2008.
67. **Lemke L.W and Williams D.A.** *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 2012,
68. **Kalea AZ, Schuschke DA, Harris PD and Klimis-Zacas DJ.** Cyclo-oxygenase inhibition restores the attenuated vasodilation in manganese-deficient rat aorta. *J Nutr* 136: 2302-2307, 2006.
69. **Kowaluk EA, Seth P and Fung HL.** Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 916-922, 1992.

70. **Kukovetz WR, Holzmann S and Romanin C.** Mechanism of vasodilation by nitrates: role of cyclic GMP. *Cardiology* 74 Suppl 1: 12-19, 1987.
71. **Bonaventura D, de Lima RG, Vercesi JA, da Silva RS and Bendhack LM.** Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. *Vascul Pharmacol* 46: 215-222, 2007.
72. **Olgaard K., Salusky I.B and Silver J.** *The Spectrum of Mineral and Bone Disorders in Chronic Kidney Disease.* 2010,
73. **Gilles R.** *Physiologie animale.* 2006, p. p. 132.
74. **Artigou J.Y and Monsuez J.J.** *Cardiologie et maladies vasculaires.* 2007, p. p. 63-65.
75. **Li Z, Froehlich J, Galis ZS and Lakatta EG.** Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertension* 33: 116-123, 1999.
76. **Moreau P, d'Uscio LV and Luscher TF.** Structure and reactivity of small arteries in aging. *Cardiovasc Res* 37: 247-253, 1998.
77. **Kornet L, Hoeks AP, Lambregts J and Reneman RS.** In the femoral artery bifurcation, differences in mean wall shear stress within subjects are associated with different intima-media thicknesses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2933-2939, 1999.
78. **Kablak-Ziembicka A, Tracz W, Przewlocki T, Pieniazek P, Sokolowski A and Konieczynska M.** Association of increased carotid intima-media thickness with the extent of coronary artery disease. *Heart* 90: 1286-1290, 2004.
79. **Madhuri V, Chandra S and Jabbar A.** Age associated increase in intima media thickness in adults. *Indian J Physiol Pharmacol* 54: 371-375, 2010.
80. **Virmani R, Avolio AP, Mergner WJ, Robinowitz M, Herderick EE, Cornhill JF, Guo SY, Liu TH, Ou DY and O'Rourke M.** Effect of aging on aortic morphology in

populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis. Comparison between occidental and Chinese communities. *Am J Pathol* 139: 1119-1129, 1991.

81. **Hosoda Y, Kawano K, Yamasawa F, Ishii T, Shibata T and Inayama S.** Age-dependent changes of collagen and elastin content in human aorta and pulmonary artery. *Angiology* 35: 615-621, 1984.
82. **O'Rourke MF and Hashimoto J.** Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J Am Coll Cardiol* 50: 1-13, 2007.
83. **Belmin J, Corman B, Merval R and Tedgui A.** Age-related changes in endothelial permeability and distribution volume of albumin in rat aorta. *Am J Physiol* 264: H679-H685, 1993.
84. **Wang M and Lakatta EG.** Altered regulation of matrix metalloproteinase-2 in aortic remodeling during aging. *Hypertension* 39: 865-873, 2002.
85. **McNulty M, Spiers P, McGovern E and Feely J.** Aging is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity in the human aorta. *Am J Hypertens* 18: 504-509, 2005.
86. **Yasmin, McEniery CM, O'Shaughnessy KM, Harnett P, Arshad A, Wallace S, Maki-Petaja K, McDonnell B, Ashby MJ, Brown J, Cockcroft JR and Wilkinson IB.** Variation in the human matrix metalloproteinase-9 gene is associated with arterial stiffness in healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1799-1805, 2006.
87. **Vaitkevicius PV, Fleg JL, Engel JH, O'Connor FC, Wright JG, Lakatta LE, Yin FC and Lakatta EG.** Effects of age and aerobic capacity on arterial stiffness in healthy adults. *Circulation* 88: 1456-1462, 1993.
88. **Avolio AP, Chen SG, Wang RP, Zhang CL, Li MF and O'Rourke MF.** Effects of aging on changing arterial compliance and left ventricular load in a northern Chinese urban community. *Circulation* 68: 50-58, 1983.
89. **Mitchell GF, Parise H, Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Vita JA, Vasani RS and Levy D.** Changes in arterial stiffness and wave reflection with advancing age in

healthy men and women: the Framingham Heart Study. *Hypertension* 43: 1239-1245, 2004.

90. **Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, Guize L, Ducimetiere P and Benetos A.** Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* 37: 1236-1241, 2001.
91. **Lurbe E, Torro MI, Carvajal E, Alvarez V and Redon J.** Birth weight impacts on wave reflections in children and adolescents. *Hypertension* 41: 646-650, 2003.
92. **Kingwell BA, Berry KL, Cameron JD, Jennings GL and Dart AM.** Arterial compliance increases after moderate-intensity cycling. *Am J Physiol* 273: H2186-H2191, 1997.
93. **Meaney E, Samaniego V, Alva F, Valdovinos RA, Marrufo R, Vela A, Allen T, Misra A and Madsen R.** Increased arterial stiffness in children with a parental history of hypertension. *Pediatr Cardiol* 20: 203-205, 1999.
94. **Schram MT, Schalkwijk CG, Bootsma AH, Fuller JH, Chaturvedi N and Stehouwer CD.** Advanced glycation end products are associated with pulse pressure in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Hypertension* 46: 232-237, 2005.
95. **Schram MT, Henry RM, van Dijk RA, Kostense PJ, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Westerhof N and Stehouwer CD.** Increased central artery stiffness in impaired glucose metabolism and type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Hypertension* 43: 176-181, 2004.
96. **Ferreira I, Henry RM, Twisk JW, van MW, Kemper HC and Stehouwer CD.** The metabolic syndrome, cardiopulmonary fitness, and subcutaneous trunk fat as independent determinants of arterial stiffness: the Amsterdam Growth and Health Longitudinal Study. *Arch Intern Med* 165: 875-882, 2005.
97. **Kool MJ, Hoeks AP, Struijker Boudier HA, Reneman RS and Van Bortel LM.** Short- and long-term effects of smoking on arterial wall properties in habitual smokers. *J Am Coll Cardiol* 22: 1881-1886, 1993.

98. **Simon AC, Levenson J, Bouthier J, Safar ME and Avolio AP.** Evidence of early degenerative changes in large arteries in human essential hypertension. *Hypertension* 7: 675-680, 1985.
99. **Wilkinson IB, Prasad K, Hall IR, Thomas A, MacCallum H, Webb DJ, Frenneaux MP and Cockcroft JR.** Increased central pulse pressure and augmentation index in subjects with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 39: 1005-1011, 2002.
100. **Giannattasio C, Failla M, Stella ML, Mangoni AA, Carugo S, Pozzi M, Grassi G and Mancia G.** Alterations of radial artery compliance in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 76: 381-385, 1995.
101. **Guo X, Lu X, Ren H, Levin ER and Kassab GS.** Estrogen modulates the mechanical homeostasis of mouse arterial vessels through nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1788-H1797, 2006.
102. **Miller VM.** Gender and vascular reactivity. *Lupus* 8: 409-415, 1999.
103. **Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB and Carvalho MH.** Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res* 36: 1143-1158, 2003.
104. **Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ and Chaudhuri G.** Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11259-11263, 1992.
105. **Ogata R, Inoue Y, Nakano H, Ito Y and Kitamura K.** Oestradiol-induced relaxation of rabbit basilar artery by inhibition of voltage-dependent Ca channels through GTP-binding protein. *Br J Pharmacol* 117: 351-359, 1996.
106. **Collins P, Beale CM and Rosano GM.** Oestrogen as a calcium channel blocker. *Eur Heart J* 17 Suppl D: 27-31, 1996.
107. **Han G, Yu X, Lu L, Li S, Ma H, Zhu S, Cui X and White RE.** Estrogen receptor alpha mediates acute potassium channel stimulation in human coronary artery smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 1025-1030, 2006.

108. Hill B.J.F and Rusch N.J. An estrogen-induced decrease in voltage-gated calcium channel expression attenuates coronary artery contractility. *The FASEB Journal* 22. 2008.
109. **Corona G, Rastrelli G, Monami M, Guay A, Buvat J, Sforza A, Forti G, Mannucci E and Maggi M.** Hypogonadism as a risk factor for cardiovascular mortality in men: a meta-analytic study. *Eur J Endocrinol* 165: 687-701, 2011.
110. **Prevost G, Eas F and Kuhn JM.** [Plasma testosterone, obesity, metabolic syndrome and diabetes.]. *Presse Med* 2013.
111. **Buvat J, Maggi M, Gooren L, Guay AT, Kaufman J, Morgentaler A, Schulman C, Tan HM, Torres LO, Yassin A and Zitzmann M.** Endocrine aspects of male sexual dysfunctions. *J Sex Med* 7: 1627-1656, 2010.
112. **Rosano GM, Sheiban I, Massaro R, Pagnotta P, Marazzi G, Vitale C, Mercurio G, Volterrani M, Aversa A and Fini M.** Low testosterone levels are associated with coronary artery disease in male patients with angina. *Int J Impot Res* 19: 176-182, 2007.
113. **Bain J.** The many faces of testosterone. *Clin Interv Aging* 2: 567-576, 2007.
114. **Khaw KT, Dowsett M, Folkerd E, Bingham S, Wareham N, Luben R, Welch A and Day N.** Endogenous testosterone and mortality due to all causes, cardiovascular disease, and cancer in men: European prospective investigation into cancer in Norfolk (EPIC-Norfolk) Prospective Population Study. *Circulation* 116: 2694-2701, 2007.
115. **Jones RD, English KM, Pugh PJ, Morice AH, Jones TH and Channer KS.** Pulmonary vasodilatory action of testosterone: evidence of a calcium antagonistic action. *J Cardiovasc Pharmacol* 39: 814-823, 2002.
116. **Jones RD, Pugh PJ, Jones TH and Channer KS.** The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action? *Br J Pharmacol* 138: 733-744, 2003.
117. **Rowell KO, Hall J, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS and Jones RD.** Testosterone acts as an efficacious vasodilator in isolated human pulmonary arteries and veins: evidence for a biphasic effect at physiological and supra-physiological concentrations. *J Endocrinol Invest* 32: 718-723, 2009.

118. **Ahimastos AA, Formosa M, Dart AM and Kingwell BA.** Gender differences in large artery stiffness pre- and post puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5375-5380, 2003.
119. **Rajkumar C, Kingwell BA, Cameron JD, Waddell T, Mehra R, Christophidis N, Komesaroff PA, McGrath B, Jennings GL, Sudhir K and Dart AM.** Hormonal therapy increases arterial compliance in postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol* 30: 350-356, 1997.
120. **Guiochon-Mantel A.** [Regulation of the differentiation and proliferation of smooth muscle cells by the sex hormones]. *Rev Mal Respir* 17: 604-608, 2000.
121. **Zhou H, Kimura K, Orita T, Nishida T and Sonoda KH.** Inhibition by female sex hormones of collagen degradation by corneal fibroblasts. *Mol Vis* 17: 3415-3422, 2011.
122. Graf H. Modulation of the Extracellular Matrix by Sex Steroids. Schering Foundation Workshop 5, 139-144. 1992.
123. **Marlatt KL, Kelly AS, Steinberger J and Dengel DR.** The influence of gender on carotid artery compliance and distensibility in children and adults. *J Clin Ultrasound* 41: 340-346, 2013.
124. **Berry KL, Cameron JD, Dart AM, Dewar EM, Gatzka CD, Jennings GL, Liang YL, Reid CM and Kingwell BA.** Large-artery stiffness contributes to the greater prevalence of systolic hypertension in elderly women. *J Am Geriatr Soc* 52: 368-373, 2004.
125. **Coutinho T, Borlaug BA, Pellikka PA, Turner ST and Kullo IJ.** Sex differences in arterial stiffness and ventricular-arterial interactions. *J Am Coll Cardiol* 61: 96-103, 2013.
126. **Waddell TK, Dart AM, Gatzka CD, Cameron JD and Kingwell BA.** Women exhibit a greater age-related increase in proximal aortic stiffness than men. *J Hypertens* 19: 2205-2212, 2001.
127. **Miura S, Tanaka E, Mori A, Toya M, Takahashi K, Nakahara K, Ohmichi M and Kurachi H.** Hormone replacement therapy improves arterial stiffness in normotensive postmenopausal women. *Maturitas* 45: 293-298, 2003.



128. **Dernellis J and Panaretou M.** Aortic stiffness is an independent predictor of progression to hypertension in nonhypertensive subjects. *Hypertension* 45: 426-431, 2005.
129. **Monk D and Moore GE.** Intrauterine growth restriction--genetic causes and consequences. *Semin Fetal Neonatal Med* 9: 371-378, 2004.
130. **Lin CC and Santolaya-Forgas J.** Current concepts of fetal growth restriction: part I. Causes, classification, and pathophysiology. *Obstet Gynecol* 92: 1044-1055, 1998.
131. **Khoury MJ, Erickson JD, Cordero JF and McCarthy BJ.** Congenital malformations and intrauterine growth retardation: a population study. *Pediatrics* 82: 83-90, 1988.
132. **Neggens YH, Goldenberg RL, Tamura T, Cliver SP and Hoffman HJ.** The relationship between maternal dietary intake and infant birthweight. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 165: 71-75, 1997.
133. **Bajoria R, Hancock M, Ward S, D'Souza SW and Sooranna SR.** Discordant amino acid profiles in monochorionic twins with twin-twin transfusion syndrome. *Pediatr Res* 48: 821-828, 2000.
134. **Vogt IC.** Maternal smoking, intrauterine growth restriction, and placental apoptosis. *Pediatr Dev Pathol* 7: 433-442, 2004.
135. **Kaminsky LM, Ananth CV, Prasad V, Nath C and Vintzileos AM.** The influence of maternal cigarette smoking on placental pathology in pregnancies complicated by abruption. *Am J Obstet Gynecol* 197: 275, 2007.
136. **Van Der Veen F and Fox H.** The effects of cigarette smoking on the human placenta: a light and electron microscopic study. *Placenta* 3: 243-256, 1982.
137. **Asmussen I and Kjeldsen K.** Intimal ultrastructure of human umbilical arteries. Observations on arteries from newborn children of smoking and nonsmoking mothers. *Circ Res* 36: 579-589, 1975.

138. **Geelhoed JJ, El MH, Verburg BO, van Osch-Gevers L, Hofman A, Huizink AC, Moll HA, Verhulst FC, Helbing WA, Steegers EA and Jaddoe VW.** Maternal smoking during pregnancy, fetal arterial resistance adaptations and cardiovascular function in childhood. *BJOG* 118: 755-762, 2011.
139. **Larsen LG, Clausen HV and Jonsson L.** Stereologic examination of placentas from mothers who smoke during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 186: 531-537, 2002.
140. **Morrow RJ, Ritchie JW and Bull SB.** Maternal cigarette smoking: the effects on umbilical and uterine blood flow velocity. *Am J Obstet Gynecol* 159: 1069-1071, 1988.
141. **Economides D and Braithwaite J.** Smoking, pregnancy and the fetus. *J R Soc Health* 114: 198-201, 1994.
142. **Ronco AM, Arguello G, Munoz L, Gras N and Llanos M.** Metals content in placentas from moderate cigarette consumers: correlation with newborn birth weight. *Biometals* 18: 233-241, 2005.
143. **Sokol RJ, Delaney-Black V and Nordstrom B.** Fetal alcohol spectrum disorder. *JAMA* 290: 2996-2999, 2003.
144. **Kay HH, Tsoi S, Grindle K and Magness RR.** Markers of oxidative stress in placental villi exposed to ethanol. *J Soc Gynecol Investig* 13: 118-121, 2006.
145. **Siler-Khodr TM, Yang Y, Grayson MH, Henderson GI, Lee M and Schenker S.** Effect of ethanol on thromboxane and prostacyclin production in the human placenta. *Alcohol* 21: 169-180, 2000.
146. **Gundogan F, Elwood G, Longato L, Tong M, Feijoo A, Carlson RI, Wands JR and de la Monte SM.** Impaired placentation in fetal alcohol syndrome. *Placenta* 29: 148-157, 2008.
147. **Taylor SM, Heron AE, Cannell GR and Florin TH.** Pressor effect of ethanol in the isolated perfused human placental lobule. *Eur J Pharmacol* 270: 371-374, 1994.

148. **Yang Q, Witkiewicz BB, Olney RS, Liu Y, Davis M, Khoury MJ, Correa A and Erickson JD.** A case-control study of maternal alcohol consumption and intrauterine growth retardation. *Ann Epidemiol* 11: 497-503, 2001.
149. **Brien JF, Loomis CW, Tranmer J and McGrath M.** Disposition of ethanol in human maternal venous blood and amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 146: 181-186, 1983.
150. **Barr HM and Streissguth AP.** Identifying maternal self-reported alcohol use associated with fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Clin Exp Res* 25: 283-287, 2001.
151. **Bailey BA and Sokol RJ.** Pregnancy and alcohol use: evidence and recommendations for prenatal care. *Clin Obstet Gynecol* 51: 436-444, 2008.
152. **Brodzki J, Hernandez-Andrade E, Gudmundsson S, Dubiel M, Mandruzzato GP, Laurini R and Marsal K.** Can the degree of retrograde diastolic flow in abnormal umbilical artery flow velocity waveforms predict pregnancy outcome? *Ultrasound Obstet Gynecol* 19: 229-234, 2002.
153. **Skomsvoll JF, Ostensen M, Irgens LM and Baste V.** Perinatal outcome in pregnancies of women with connective tissue disease and inflammatory rheumatic disease in Norway. *Scand J Rheumatol* 28: 352-356, 1999.
154. **Arechavaleta-Velasco F, Koi H, Strauss JF, III and Parry S.** Viral infection of the trophoblast: time to take a serious look at its role in abnormal implantation and placentation? *J Reprod Immunol* 55: 113-121, 2002.
155. **Barker DJ and Osmond C.** Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1: 1077-1081, 1986.
156. **Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA and Robinson JS.** Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341: 938-941, 1993.
157. **Davies AA, Smith GD, May MT and Ben-Shlomo Y.** Association between birth weight and blood pressure is robust, amplifies with age, and may be underestimated. *Hypertension* 48: 431-436, 2006.

158. **Gamborg M, Byberg L, Rasmussen F, Andersen PK, Baker JL, Bengtsson C, Canoy D, Droyvold W, Eriksson JG, Forsen T, Gunnarsdottir I, Jarvelin MR, Koupil I, Lapidus L, Nilsen TI, Olsen SF, Schack-Nielsen L, Thorsdottir I, Tuomainen TP and Sorensen TI.** Birth weight and systolic blood pressure in adolescence and adulthood: meta-regression analysis of sex- and age-specific results from 20 Nordic studies. *Am J Epidemiol* 166: 634-645, 2007.
159. **Johansson S, Iliadou A, Bergvall N, de FU, Kramer MS, Pawitan Y, Pedersen NL, Norman M, Lichtenstein P and Cnattingius S.** The association between low birth weight and type 2 diabetes: contribution of genetic factors. *Epidemiology* 19: 659-665, 2008.
160. **Lindsay RS, Dabelea D, Roumain J, Hanson RL, Bennett PH and Knowler WC.** Type 2 diabetes and low birth weight: the role of paternal inheritance in the association of low birth weight and diabetes. *Diabetes* 49: 445-449, 2000.
161. **Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Spiegelman D, Ascherio AL and Stampfer MJ.** Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men. *Circulation* 94: 3246-3250, 1996.
162. **Loaiza S, Coustasse A, Urrutia-Rojas X and Atalah E.** Birth weight and obesity risk at first grade in a cohort of Chilean children. *Nutr Hosp* 26: 214-219, 2011.
163. **Li C, Johnson MS and Goran MI.** Effects of low birth weight on insulin resistance syndrome in caucasian and African-American children. *Diabetes Care* 24: 2035-2042, 2001.
164. **Byberg L, McKeigue PM, Zethelius B and Lithell HO.** Birth weight and the insulin resistance syndrome: association of low birth weight with truncal obesity and raised plasminogen activator inhibitor-1 but not with abdominal obesity or plasma lipid disturbances. *Diabetologia* 43: 54-60, 2000.
165. **Delisle H.** [Foetal programming of nutrition-related chronic diseases]. *Sante* 12: 56-63, 2002.
166. **Jones A, Beda A, Osmond C, Godfrey KM, Simpson DM and Phillips DI.** Sex-specific programming of cardiovascular physiology in children. *Eur Heart J* 29: 2164-2170, 2008.

167. **Woods LL, Ingelfinger JR and Rasch R.** Modest maternal protein restriction fails to program adult hypertension in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R1131-R1136, 2005.
168. **Alexander BT.** Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring. *Hypertension* 41: 457-462, 2003.
169. **Ojeda NB, Grigore D, Robertson EB and Alexander BT.** Estrogen protects against increased blood pressure in postpubertal female growth restricted offspring. *Hypertension* 50: 679-685, 2007.
170. **Ojeda NB, Grigore D, Yanes LL, Iliescu R, Robertson EB, Zhang H and Alexander BT.** Testosterone contributes to marked elevations in mean arterial pressure in adult male intrauterine growth restricted offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R758-R763, 2007.
171. **Hemmings DG, Williams SJ and Davidge ST.** Increased myogenic tone in 7-month-old adult male but not female offspring from rat dams exposed to hypoxia during pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H674-H682, 2005.
172. **Jarvisalo MJ, Jartti L, Nanto-Salonen K, Irjala K, Ronnema T, Hartiala JJ, Celermajer DS and Raitakari OT.** Increased aortic intima-media thickness: a marker of preclinical atherosclerosis in high-risk children. *Circulation* 104: 2943-2947, 2001.
173. **Leeson CP, Whincup PH, Cook DG, Donald AE, Papacosta O, Lucas A and Deanfield JE.** Flow-mediated dilation in 9- to 11-year-old children: the influence of intrauterine and childhood factors. *Circulation* 96: 2233-2238, 1997.
174. **Visentin S, Grisan E, Zanardo V, Bertin M, Veronese E, Cavallin F, Ambrosini G, Trevisanuto D and Cosmi E.** Developmental programming of cardiovascular risk in intrauterine growth-restricted twin fetuses according to aortic intima thickness. *J Ultrasound Med* 32: 279-284, 2013.
175. **Zanardo V, Fanelli T, Weiner G, Fanos V, Zaninotto M, Visentin S, Cavallin F, Trevisanuto D and Cosmi E.** Intrauterine growth restriction is associated with persistent aortic wall thickening and glomerular proteinuria during infancy. *Kidney Int* 80: 119-123, 2011.

176. **Skilton MR, Viikari JS, Juonala M, Laitinen T, Lehtimaki T, Taittonen L, Kahonen M, Celermajer DS and Raitakari OT.** Fetal growth and preterm birth influence cardiovascular risk factors and arterial health in young adults: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 2975-2981, 2011.
177. **Franco MC, Christofalo DM, Sawaya AL, Ajzen SA and Sesso R.** Effects of low birth weight in 8- to 13-year-old children: implications in endothelial function and uric acid levels. *Hypertension* 48: 45-50, 2006.
178. **Bjarnegard N, Morsing E, Cinthio M, Lanne T and Brodzski J.** Cardiovascular function in adulthood following intrauterine growth restriction with abnormal fetal blood flow. *Ultrasound Obstet Gynecol* 41: 177-184, 2013.
179. **Casanello P, Krause B, Torres E, Gallardo V, Gonzalez M, Prieto C, Escudero C, Farias M and Sobrevia L.** Reduced l-arginine transport and nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelial cells from intrauterine growth restriction pregnancies is not further altered by hypoxia. *Placenta* 30: 625-633, 2009.
180. **Krause BJ, Carrasco-Wong I, Caniuguir A, Carvajal J, Farias M and Casanello P.** Endothelial eNOS/arginase imbalance contributes to vascular dysfunction in IUGR umbilical and placental vessels. *Placenta* 34: 20-28, 2013.
181. **Goodfellow J, Bellamy MF, Gorman ST, Brownlee M, Ramsey MW, Lewis MJ, Davies DP and Henderson AH.** Endothelial function is impaired in fit young adults of low birth weight. *Cardiovasc Res* 40: 600-606, 1998.
182. **Franco MC, Arruda RM, Dantas AP, Kawamoto EM, Fortes ZB, Scavone C, Carvalho MH, Tostes RC and Nigro D.** Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. *Cardiovasc Res* 56: 145-153, 2002.
183. **Morton JS, Rueda-Clausen CF and Davidge ST.** Flow-mediated vasodilation is impaired in adult rat offspring exposed to prenatal hypoxia. *J Appl Physiol (1985 )* 110: 1073-1082, 2011.
184. **Sathishkumar K, Elkins R, Yallampalli U and Yallampalli C.** Protein restriction during pregnancy induces hypertension and impairs endothelium-dependent vascular function in adult female offspring. *J Vasc Res* 46: 229-239, 2009.

185. **Payne JA, Alexander BT and Khalil RA.** Reduced endothelial vascular relaxation in growth-restricted offspring of pregnant rats with reduced uterine perfusion. *Hypertension* 42: 768-774, 2003.
186. **Casanello P and Sobrevia L.** Intrauterine growth retardation is associated with reduced activity and expression of the cationic amino acid transport systems y+/hCAT-1 and y+/hCAT-2B and lower activity of nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res* 91: 127-134, 2002.
187. **Zhou J, Xiao D, Hu Y, Wang Z, Paradis A, Mata-Greenwood E and Zhang L.** Gestational hypoxia induces preeclampsia-like symptoms via heightened endothelin-1 signaling in pregnant rats. *Hypertension* 62: 599-607, 2013.
188. **Tapanainen PJ, Bang P, Wilson K, Unterman TG, Vreman HJ and Rosenfeld RG.** Maternal hypoxia as a model for intrauterine growth retardation: effects on insulin-like growth factors and their binding proteins. *Pediatr Res* 36: 152-158, 1994.
189. **Rueda-Clausen CF, Dolinsky VW, Morton JS, Proctor SD, Dyck JR and Davidge ST.** Hypoxia-induced intrauterine growth restriction increases the susceptibility of rats to high-fat diet-induced metabolic syndrome. *Diabetes* 60: 507-516, 2011.
190. **Kingdom JC and Kaufmann P.** Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta* 18: 613-621, 1997.
191. **Rizzo G and Arduini D.** Fetal cardiac function in intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 165: 876-882, 1991.
192. **Langley SC and Jackson AA.** Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)* 86: 217-222, 1994.
193. **Alexandre-Gouabau MC, Courant F, Le GG, Moyon T, Darmaun D, Parnet P, Coupe B and Antignac JP.** Offspring metabolomic response to maternal protein restriction in a rat model of intrauterine growth restriction (IUGR). *J Proteome Res* 10: 3292-3302, 2011.
194. **Corstius HB, Zimanyi MA, Maka N, Herath T, Thomas W, van der Laarse A, Wreford NG and Black MJ.** Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. *Pediatr Res* 57: 796-800, 2005.

195. **Cheema KK, Dent MR, Saini HK, Aroutiounova N and Tappia PS.** Prenatal exposure to maternal undernutrition induces adult cardiac dysfunction. *Br J Nutr* 93: 471-477, 2005.
196. **Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C and Hoet JJ.** Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes* 40 Suppl 2: 115-120, 1991.
197. **Ogata ES, Bussey ME and Finley S.** Altered gas exchange, limited glucose and branched chain amino acids, and hypoinsulinism retard fetal growth in the rat. *Metabolism* 35: 970-977, 1986.
198. **Simmons RA, Templeton LJ and Gertz SJ.** Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* 50: 2279-2286, 2001.
199. **Beaudoin AR.** Embryology and teratology . In: *The laboratory rat*, edited by HJ Baker and JR Lindsey. Academic Press, 1980.
200. **Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J and Brochu M.** Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 180: 608-613, 1999.
201. **St-Louis J, Sicotte B, Beausejour A and Brochu M.** Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake. *Reproduction* 131: 331-339, 2006.
202. **Bedard S, Sicotte B, St-Louis J and Brochu M.** Modulation of body fluids and angiotensin II receptors in a rat model of intra-uterine growth restriction. *J Physiol* 562: 937-950, 2005.
203. **Battista MC, Oligny LL, St-Louis J and Brochu M.** Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E124-E131, 2002.
204. **Bibeau K, Battista MC, Houde V and Brochu M.** Fetal adrenal gland alterations in a rat model of adverse intrauterine environment. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R899-R911, 2010.



205. **Battista MC, Calvo E, Chorvatova A, Comte B, Corbeil J and Brochu M.** Intra-uterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats. *J Physiol* 565: 197-205, 2005.
206. **McAdams RP and Waterfall JF.** The effect of age on the sensitivity of pre- and postsynaptic alpha-adrenoceptors to agonists and antagonists in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 334: 430-435, 1986.
207. **George J.Christ.** Age- and pathology-dependent alterations in the efficacy of phenylephrine- and 5-hydroxytryptamine-induced contractions in isolated rat aorta. *Drug Dev Res* 25: 303-314, 1992.
208. **Angus JA and Cocks TM.** Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol Ther* 41: 303-352, 1989.
209. **Benetos A, Huguet F, Albaladejo P, Brisac AM, Pappo M, Safar ME and Levy BI.** Role of adrenergic tone in mechanical and functional properties of carotid artery during aging. *Am J Physiol* 265: H1132-H1138, 1993.
210. **Owens GK and Wise G.** Regulation of differentiation/maturation in vascular smooth muscle cells by hormones and growth factors. *Agents Actions Suppl* 48: 3-24, 1997.
211. **Campelo AE, Cutini PH and Massheimer VL.** Cellular actions of testosterone in vascular cells: mechanism independent of aromatization to estradiol. *Steroids* 77: 1033-1040, 2012.
212. **Espinosa E, Oemar BS and Luscher TF.** 17 beta-Estradiol and smooth muscle cell proliferation in aortic cells of male and female rats. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 8-14, 1996.
213. **Moraghan T, Antoniucci DM, Grenert JP, Sieck GC, Johnson C, Miller VM and Fitzpatrick LA.** Differential response in cell proliferation to beta estradiol in coronary arterial vascular smooth muscle cells obtained from mature female versus male animals. *Endocrinology* 137: 5174-5177, 1996.
214. **Vargas R, Hewes B, Rego A, Farhat MY, Suarez R and Ramwell PW.** Estradiol effect on rate of proliferation of rat carotid segments: effect of gender and tamoxifen. *J Cardiovasc Pharmacol* 27: 495-499, 1996.

215. **Fitzpatrick LA, Ruan M, Anderson J, Moraghan T and Miller V.** Gender-related differences in vascular smooth muscle cell proliferation: implications for prevention of atherosclerosis. *Lupus* 8: 397-401, 1999.
216. **Aloysius UI, Achike FI and Mustafa MR.** Mechanisms underlining gender differences in Phenylephrine contraction of normoglycaemic and short-term Streptozotocin-induced diabetic WKY rat aorta. *Vascul Pharmacol* 57: 81-90, 2012.
217. **Chung JY, Kim JE, Yoon HJ, Song SY, Kim SO and Roh WS.** Moderate hypothermia attenuates alpha(1)-adrenoceptor-mediated contraction in isolated rat aorta: the role of the endothelium. *Cryobiology* 65: 33-40, 2012.
218. **Auch-Schwelk W, Katusic ZS and Vanhoutte PM.** Nitric oxide inactivates endothelium-derived contracting factor in the rat aorta. *Hypertension* 19: 442-445, 1992.
219. **Tschudi MR, Barton M, Bersinger NA, Moreau P, Cosentino F, Noll G, Malinski T and Luscher TF.** Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *J Clin Invest* 98: 899-905, 1996.
220. **Atkinson J, Tatchum-Talom R and Capdeville-Atkinson C.** Reduction of endothelial function with age in the mesenteric arterial bed of the normotensive rat. *Br J Pharmacol* 111: 1184-1188, 1994.
221. **Hongo K, Nakagomi T, Kassell NF, Sasaki T, Lehman M, Vollmer DG, Tsukahara T, Ogawa H and Torner J.** Effects of aging and hypertension on endothelium-dependent vascular relaxation in rat carotid artery. *Stroke* 19: 892-897, 1988.
222. **Matz RL, Schott C, Stoclet JC and Andriantsitohaina R.** Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. *Physiol Res* 49: 11-18, 2000.
223. **Moritoki H, Hosoki E and Ishida Y.** Age-related decrease in endothelium-dependent dilator response to histamine in rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol* 126: 61-67, 1986.

224. **Moritoki H, Tanioka A, Maeshiba Y, Iwamoto T, Ishida Y and Araki H.** Age-associated decrease in histamine-induced vasodilation may be due to reduction of cyclic GMP formation. *Br J Pharmacol* 95: 1015-1022, 1988.
225. **Cernadas MR, Sanchez de ML, Garcia-Duran M, Gonzalez-Fernandez F, Millas I, Monton M, Rodrigo J, Rico L, Fernandez P, de FT, Rodriguez-Feo JA, Guerra J, Caramelo C, Casado S and Lopez F.** Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res* 83: 279-286, 1998.
226. **Marin J.** Age-related changes in vascular responses: a review. *Mech Ageing Dev* 79: 71-114, 1995.
227. **Bucher B, Travo P, Laurent P and Stoclet JC.** Vascular smooth muscle cell hypertrophy during maturation in rat thoracic aorta. Volumetric and morphometric studies. *Cell Biol Int Rep* 6: 883-892, 1982.
228. **Travo P, Barrett G and Burnstock G.** Differences in proliferation of primary cultures of vascular smooth muscle cells taken from male and female rats. *Blood Vessels* 17: 110-116, 1980.
229. **Bacakova L, Mares V, Lisa V and Kocourek F.** Sex-dependent differences in growth and morphology of cultured vascular smooth muscle cells from newborn rats. *Physiol Res* 46: 403-406, 1997.
230. **Loukotova J, Bacakova L, Zicha J and Kunes J.** The influence of angiotensin II on sex-dependent proliferation of aortic VSMC isolated from SHR. *Physiol Res* 47: 501-505, 1998.
231. **Grandvullemin I, Boubred F, Buffat C., Andreds V, Ligi I, Charpiot P, Faury G, Dignat-George F and Simeoni U.** Influence of intrauterine growth restriction on endothelium-dependent vasodilation in rat offspring. *Archives of disease in Childhood* 93: 2008.
232. **Grandvullemin I, Ligi I, Buffat C., Boubred F, Dignat-George F, and Simeoni U.** Early Endothelium-Dependent Vasodilatory Dysfunction Innormotensive, Intra-Uterine Growth Restricted Rats is Restored by L-Arginine and Inhibition of Arginases. *Pediatr.Res* 68, 204. 2010.

233. **Thomas G and Ramwell PW.** Interaction of non-arginine compounds with the endothelium-derived relaxing factor inhibitor, NG-monomethyl L-arginine. *J Pharmacol Exp Ther* 260: 676-679, 1992.
234. **Das R, Kravtsov GM, Ballard HJ and Kwan CY.** L-NAME inhibits Mg(2+)-induced rat aortic relaxation in the absence of endothelium. *Br J Pharmacol* 128: 493-499, 1999.
235. **Armitage JA, Lakasing L, Taylor PD, Balachandran AA, Jensen RI, Dekou V, Ashton N, Nyengaard JR and Poston L.** Developmental programming of aortic and renal structure in offspring of rats fed fat-rich diets in pregnancy. *J Physiol* 565: 171-184, 2005.
236. **Khorram O, Momeni M, Desai M and Ross MG.** Nutrient restriction in utero induces remodeling of the vascular extracellular matrix in rat offspring. *Reprod Sci* 14: 73-80, 2007.
237. **Tare M, Parkington HC, Bubb KJ and Wlodek ME.** Uteroplacental insufficiency and lactational environment separately influence arterial stiffness and vascular function in adult male rats. *Hypertension* 60: 378-386, 2012.
238. **Menendez-Castro C, Fahlbusch F, Cordasic N, Amann K, Munzel K, Plank C, Wachtveitl R, Rascher W, Hilgers KF and Hartner A.** Early and late postnatal myocardial and vascular changes in a protein restriction rat model of intrauterine growth restriction. *PLoS One* 6: e20369, 2011.
239. **Balaraman V, Kullama LK, Easa D, Robillard JE, Hashiro GM and Nakamura KT.** Developmental changes in sodium nitroprusside and atrial natriuretic factor mediated relaxation in the guinea pig aorta. *Pediatr Res* 27: 392-395, 1990.
240. **Bondarenko OI and Sahach VF.** [The role of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> ATPase in electrogenicity of the aortic endothelial cells]. *Fiziol Zh* 52: 34-41, 2006.
241. **Vanheel B, Van d, V and Leusen I.** Contribution of nitric oxide to the endothelium-dependent hyperpolarization in rat aorta. *J Physiol* 475: 277-284, 1994.

242. **Sonkusare SK, Bonev AD, Ledoux J, Liedtke W, Kotlikoff MI, Heppner TJ, Hill-Eubanks DC and Nelson MT.** Elementary Ca<sup>2+</sup> signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function. *Science* 336: 597-601, 2012.
243. **Ledoux J, Werner ME, Brayden JE and Nelson MT.** Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)* 21: 69-78, 2006.
244. **Russo-Marie F, Peltier A and Polla B.** *L'inflammation*. John Libbey Eurotext, 1998.
245. **Guénard H.** *Physiologie humaine*. Wolters Kluwer France, 2001.
246. **Delpy E, Coste H and Gouville AC.** Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *Br J Pharmacol* 119: 471-478, 1996.
247. **Luscher TF, Aarhus LL and Vanhoutte PM.** Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens* 3: 55-58, 1990.
248. **Shimokawa H and Takeshita A.** Endothelium-dependent regulation of the cardiovascular system. *Intern Med* 34: 939-946, 1995.
249. **Tamaoki J, Tagaya E, Nishimura K, Isono K and Nagai A.** Role of Na<sup>(+)</sup>-K<sup>+</sup> ATPase in cyclic GMP-mediated relaxation of canine pulmonary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 122: 112-116, 1997.
250. **Shadwick RE.** Mechanical design in arteries. *J Exp Biol* 202: 3305-3313, 1999.
251. **St-Louis J, Pare H, Sicotte B and Brochu M.** Increased reactivity of rat uterine arcuate artery throughout gestation and postpartum. *Am J Physiol* 273: H1148-H1153, 1997.
252. **Bowles DK, Maddali KK, Ganjam VK, Rubin LJ, Tharp DL, Turk JR and Heaps CL.** Endogenous testosterone increases L-type Ca<sup>2+</sup> channel expression in porcine coronary smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2091-H2098, 2004.

253. **Palacios J, Marusic ET, Lopez NC, Gonzalez M and Michea L.** Estradiol-induced expression of N(+)-K(+)-ATPase catalytic isoforms in rat arteries: gender differences in activity mediated by nitric oxide donors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1793-H1800, 2004.
254. **West A.R, Connolly S., Mih J.D, Billiar K.L, Tschumperlin D., and Maksym G.N.** Increased Extracellular Matrix Stiffness Enhances Airway Smooth Muscle Contractile Phenotype And Contractile Function. *Am J Respir Crit Care Med* (183). 2011.
255. **Polte TR, Eichler GS, Wang N and Ingber DE.** Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C518-C528, 2004.
256. **Thompson JA, Gros R, Richardson BS, Piorkowska K and Regnault TR.** Central stiffening in adulthood linked to aberrant aortic remodeling under suboptimal intrauterine conditions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301: R1731-R1737, 2011.
257. **Kuang SQ, Kwartler CS, Byanova KL, Pham J, Gong L, Prakash SK, Huang J, Kamm KE, Stull JT, Sweeney HL and Milewicz DM.** Rare, nonsynonymous variant in the smooth muscle-specific isoform of myosin heavy chain, MYH11, R247C, alters force generation in the aorta and phenotype of smooth muscle cells. *Circ Res* 110: 1411-1422, 2012.