

Université de Montréal

Étude de la vasoréactivité à l'Angiotensine II chez des rats avec programmation
intra-utérine de l'hypertension artérielle

Par

Catherine YZYDORCZYK

Programme de sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences Biomédicales

Août, 2005

© Catherine YZYDORCZYK, 2005



W

4

U58

2006

V.078

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce Mémoire intitulé :

Étude de la vasoréactivité à l'Angiotensine II chez des rats avec programmation
intra-utérine de l'hypertension artérielle

Présenté par :

Catherine YZYDORCZYK

à été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

- Dre Rhian M. TOUYZ, Président-rapporteur
- Dre Anne Monique NUYT, Directrice de recherche
- Dr Fernand GOBEIL Jr, Dr Pierre HARDY, Codirecteurs
- Dr Jean ST-LOUIS, Membre du jury

Résumé en français

Introduction. Les rats ayant été exposés à une diète faible en protéines in utero (LP) présentent à l'âge adulte une augmentation de l'activité de la rénine plasmatique et de la pression sanguine qui peut-être normalisée par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Angiotensine (AngII). L'AngII circulante peut augmenter la pression sanguine via des mécanismes centraux et périphériques. Le but de cette étude est de tester que la vasomotricité est exagérée en réponse à l'AngII chez des rats présentant une programmation fœtale de l'hypertension artérielle, puis d'en explorer les mécanismes.

Matériel et Méthodes. Des rates (Wistar) reçoivent une diète isocalorique contenant 9% (groupe LP) ou 18% (groupe CTRL) de caséine. Les artères carotides des descendants mâles LP et CTRL (9-12 semaines) ont été étudiés ex-vivo. Des courbes doses réponses ont été générées à l'AngII (en présence ou non d'antagonistes des récepteurs AT1 et AT2), à l'analogue du thromboxane A2 (U46619) et à l'Angiotensine (1-7). La contribution de l'endothélium a été étudiée en le déplétant des artères carotides. L'implication de l'endothéline et des anions superoxide a été envisagée par l'utilisation respectivement du Phosphoramidon et du Tempol. Cette production d'anions superoxide a été mesurée par chemiluminescence (lucigénine et hydroéthidium).

Résultats. La vasocontraction en réponse à l'AngII est augmentée dans le groupe LP. Le Losartan (antagoniste d'AT1) inhibe pratiquement totalement la vasocontraction, alors que le PD123319 (antagoniste d'AT2) n'a aucun effet. La réponse au U46619 est la même entre les groupes. L'Ang(1-7) n'évoque pas de réponse vasomotrice. La vasocontraction est augmentée après déplétion de l'endothélium dans les deux groupes. L'utilisation du Phosphoramidon ne modifie pas la vasocontraction dans les deux groupes. L'expression d'AT1 est significativement plus élevée dans le groupe LP, tandis que l'expression de la superoxide dismutase (SOD) dans les artères carotides n'est pas différente entre les deux groupes comme démontré par immunobuvardage Western. Le Tempol normalise la réponse à l'AngII uniquement dans le groupe LP. L'AngII augmente significativement la production d'anions superoxide uniquement chez les LP. La co-incubation avec le diphenylene iodonium (DPI, inhibiteur des enzymes à flavines) or apocynin et l'apocynin (inhibiteur de l'assemblage du complexe de la

nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxydase) prévient cette augmentation et conduit à des niveaux d'anions superoxyde comparables à ceux obtenus dans le groupe CTRL.

Conclusion. La vasocontraction exagérée en réponse à l'Ang II observée dans un modèle de programmation in utéro de l'hypertension associée à une exposition à une diète faible en protéines, résulte de la libération d'anions superoxyde suite à la stimulation de la NAD(P)H oxydase et est associée à une expression accrue de récepteurs AT1.

MOTS CLÉS:

Programmation fœtale, hypertension, stress oxydatif, Angiotensine, vaisseaux isolés.

Abstract

Introduction: In adult offspring of dams fed a low protein (LP) diet during gestation, plasma renin activity is increased, elevated blood pressure is normalized by angiotensin-converting enzyme inhibitor and pressor response to infusion of angiotensin II (AngII) is increased. Circulating AngII increases blood pressure through peripheral and central mechanisms. The current studies were undertaken to verify whether peripheral vascular response to AngII is also increased in LP offspring compared to control (CTRL).

Methods. Virgin Wistar rats (initial weight 225-250g) were mated overnight and on the day of conception, were allocated to feed *ad libidum* on a diet containing either 18% (CTRL) or 9% (LP) casein. Cumulative concentration-response curves were generated with AngII in presence and absence AT₁R and AT₂R antagonist, phosphoramidon, tempol. Cumulative concentration-response curves were also generated with the thromboxane A₂ mimetic U46619 and with angiotensin(1-7) (Ang(1-7)). To verify the contribution of endothelium, it had been mechanically removed. Vascular superoxide production was estimated using lucigenin-enhanced chemiluminescence

Results: AngII-induced contraction of carotid rings studied in organ chambers was increased in LP. In both groups, contraction to AngII was inhibited by AT₁R but not AT₂R antagonists. There was no difference between groups in the response to increasing concentrations of thromboxane A₂ analogue U46619 and Vasodilator AngII-metabolite angiotensin 1-7 did not elicit vasomotor response of the carotid rings in either group. Removal of endothelium enhanced contraction to AngII in both groups, and this was significantly more so in LP offspring. Blockade of endothelin formation with phosphoramidon did not modify cumulative dose response curves to AngII in either group. AT₁R expression in carotid arteries as assessed by Western blotting was significantly increased in LP whereas SOD expression was not different between groups. Superoxide dismutase (SOD) analogue Tempol normalized LP without modifying CTRL response to AngII.

Basal levels of superoxide production, measured using lucigenin-enhanced chemiluminescence and the oxidative fluorescent dye hydroethidine, were significantly higher in LP offspring. AngII markedly increased superoxide production in LP offspring only; co-incubation of the aortic segments with

diphenylene iodonium (DPI, inhibitor of flavin containing enzyme) or apocynin (inhibitor of the assembly of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase complex) prevented the increased in superoxide generation observed in the presence of AngII and decreased the superoxide levels to values comparable to CTRL. **Conclusion:** In conclusion, vasoconstriction to AngII is exaggerated in a model of *in utero* programming of hypertension associated with exposure to a low protein diet during gestation, secondary to enhanced vascular production of superoxide anion owing to the activity of NADPH oxidase with concomitant increase of AT₁R.

KEY WORDS:

Fetal programming, hypertension, oxidative stress, Angiotensin, isolated vessels.

Table des matières

Page de présentation	i
Identification du jury	ii
Résumé en français	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xii
Remerciements	xiii
Participation des coauteurs dans l'article	xv

I) Introduction.....	page 1
A) Importance des maladies cardiovasculaires en santé publique.....	page 1
B) Brève revue des données humaines et animales supportant le concept de programmation développementale de l'hypertension artérielle.....	page 1
C) Brève revue des mécanismes connus à ce jour sous-tendant le concept de programmation développementale	page 4
i) Les glucocorticoïdes	page 4
ii) Le système rénine-angiotensine (SRA)	page 5
iii) Les reins	page 7
iv) Les radicaux libres.....	page 8
v) Les mécanismes moléculaires	page 8
D) Revue des voies par lesquelles l'angiotensineII peut exercer son effet vasomoteur ou qui modulent son effet vasomoteur.....	page 10
i) AT1	page 12
ii) AT2	page 13
iii) Implication possible de l'angiotensine(1-7) sur la réponse vasomotrice à l'angiotensineII.....	page 13
iv) Implication possible de l'endothélium sur la réponse vasomotrice à l'angiotensineII	page 14

vi)	Implication possible de la nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxydase sur la réponse vasomotrice à l'angiotensineII	page 15
II)	Objectifs de la Maîtrise.....	page 18
III)	Article: Exaggerated vasomotor response to angiotensin II in rats with fetal programming of hypertension associated with exposure to a low protein diet during gestation.....	page 19
IV)	Résultats complémentaires	page 60
V)	Discussion.....	page 61
A)	La vasoréactivité à l'angiotensine II	page 61
B)	Les mécanismes potentiellement impliqués dans ce phénomène	page 62
i)	Le remodelage vasculaire.....	page 62
ii)	AT1 et AT2.....	page 63
iii)	L'endothelium.....	page 65
iv)	L'angiotensine(1-7).....	page 67
v)	Les espèces réactives de l'oxygène.....	page 68
VI)	Conclusion	page 72
VII)	Perspectives.....	page 73
VIII)	Références bibliographiques	page 74

Liste des figures

- Figure 1 :** A- Vasocontraction en réponse à l'AngII dans les deux groupes
B- Effet des antagonistes des récepteurs d'AT1 (Losartan) et d'AT2 (PD123319) sur la réponse vasocontractile à l'AngII dans le groupe LP.
C- Effet des antagonistes des récepteurs d'AT1 (Losartan) et d'AT2 (PD123319) sur la réponse vasocontractile à l'AngII dans le groupe CTRL.
- Figure 2 :** A- Vasocontraction en réponse au KCl 80 mM dans les deux groupes.
B- Vasocontraction en réponse à l'analogue du thromboxane A2, le U46619 dans les deux groupes
- Figure 3 :** A- Vasocontraction en réponse à l'AngII des artères carotides avec (+) et sans (-) endothélium dans le groupe LP.
B- Vasocontraction en réponse à l'AngII des artères carotides avec (+) et sans (-) endothélium dans le groupe CTRL.
- Figure 4 :** A- Vasocontraction en réponse à l'AngII des artères carotides en présence (+) et absence (-) de phosphoramidon dans le groupe LP.
B- Vasocontraction en réponse à l'AngII des artères carotides en présence (+) et absence (-) de phosphoramidon dans le groupe CTRL.
C- Courbe dose-réponse à l'Ang(1-7) dans le groupe LP.
D- Courbe dose-réponse à l'Ang(1-7) dans le groupe CTRL.
- Figure 5 :** A- Vasocontraction en réponse à l'AngII sur des artères carotides en présence (+) et absence (-) de tempol dans le groupe LP.
B- Vasocontraction en réponse à l'AngII sur des artères carotides en présence (+) et absence (-) de tempol dans le groupe CTRL.
- Figure 6 :** A-Mesure par chemiluminescence de la production d'anions superoxide dans les deux groupes.
B- Section d'aorte, après traitement par l'hydroéthidine, dans le groupe LP.

C- Section d'aorte, après traitement par l'hydroéthidine, dans le groupe CTRL.

Figure 7 : Immunobuvardage Western du récepteur AT1 de l'angiotensineII et de la superoxide dismutase (SOD) dans les deux groupes.

Tableau 1 : (-log EC₅₀) et Emax de différents agents sur les artères carotides des rats CTRL et LP.

Abréviations

AngII, angiotensine II

Ang (1-7), angiotensin (1-7)

ACE, enzyme de conversion de l'angiotensine

ACE2, enzyme de conversion 2 de l'angiotensine

AT1 et AT2, récepteurs AT1 et AT2 de l'angiotensine II

AT1a et AT1b, sous types du récepteur AT1 chez le rat

CMLV, cellules musculaires lisses vasculaires

CTRL, petits de rates ayant reçu une diète contrôle durant leur gestation

DPI, diphenyleiodonium

(-logEC₅₀), traduit la sensibilité des artères carotides vis-à-vis des agents utilisés.

E_{max}, traduit la concentration maximale observée.

ECE, enzyme de conversion de l'endothéline

ET-1, endothéline 1

ETA et ETB, récepteurs de l'endothéline

ERO, espèces réactives de l'oxygène

FRDE, facteurs relaxants dérivés de l'endothélium

HE, hydroethidium

HTA, hypertension artérielle

LP, petits de rates ayant reçu une diète faible en protéine durant leur gestation

n, nombre d'animaux

NADPH oxydase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase

NO, monoxyde d'azote

O₂⁻, anion superoxide

PGI₂, prostacycline

Rats SHR, spontaneously hypertensive rats

Rats SD, Sprague-Dawley rats

SOD, superoxide dismutase

SRA, système rénine-angiotensine

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier très chaleureusement ma Directrice de Maîtrise, la Docteur Anne Monique NUYT qui m'a acceptée dans son laboratoire. J'apprécie tout particulièrement la qualité de son encadrement, sa totale disponibilité et son soutien. C'est un réel plaisir de travailler en sa compagnie et je suis très heureuse de pouvoir continuer mon doctorat avec elle.

Je tiens à remercier le Docteur Fernand GOBEIL Junior, mon codirecteur, qui a eu la gentillesse de me prendre en stage dans son laboratoire et de m'encadrer avec beaucoup de compétence et de disponibilité dans mes travaux de recherche et de rédaction.

Je remercie également, Madame Nathalie Germain attachée de recherche de notre laboratoire, Mademoiselle Véronique GARIÉPY, stagiaire dans notre laboratoire ainsi que Madame Suzanne SAMARANI étudiante/assistante de recherche du Docteur Ali AHMAD, pour leurs aides précieuses et leurs conseils.

Je souhaite remercier la Docteur Rhian M TOUYZ, ainsi que les Docteurs Pierre HARDY et Jean ST-LOUIS d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Par ailleurs je souhaite remercier Madame Claire ST-ONGE, commis senior du Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine pour toute son aide, sa disponibilité et son efficacité dans la mise en page de mon mémoire.

Pour terminer, je remercie particulièrement l'ensemble du personnel de l'animalerie de l'Hôpital Sainte-Justine pour sa gentillesse, ses conseils et pour les soins prodigués aux animaux.

PARTICIPATION DES COAUTEURS DANS L'ARTICLE

Catherine ZYDORCZYK : j'ai réalisé la quasi totalité des expériences présentées dans ce mémoire ainsi que la rédaction de ce dernier et de l'article.

Gilles CAMBONIE : a participé à ma formation initiale dans le laboratoire et m'a aidée dans les premières expériences.

Jean-Claude LAVOIE : a participé à la mise au point de la détection des anions superoxide par ses connaissances dans l'utilisation des divers appareils utilisés et l'analyse des résultats.

Isabelle LAHAIE et Oanh LÊ : ont réalisé des expériences préliminaires à cette étude.

Suzanne SAMARANI : a participé à la mise au point de l'immunobavardage Western.

Patrick PLADYS : a réalisé également des expériences préliminaires à cette étude ainsi que la mise au point de techniques utilisées.

Pierre HARDY : a été un de mes codirecteurs et a discuté avec Dr Nuyt et moi-même des expériences à réaliser et de leurs résultats.

Luc OLIGNY : a participé à la mise au point du traitement histologique des coupes d'aorte.

Fernand GOBEIL Jr : a été mon principal codirecteur, a contribué aussi bien à mon travail expérimental qu'à la réalisation et correction de mon article.

Anne Monique NUYT : a participé à mon encadrement quotidien aussi bien dans mes travaux de recherche que dans la conception et correction de ce mémoire et de l'article.

I) Introduction.

A) Importance des maladies cardiovasculaires en santé publique.

Les maladies cardiovasculaires sont les premières causes de mortalité dans les pays développés et sont destinées à devenir les principales causes de décès à l'échelle planétaire en 2010. Les études épidémiologiques ont révélé que les risques de survenue de maladies telles que l'hypertension, les accidents vasculaires cérébraux et les maladies coronariennes à l'âge adulte pouvaient trouver leurs origines dans les événements qui se sont produits en période prénatale (4; 6; 85). Ces observations ont mené à l'hypothèse selon laquelle les adaptations métaboliques et physiologiques du fœtus lors d'une période de privation conduisaient à une altération permanente dans la mise en place des structures et des fonctions cardiovasculaires induisant alors un dysfonctionnement de ces structures à l'âge adulte (6). Ce concept a été supporté par de nombreuses études animales (77; 158), cependant les mécanismes sous-tendant cette programmation développementale ne sont pas totalement élucidés.

B) Brève revue des données humaines et animales supportant le concept de programmation développementale de l'hypertension artérielle.

Même s'il est bien établi que l'environnement intra-utérin a un impact sur la santé et le développement de l'enfant (89), le concept de programmation développementale de pathologies survenant à l'âge adulte est relativement récent.

Barker et al démontrèrent qu'un petit poids de naissance ainsi que le poids à l'âge d'un an, qui tous deux restaient inférieurs à la moyenne rencontrée à ces âges, étaient

associés à une augmentation du risque de mortalité par maladies cardiovasculaires ou par attaques vasculaires cérébrales, cela aussi bien chez les hommes que les femmes nés à Hefshire (UK) entre 1911 et 1930 (7; 110). Une autre étude d'importance fut réalisée aux Etats-Unis sur une cohorte de 22846 hommes et montra qu'un faible poids de naissance était associé avec des maladies chroniques survenant à l'âge adulte telles que l'hypertension, le diabète et l'obésité (22).

Cette association entre un faible poids de naissance et la survenue de pathologies à l'âge adulte a été observée à travers le monde dans une large variété de population d'âge divers (4 à 84 ans) et aussi bien chez les hommes que chez les femmes (47). Bien que cette association entre le poids de naissance et les pathologies cardiovasculaires ne fasse pas l'unanimité, la majorité des études épidémiologiques démontre une relation inverse entre le poids à la naissance et la survenue de pathologies telles que l'intolérance au glucose, le dysfonctionnement endothélial et l'obésité: toutes ces pathologies ont un impact sur l'incidence d'hypertension et de maladies cardiovasculaires (63; 84; 136).

En dépit de ces études, le concept de programmation développementale de pathologies adultes reste controversé. La principale critique est que cette association entre un faible poids de naissance et la survenue de pathologies à l'âge adulte est contrefaite et qu'elle résulte de la réunion de facteurs issus des caractéristiques parentales, tel que le faible statut socio-économique, un phénotype spécifique déterminant ainsi le faible poids observé à la naissance ainsi que la survenue de pathologies cardiovasculaires à l'âge adulte (119). En effet, Barker et al ont aussi démontré (7) que l'environnement et l'hérédité pouvaient moduler "l'effet" d'un faible

poids de naissance: des enfants de 10 ans qui vivaient dans une région avec un fort taux de mortalité par maladies cardiovasculaires avaient une mère de petite taille et présentaient également une plus petite taille ainsi qu'un rythme cardiaque au repos plus élevé en comparaison aux enfants vivant dans des régions avec un taux de mortalité par maladies cardiovasculaires plus faible.

En 1994, Barker et al ont proposé que la nutrition maternelle soit la principale cause de la programmation développementale (5) et qu'un statut nutritionnel maternel non optimal perturbait suffisamment le développement du fœtus pour induire un accroissement de la susceptibilité à développer des pathologies à l'âge adulte. En effet Thame et al (142) ont étudié une large population de femmes Jamaïcaines et rapportèrent que le poids observé à la naissance était corrélé aux indices de statut nutritionnel de la mère avant la grossesse tels que la taille, le poids et l'indice de masse corporelle (IMC). L'impact de la diète maternelle sur la pression sanguine de l'enfant a été mis en évidence dans des populations d'Angleterre, de Jamaïque et d'Inde dans lesquelles il a été constaté une élévation de la pression sanguine chez les enfants et les adultes nés de mères ayant consommé peu de protéines animales durant leur grossesse (19) ou qui étaient déficitaires en fer (36; 41; 137).

En dépit des évidences suggérant un impact de la nutrition maternelle sur la programmation développementale, des données recueillies lors de la famine en Hollande de l'hiver 1944 (123), du siège de Leningrad en 1942, ainsi que des enquêtes du Medical Research Council sur la nutrition en Gambie, ont démontré que la famine et les variations dans l'apport en nutriments peuvent n'avoir que peu d'effets sur le poids à la naissance.

Cependant, il a été démontré que des enfants dont les mères consomment peu de protéines par rapport aux carbohydrates durant le dernier trimestre de grossesse présentent une pression sanguine plus élevée à l'âge adulte; cela signifie donc que la programmation de l'hypertension n'est pas autant liée à la quantité absolue de nutriments mais serait plutôt liée à un déséquilibre en macronutriments. Ainsi, ce déséquilibre pourrait donc induire la programmation développementale de pathologies cardiovasculaires à l'âge adulte sans pour autant altérer le poids de naissance.

Ce concept de programmation développementale est supporté par de nombreux modèles animaux qui ont montré qu'une restriction de protéines ou qu'une restriction globale en nutriments durant la gestation conduisait dans la descendance à une augmentation de la résistance à l'insuline (19; 72; 72), de la pression artérielle (73; 112) ainsi que du dysfonctionnement vasculaire (14; 54; 70).

C) Brève revue des mécanismes connus à ce jour sous-tendant le concept de programmation développementale.

i) Les glucocorticoïdes.

Les glucocorticoïdes sont des hormones puissantes pour le tissu fœtal (88; 124). Pour le développement normal du fœtus, les concentrations des glucocorticoïdes circulantes (cortisol chez l'homme; corticostérone chez le rat) sont très basses comparées à celles retrouvées dans le système maternel, et l'isolement de la circulation fœtale des glucocorticoïdes d'origine maternelle est cruciale (21). Cette séparation est achevée grâce à l'activité de la 11 β hydroxysteroid deshydrogénase de type 2 (11 β HSD2), enzyme

responsable de la conversion au niveau du placenta des glucocorticoïdes actifs en forme inactive (29). Il a été démontré chez les femmes dont le fœtus présente un retard de croissance et chez la rate gestante recevant une diète faible en protéines que la 11 β HSD2 placentaire était diminuée exposant alors les fœtus à un excès de glucocorticoïdes d'origine maternelle. L'inhibition des glucocorticoïdes d'origine maternelle par le Metyrapone, en plus de l'administration d'une diète faible en protéines à une rate gestante, prévient l'augmentation de la pression sanguine chez la descendance (75). L'hypertension induite par un déséquilibre en nutriments dépend donc de la production de glucocorticoïdes maternels et cela semble résulter d'une augmentation de l'accessibilité des glucocorticoïdes aux tissus fœtaux via le placenta.

ii) Le système rénine-angiotensine (SRA).

Les composants du SRA sont des éléments clés dans le contrôle de la pression sanguine. Au niveau systémique et au niveau de la plupart des organes, la génération de vasoconstricteurs comme l'angiotensine II (AngII) conduit à une augmentation de la résistance vasculaire et de la pression sanguine.

Chez l'homme, il a été rapporté que l'activité de la rénine au niveau du sang de cordon ainsi que le nombre de cellules contenant la rénine au niveau rénal sont augmentées chez les nouveaux-nés présentant un retard de croissance intra-utérin (65; 66; 140). Chez les rats (fœtus, nouveaux-nés et adultes), ayant été exposés à une diète faible en protéines in utero (9% caséine (LP) versus 18% caséine (CTRL)), les niveaux d'activité de la rénine et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), transformant l'AngI en AngII, sont augmentés (74; 82). Il a été démontré que

l'hypertension est prévenue en bloquant la formation d'AngII, mais non pas par l'utilisation de bloqueurs calciques, chez des rats LP âgés entre 2 et 4 semaines. Cependant cet effet à long terme sur la tension artérielle n'est pas retrouvé lorsque l'administration d'inhibiteurs de l'ECA est réalisée chez des rats adultes, indiquant ainsi le rôle d'une activation précoce du SRA dans la programmation développementale de l'hypertension artérielle (78; 131).

Nous avons pour notre part ainsi que d'autres groupes démontré que l'augmentation de la tension artérielle observée dans le groupe LP adulte pouvait être normalisée en bloquant les effets centraux et périphériques de l'AngII (117). De plus, nous avons démontré que l'augmentation de la tension artérielle en réponse à une infusion d'AngII est plus importante chez les rats adultes LP que chez les rats adultes CTRL (118). L'AngII circulante peut augmenter la tension artérielle en se liant à des récepteurs AT1 centraux et/ou périphériques (vasculaires) (78; 79). Nous avons montré que l'expression du récepteur AT1 est significativement augmentée au niveau des noyaux cérébraux impliqués dans le contrôle de la tension artérielle (117). Cependant, il n'est pas connu si la réponse vasculaire périphérique à l'AngII est augmentée chez les rats LP, et si cela est associé à une augmentation de l'expression d'AT1 vasculaire; cette question est le sujet des travaux de Maîtrise présentés dans ce mémoire (voir objectifs de Maîtrise p18).

Cette augmentation de l'activité et de l'expression du SRA pourrait être expliquée par les glucocorticoïdes. En effet, il a été démontré que les glucocorticoïdes augmentent l'expression de l'ARNm d'AT1 et de l'angiotensinogène (précurseur de l'AngI) au niveau de régions spécifiques du cerveau impliquées dans le contrôle central du système

cardiovasculaire (1; 17). De plus l'augmentation de la tension artérienne en réponse à l'AngII, mais non pas en réponse à la noréphrine, est accentuée chez fœtus de mouton après infusion de cortisol (139).

Toutes ces données démontrent le rôle majeur du SRA central et périphérique dans le maintien de l'hypertension programmée durant la vie fœtale.

iii) Les reins.

Brenner et al ont les premiers suggéré qu'une perturbation dans la croissance des reins pouvait jouer un rôle dans le développement de l'hypertension artérielle (90). Des nouveau-nés avec retard de croissance intra utérin de même que des rats exposés à une diète faible en protéine durant toute la gestation semblent avoir des reins plus petits et avec moins de néphrons (7; 36; 52; 53; 63; 68; 80; 84; 84; 93; 135; 150). Le nombre de néphrons est diminué chez les patients avec hypertension artérielle primaire (64). Il est intéressant de noter que les facteurs impliqués dans une néphrogenèse altérée, bien qu'incomplètement compris, incluent une exposition à une diète faible en protéine in utero, une exposition du fœtus à des niveaux élevés de glucocorticoïdes à certaines périodes critiques de la néphrogenèse et à un déficit en vitamine A (qui est un antioxydant) (157).

iv) les radicaux libres.

Dans les maladies cardiovasculaires et notamment l'hypertension, l'équilibre entre l'oxide nitrique (NO) et les espèces réactives de l'oxygène (ERO) est perturbé, et il a été envisagé que durant la grossesse, ce phénomène pouvait se retrouver conduisant alors à une altération du milieu fœtal.

Il a été montré chez les rats SHR, une diminution dans la disponibilité du NO et une augmentation dans celle des ERO (69), notamment de l'anion superoxide (130). L'ajout de glycine à une diète faible en protéines durant la gestation prévient l'apparition d'une hypertension dans la descendance; ceci pourrait s'expliquer par une augmentation dans la disponibilité du NO et l'élimination des ERO (61). L'arginine est le substrat commun pour la synthèse de NO et de polyamines via la NO synthase (NOS) et l'ornithine decarboxylase (35). Le NO est un facteur essentiel dans la régulation du flot sanguin maternel-fœtus et par conséquent dans le transfert en nutriments et oxygène de la mère au fœtus (12). Les polyamines pour leur part régulent la synthèse d'ADN et de protéines, par conséquent ont un rôle dans la prolifération et la différenciation (60; 120). Ces observations démontrent donc un rôle pour le NO et les polyamines dans l'embryogenèse et la croissance placentaire et fœtale. Nous pouvons donc postuler que leur réduction –secondaire à un apport réduit en arginine par exemple- pourrait mener à une réduction de croissance intra-utérin (RCIU) et à des pathologies cardiovasculaires chez l'adulte.

v) Les mécanismes moléculaires.

Il est reconnu maintenant que le statut nutritionnel maternel peut altérer le statut épigénétique du génome fœtal modifiant ainsi l'expression des gènes fœtaux.

Les altérations épigénétiques se définissent comme des altérations stables de l'expression des gènes à travers les modifications covalentes de l'ADN ou du core des histones. Elles se produisent très tôt chez l'embryon, et pourraient avoir des conséquences sur les étapes du développement (155). Les deux mécanismes responsables des effets épigénétiques sont la méthylation de l'ADN (du côté 5' des résidus cytosine dans les dinucléotides CpG) et la modification des histones (acétylation et méthylation) (62).

La méthylation des dinucléotides CpG peut réguler l'expression des gènes en modulant la liaison protéines-ADN sensible au méthyl et affecter par conséquent la conformation de la chromatine. L'acétylation ou la méthylation des histones peuvent altérer le positionnement des interactions histones-ADN, donc altérer la liaison des histones à l'ADN et en final altérer l'expression des gènes (62).

Donc les modifications dans la méthylation de l'ADN et des histones pourraient être altérées par la disponibilité en acides aminés et en nutriments. Ce concept est supporté par de nombreuses constatations. Tout d'abord il a été démontré chez des embryons de souris en culture que la déficience en acide aminé conduisait à une réduction importante dans la méthylation de l'ADN et à une expression aberrante d'un gène d'empreinte paternel qui normalement reste silencieux (27). Une insuffisance uteroplacentaire provoque au niveau rénal une méthylation du gène P53 (114) ainsi qu'une hypométhylation globale de l'ADN et une augmentation de l'acétylation des histones au niveau hépatique chez le rat après la naissance (91). La méthylation des dinucléotides CpG peut être augmentée par un supplément maternel en donneur de

methy l tel que l'acide folique, la vitamine B12, la choline conduisant à un pattern de méthylation restreint à l'âge adulte (155).

Ces modifications épigénétiques n'ont cependant pas encore été démontrées dans des gènes impliqués dans le contrôle de la tension artérielle.

D) Revue des voies par lesquelles l'AngII peut exercer son effet vasomoteur ou qui modulent son effet vasomoteur.

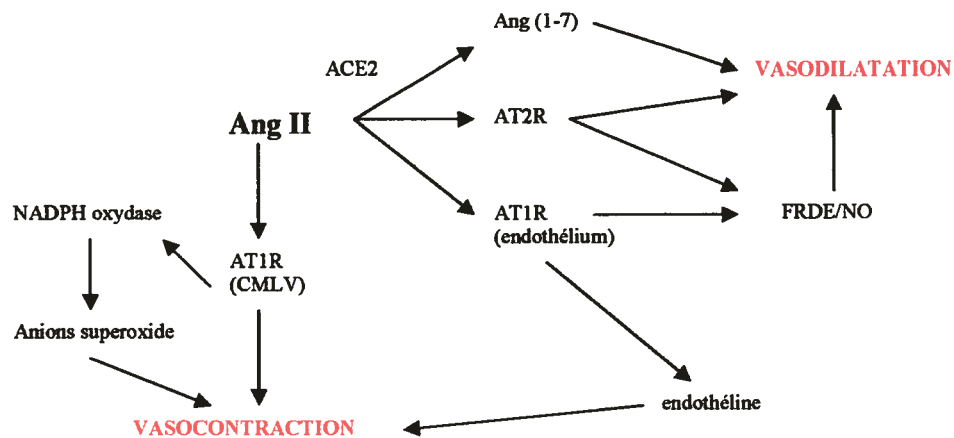
L'AngII est le principal peptide effecteur du SRA. L'AngII exerce ses actions principalement par des récepteurs spécifiques présents à la surface de la cellule et appartenant à la super famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Chez l'homme, deux récepteurs pour l'AngII ont été identifiés (156) et ont été désignés AT1 et AT2 (16). La majorité des effets physiologiques de l'AngII ont été démontrés comme étant exercés par AT1, plus précisément la vasoconstriction, la rétention rénale d'eau et de sel et au niveau central le contrôle de la soif, l'activation de l'activité sympathique efférente, la sécrétion de vasopressine et l'inhibition du baroreflexe artériel (23). Le récepteur AT1 prédomine dans pratiquement tous les tissus vasculaires de la plupart des espèces. Chez l'homme, AT1 est retrouvé en quantité élevée dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), à des taux plus faibles dans l'adventice et au niveau de l'endothélium (2), (13; 164).

Chez les rongeurs, deux sous type du récepteur AT1 ont été identifiés genotypiquement: AT1a et AT1b; ces deux sous types cependant ne sont pas différentiable pharmacologiquement. Chez le rat adulte, le sous type AT1a (le sous type

AT1b n'est pas présent au niveau du tissu vasculaire) est principalement exprimé dans les CMLV et les cellules endothéliales.

AT2 est très fortement exprimé durant la vie fœtale (42) notamment au niveau du mésenchyme (48) et son expression diminue très rapidement après la naissance. AT2 ne semble être que peu exprimé au niveau du lit vasculaire. Toutefois, l'expression d'AT2 augmente de nouveau après des lésions au niveau des artères carotides mais il a été montré qu'AT2 n'était pas impliqué dans la formation néointimale après blessure vasculaire (48).

Voies par lesquelles l'AngII médie ses effets vasomoteurs



D'après (86, 48, 165)

i) AT1.

Tel que déjà mentionné ci-dessus, l'AngII est responsable d'une vasoconstriction importante par l'activation d'AT1 situé sur les CMLV. AT1 active de nombreuses voies de signalisation: l'activation de la phospholipase C (PLC) par la protéine G conduit à l'hydrolyse du phosphatidyl inositol et à la formation du diacyl glycérol (DAG) et de l'inositol trisphosphate (IP3). Ce dernier mène à une augmentation du calcium intracellulaire et à la contraction des CMLV. Une fois activée par le DAG, la protéine kinase C (PKC) permet la phosphorylation de protéines qui participent non seulement à la vasoconstriction, mais également à la croissance cellulaire. Une autre voie vient s'ajouter à celle-ci, celle des mitogen-activated protein kinase (MAPK). Elles appartiennent à la superfamille des protéines kinases sérine/thréonine et sont impliquées dans de nombreuses voies de régulation intracellulaires dont la contraction vasculaire. Il a été démontré que l'AngII peut activer les trois principales MAPK (ERKs, JNK/stress-activated protein kinases, p38) et l'utilisation d'inhibiteurs des MAPK conduit à une diminution de la contraction prolongée à l'AngII chez le rat SHR (145).

Dans le mur vasculaire, les espèces réactives de l'oxygène (ERO), notamment les anions superoxide, peuvent être générés par l'endothélium et l'adventice mais également au niveau des CMLV. La génération d'ERO est notamment régulée par l'AngII via le récepteur AT1 (24). Il a été démontré que la principale source d'ERO dans la paroi vasculaire est la NADPH oxydase non phagocytaire.

De plus il a été trouvé chez l'adulte souffrant d'hypertension artérielle que la génération d'anions superoxide est médiée par la stimulation de la NADPH oxydase par l'AngII (10; 43; 99; 144).

ii) AT2.

AT2 pourrait avoir un rôle physiologique dans la régulation de la pression sanguine et dans la fonction rénale contrebalançant les actions vasocontractiles et antinatriurétiques de l'AngII. Il a été montré que ce récepteur possédait un effet indirect sur la vasodilatation en favorisant la relâche de bradykinine, de prostaglandine et de NO diminuant ainsi la résistance périphérique (3; 100; 132), ainsi qu'un effet direct sur la vasodilatation comme décrit in vivo chez le rat SHR (86).

iii) Implication possible de l'angiotensine(1-7) sur la réponse vasomotrice à l'angiotensine II.

L'AngII peut, sous l'action de l'enzyme de conversion 2 de l'angiotensine (ACE2), être métabolisée en angiotensine 1-7 (Ang(1-7)). ACE2 est une carboxypeptidase liée à la membrane (56). L'Ang(1-7) stimule la relâche de la vasopressine, stimule la biosynthèse de prostaglandines et la relâche de NO provoquant un effet relaxant vasculaire et hypotenseur lorsqu'injecté dans certains noyaux cérébraux (31-33). De plus, l'Ang(1-7) possède une action natriurétique (excrétion d'eau et d'électrolytes via une augmentation de la filtration glomérulaire) sur les reins et diminue la résistance réno-vasculaire (25). Ainsi, l'Ang(1-7) peut contrecarrer les principales actions de l'AngII in vivo (32).

iv) Implication possible de l'endothélium sur la réponse vasomotrice à l'angiotensine II.

Il a été montré que l'endothélium était un modulateur local du tonus des CMLV par sa capacité à libérer à la fois des substances vasoconstrictrices (comme l'endothéline) et vasodilatatrices (NO et prostacycline (PGI₂)). L'endothélium peut jouer un rôle dans l'hypertension systémique suite à une production excessive de vasoconstricteurs et/ou un défaut de production de vasodilatateurs (15; 40; 149).

L'endothéline (ET) est un peptide vasoconstricteur (146; 161) sécrété par les cellules endothéliales (50). ET-1 est la plus puissante et la plus abondante des endothélines, elle est sécrétée par les cellules endothéliales vers les CMLV sous jacentes (153). ET-1 exerce ses actions vasoconstrictrices, prolifératives et hypertrophiques via deux récepteurs ETA et ETB, avec cependant une dominance au niveau artériel dans l'expression du récepteur ETA. Le gène de l'ET-1 est tout d'abord transcrit en ARNm pour la synthèse de pré-pro-peptide puis ensuite réduit en pro-peptide ou BIG endothéline, immature, mais qui, sous l'action de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) devient active (129). L'ECE est retrouvée aussi bien au niveau de la membrane des cellules endothéliales que des CMLV. Il a été montré que l'AngII stimule la libération d'ET-1 et que le système endothéline est impliqué dans de nombreuses pathologies parmi lesquelles l'hypertension, l'athérosclérose, les maladies coronariennes et le diabète (128).

Le NO diffuse rapidement à travers les couches de cellules et induit la relaxation des CMLV en activant la guanylate cyclase qui augmente les concentrations de guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Le NO peut-être généré par la NOS endothéliale après activation d'AT2 ou, principalement, de façon endogène constitutive.

La prostacycline (PGI_2) quant à elle est produite par la cyclo-oxygénase. La prostacycline est principalement retrouvée dans les cellules endothéliales. Elle active l'adénylate-cyclase, et en augmentant la production de la 3', 5' adénosine monophosphate cyclique (AMPc) conduit à la relaxation des CMLV. Dans la plupart des vaisseaux sanguins, la PGI_2 ne joue qu'un rôle mineur dans la relaxation endothélium-dépendante, son effet venant surtout s'ajouter à celui du NO.

v) Implication possible de la nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxydase sur la réponse vasomotrice à l'angiotensine II.

Dans le système vasculaire, il existe différents systèmes enzymatiques qui contribuent à la formation des ERO incluant la NOS endothéliale, les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale, le cytochrome P450 monooxygénase, la xanthine oxydase et la nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxydase.

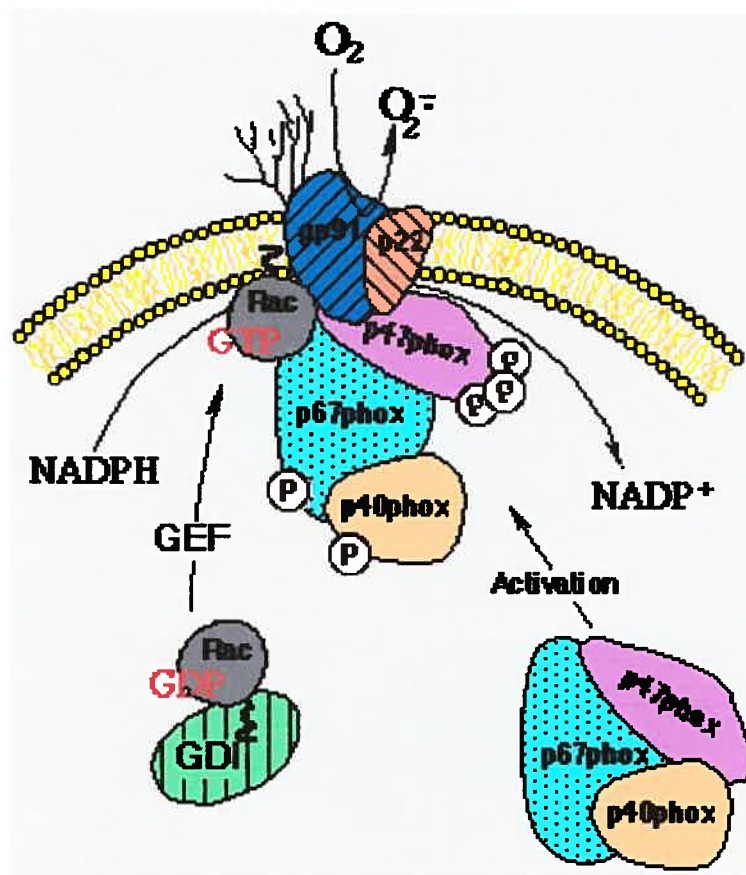
La NADPH oxydase est principalement exprimée au niveau des neutrophiles nucléaires polymorphes, possède un rôle de défense contre les bactéries, est impliquée dans le phénomène de « flambée respiratoire ».

Au niveau leucocytaire, la NADPH oxydase est un complexe enzymatique constitué de trois sous-unités cytoplasmiques (p47^{phox} , p67^{phox} , p40^{phox}). Lorsqu'elle n'est pas stimulée, la NADPH oxydase est constituée d'une protéine G régulatrice (Rac1 ou Rac2) et d'un domaine cytochrome b558 réductase lié à la membrane. Ce cytochrome contient 2 protéines: une petite sous-unité α appelée p22^{phox} et une sous-unité β appelée $\text{gp91}^{\text{phox}}$ (ou Nox2) qui contient les sites de liaison pour la NADPH et pour l'oxygène ainsi que les groupements hème et flavine permettant ainsi le transport d'électrons entre les deux substrats. Une fois stimulée, la sous-unité p47^{phox} devient phosphorilée ce qui

conduit à un changement de conformation dévoilant le site d'interaction à la sous-unité gp91^{phox} permettant une migration des unités cytoplasmiques au niveau membranaire où elles s'associent au cytochrome b558. De plus, la protéine Rac qui est liée au guanosine diphosphate (GDP) doit devenir active en devenant Rac guanosine triphosphate (GTP). Tous ces événements conduisent à l'activation de la NADPH oxydase.

Au niveau vasculaire, chaque type cellulaire vasculaire possède une distribution des sous-unité particulière. p22^{phox} et Nox4 sont exprimés dans toutes les cellules vasculaires (169, 171, 174), gp91 phox prédomine au niveau de l'endothelium (169) et de l'adventice (170), Rac1 et p47^{phox} sont retrouvées dans tous les types cellulaires vasculaires(171), alors que p67^{phox} est retrouvée uniquement au niveau de l'endothélium (172) et de l'adventice (173).

De par cette grande hétérogénéité il n'est pas bien établi quelles sous unités sont activées par les différents stimuli menant à l'activation de la NADPH oxydase. La NADPH oxydase peut-être stimulée par de nombreux facteurs tels que les cytokines, des facteurs de croissance, des agents vasoactifs (dont l'AngII), ainsi que par des facteurs physiques parmi lesquels nous retrouvons les forces de cisaillement oscillatoires et laminaires (13). L'activation de la NADPH oxydase génère des anions superoxide qui influent la fonction des cellules vasculaires en modulant la constriction, la croissance cellulaire, l'apoptose, la migration, l'inflammation et la fibrose (166).



La NADPH oxydase leucocytaire: les sous-unités et son activation (www-dsv.cea.fr)

II) Objectifs de la maîtrise.

Cette étude va donc permettre de vérifier si la réponse vasculaire périphérique des artères carotides (ex-vivo en chambre d'organe) à l'AngII est augmentée chez les rats adultes ayant été exposés à une diète faible en protéines in utero (LP) comparés aux contrôles (CTRL). Par la suite afin de définir quel est le mécanisme qui sous tend ce phénomène, nous étudierons les voies évoquées ci dessus et qui sont susceptibles d'être impliquées dans cette vasoconstriction exagérée soit: déterminer le rôle des sous-type de récepteurs d'AngII, de l'endothélium, de l'endothéline, de l'ang1-7, de la genèse anion superoxide par la NADPH oxydase. Puisque, nos résultats ont montré une normalisation de la vasoconstriction en réponse à l'AngII dans le groupe LP en présence d'un analogue de la superoxide dismutase, le tempol, nous avons aussi mesuré la production vasculaire d'anions superoxide.

III) Exaggerated vasomotor response to angiotensin II in rats with fetal programming of hypertension associated with exposure to a low protein diet during gestation

C Zydorczyk¹, F Jr Gobeil², G Cambonie¹, I Lahaie¹, NLO Lê¹, S Samarani¹, JC Lavoie¹, LL Oligny¹, P Pladys¹, P Hardy¹ and AM Nuyt¹

Research Center, Hôpital Sainte-Justine, Departments of Pediatrics, Pharmacology and Pathology, Université de Montréal, Canada, H3T1C5 and ¹Department of Pharmacology, Université de Sherbrooke, Canada. G.C. current address : Service de réanimation pédiatrique et néonatale, Hôpital Arnaud de Villeneuve, 34295 Montpellier, France. P.P. current address: Unité de médecine néonatale, Hôpital Sud, CHU Rennes, 16 Bd de Bulgarie, BP 90347, 35203 Rennes Cedex 2, France.

Running title: Vasomotor response to AngII in programmed hypertension

Correspondence:

Anne Monique Nuyt, MD

Research Center, Hôpital Sainte-Justine

Department of Pediatrics

University of Montreal

3175 Côte Sainte-Catherine

Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5

Telephone: (514) 345-4931, #3971; Fax: (514) 345-4801

E-mail: [REDACTED]

Acknowledgments and Funding

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (AMN), the Hospital for Sick Children Foundation (PH and AMN) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (AMN). Patrick Pladys was supported by an Institut National de Santé et Recherche Médicale (France) and the Canadian Institutes of Health Research (INSERM-CIHR) research fellowship and by the Conseil Régional de Bretagne. Anne Monique Nuyt, Pierre Hardy, and Fernand Gobeil Jr are recipients of Junior scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and researchers of the Canada Foundation for Innovation. We thank Dr Rhian M Touyz for critical reading of the manuscript and helpful suggestions.

Exaggerated vasomotor response to angiotensin II in rats with fetal programming of hypertension associated with exposure to a low protein diet during gestation

C Yzydorczyk, F Jr Gobeil, G Cambonie, I Lahaie, NLO Lê, S Samarani, JC Lavoie, LL Oigny, P Pladys, P Hardy and AM Nuyt

ABSTRACT:

The renin angiotensin system (RAS) has been shown to play a key role in the initiation and maintenance of elevated blood pressure associated with altered intra uterine milieu. In adult offspring of dams fed a low protein (LP) diet during gestation, plasma renin activity is increased, elevated blood pressure is normalized by angiotensin-converting enzyme inhibitor and pressor response to infusion of angiotensin II (AngII) is increased. Circulating AngII increases blood pressure through peripheral and central mechanisms. In this regard, we have previously demonstrated an enhanced expression of AngII AT₁ receptor (AT₁R) in brain cardiovascular regulating areas of adult LP offspring and normalization of their blood pressure with intracerebroventricular injection of the angiotensin-converting enzyme inhibitor enalaprilat or the AT₁R antagonist losartan. The current studies were undertaken to verify whether peripheral vascular response to AngII is also increased in LP offspring compared to control (CTRL).

AngII-induced contraction of carotid rings studied in organ chambers was increased in LP (E_{max} relative to maximal response to KCl 80 mM: 230 ±3% LP vs. 201 ±2% CTRL, p<0.05). In both groups, contraction to AngII was inhibited by AT₁R but not AT₂R antagonists. There was no difference between groups in the response to increasing concentrations of thromboxane A₂ analogue U46619 and neither to KCl 80 mM under step increases in tension. Removal of endothelium enhanced contraction to AngII in both

groups, and this was significantly more so in LP offspring. Blockade of endothelin formation with phosphoramidon did not modify cumulative dose response curves to AngII in either group. Vasodilator AngII-metabolite angiotensin 1-7 did not elicit vasomotor response of the carotid rings in either group. Superoxide dismutase (SOD) analogue Tempol normalized LP without modifying CTRL response to AngII.

Basal levels of superoxide production (in aortic segments, measured using lucigenin-enhanced chemiluminescence and the oxidative fluorescent dye hydroethidine) were significantly higher in LP offspring. AngII markedly increased superoxide production (measured by chemiluminescence) in LP offspring only; co-incubation of the aortic segments with diphenylene iodonium (DPI, inhibitor of flavin containing enzyme) or apocynin (inhibitor of the assembly of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase complex) prevented the increased in superoxide generation observed in the presence of AngII and decreased the superoxide levels to values comparable to CTRL. AT₁R expression in carotid arteries as assessed by Western blotting was significantly increased in LP whereas SOD expression was not different between groups.

In conclusion, vasoconstriction to AngII is exaggerated in a model of *in utero* programming of hypertension associated with exposure to a low protein diet during gestation, secondary to enhanced vascular production of superoxide anion owing to the activity of NADPH oxidase with concomitant increase of AT₁R, but not SOD, expression.

KEY WORDS:

Fetal programming, hypertension, oxidative stress, angiotensin, isolated vessels

INTRODUCTION:

Epidemiological studies have revealed that the risk of cardiovascular diseases such as hypertension, stroke and coronary heart disease in later life seem inversely related to birth weight (24) and that this relation is independent of genetic factors and life style (1; 3). These observations led to the postulate that perturbations (of nutrition for example) at a critical period of early development could lead to permanent alterations in the programming of the developing cardiovascular structures or functions (2). Animal studies support the concept of developmental programming of hypertension (18; 20; 26; 50).

The renin-angiotensin system (RAS) has been shown to play a key role in the initiation and maintenance of elevated blood pressure associated with altered intra uterine milieu. Blockade of angiotensin II (AngII) formation or of AngII AT₁ receptor subtype during the first weeks of life prevents later elevation of blood pressure; this permanent effect is not observed when adult animals are treated (43; 44). We and others have demonstrated that in adult offspring of dams fed a low protein (LP) diet during gestation, plasma renin activity is increased, elevated blood pressure is normalized by angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEi) and pressor response to infusion of AngII is increased (21; 27; 35; 36). Circulating AngII increases blood pressure through peripheral and central mechanisms. We have previously demonstrated increased expression of AngII AT₁R in brain cardiovascular regulating areas of adult male LP offspring and normalization of their blood pressure with intracerebroventricular injection of the ACEi enalaprilat or of the AT₁R antagonist Losartan (35).

The current studies were undertaken to verify whether peripheral vascular response to AngII is also increased in adult male LP offspring compared to control

(CTRL) and to explore potential mechanisms underlying the exaggerated vasoconstriction to AngII. For this purpose, vasomotor responses of carotid arteries rings (organ chambers) were studied. As our results support our hypothesis and reveal that exaggerated constriction to AngII is normalized by superoxide dismutase (SOD) analogue Tempol, the vascular production of superoxide anion was also evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Animals were used according to a protocol approved by the Animal Care Committee of Sainte-Justine Hospital in accordance with the principles of the Guide for the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care. Virgin Wistar rats (initial weight 225-250g) were mated overnight and on the day of conception (determined by the presence of a vaginal plug), were allocated to feed *ad libidum* on a diet containing either 18% (control group: CTRL, n = 12; n=number of animals) or 9% (low protein group: LP, n = 11) casein (21). All diets contained 5g/kg methionine to avoid sulphur deficiency and were made isocaloric with starch and sucrose supplement. All dams were weighed daily and had free access to food and water. Within 12 hours of delivery, dams were returned to regular chow. Pups were weaned at 4 weeks of age to regular chow and male were studied at 9-12 weeks of age. Unless specified otherwise, one animal per litter was used for the different studies.

Experimental procedures

Ex vivo vascular reactivity studies

Freshly excised carotid arteries from anesthetized (intraperitoneal ketamine (65 mg/kg) and xylazine (7 mg/kg)) offspring were placed in ice cold modified Krebs bicarbonate solution (KBS) of the following composition (in mM): NaCl 118, KCl 4.7, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, and dextrose 11. They were cleaned of adherent connective tissue and precisely cut into rings of same length (4 mm). Four to eight rings from one rat were used for one experiment. In a separate series of experiments, endothelium was removed in half the rings by gently rubbing the internal lumen with a blunt needle (20 G, Becla Dickinson). Rings were suspended horizontally

between two stainless steel wires in organ chambers that contained 20 mL of KBS maintained at 37°C and aerated continuously with 95% oxygen and 5% carbon dioxide. The tension of the preparations was recorded with a linear force transducer on a computerized data acquisition system (Kent Scientific, Litchfield, CT). The rings were progressively stretched to a preload tension of 19.0 mN and allowed to equilibrate for 30 min with frequent washing and tension adjustments. After stabilization, rings were repeatedly exposed to KCl (80 mM) to test their viability and to determine a standard contractile response for each of them. When response to KCl was stable, endothelial integrity was then assessed in all experiments by a characteristic relaxation response to Carbachol (100 μ M) after contraction evoked by phenylephrine (1 μ M). Rings were then allowed to recover for 60 min after which cumulative concentration-response curves were generated with AngII (1 pM to 1 μ M) in presence and absence (half the rings tested each condition for each experiment) of PD 123319 (0.1 μ M; AngII AT₂R antagonist) or Losartan (1 μ M; AngII AT₁R antagonist), phosphoramidon (1 μ M, neutral endopeptidase (NEP) 24.11 and endothelin converting enzyme inhibitor), Tempol (1 mM, SOD analogue). All drugs were added to the bath 30 minutes before cumulative concentration-response curves. Cumulative concentration-response curves were also generated with the thromboxane A₂ mimetic U46619 (1 pM to 1 μ M) and with angiotensin (1-7) (Ang(1-7), 1 pM to 1 μ M). For the determination of Ang(1-7) vasorelaxant responses, rings were precontracted with U46619 (0.3 μ M) added to the organ chamber 15 minutes before. For the experiments in which the endothelium had been mechanically removed, absence of vasorelaxation to Carbachol after normal vasoconstriction to KCl and phenylephrine was verified prior to the generation of the

concentration-response curve to AngII. To verify whether antenatal diet exposure was associated with vascular remodeling, we also studied vasoconstriction to KCl (80 mM) under different tension applied to the carotid arteries rings (52).

Evaluation of vascular production of superoxide anion by chemiluminescence

Vascular superoxide production was estimated using lucigenin-enhanced chemiluminescence, as described (4; 25). Briefly, in an additional set of experiments, aortas were removed from anesthetized rats and cut into segments. Aortic rings (5 mm) were placed in polypropylene tubes each containing 0.5 ml of Krebs and lucigenin (5 μ M). Chemiluminescence counts (expressed in relative light units) were measured (LS 6500 Multi-purpose Scintillation Counter, Beckman Coulter) during 15 min (one reading/min) after preincubation for 30min with Krebs solution, Krebs solution + AngII (1 μ M), Krebs solution + AngII (1 μ M) + diphenylene iodonium (DPI) (100 μ M, inhibitor of flavin containing enzyme) or Krebs solution + AngII (1 μ M) + apocynin (1 mM, inhibitor of the assembly of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase complex). Background counts (Krebs solution alone) were subtracted from the counts obtained with vascular rings. Dry weight was obtained for each ring for normalization of activity.

Evaluation of vascular production of superoxide anion by hydroethidine

Superoxide levels were also measured by the oxidative fluorescent dye hydroethidine, as described previously (28). Cells are permeable to hydroethidine and, in the presence of superoxide anion, hydroethidine is oxidized to fluorescent ethidium bromide, in which form it is trapped by intercalation with DNA. This method provides detection of superoxide anion levels intra and extra cellular.

Briefly, unfixed frozen aorta segments were cut into 12 μm thick sections with a cryostat (Microm Cryostat, Germany) at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and thaw-mounted on microscope slides (Superfrost, VWR Scientific, PA). Hydroethidine (2 μM) was applied to each tissue section and coverslipped. Then, slides were incubated in a light-protected humidified chamber at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30min. Images were obtained with a laser scanning confocal microscope (LSM 510 laser scanning microscope, Zeiss) equipped with a argon laser. Fluorescence was detected with a 514-nm long-pass filter. The LP and CTRL offspring were processed and imaged in parallel.

Western blotting

Western blot analysis of AngII AT₁ receptor subtype and of SOD enzyme was performed on carotid arteries of 9-12 weeks old male (LP: n = 4 from 3 litters and CTRL: n = 5 animals from 3 litters). Frozen arterial tissues were disrupted using mortar and pestle in liquid nitrogen. Proteins were extracted with RIPA buffer supplemented with Nonidet P40 (1%), Na₃VO₄ (1 mM), NaF (1 mM), EDTA (1 mM) and 1x solution of cocktail protease inhibitors (Roche). Samples were sonicated, centrifuged and supernatant recovered for determination of protein content by Bradford assay using BSA as standard. For each experiment, tissues were pooled and blots were performed on equal amounts (30 μg) of total crude extract of protein. Polyclonal anti- β actine (Santa Cruz Biotechnology) was used as internal control. Equal loading of proteins for SDS-PAGE was also verified by Ponceau staining. The antibodies used were the polyclonal anti-AngII AT₁ receptor subtype (Santa Cruz Biotechnology) and polyclonal anti-Cu/Zn SOD (Calbiochem).

Chemicals

The following agents were purchased: ketamine (Ayerst, Montreal, QC); xylazine (Bayer); AngII, Ang(1-7), apocynin, phosphoramidon, Carbachol, phosphate buffer, EDTA, DPI, bovine serum albumin, PD123319 and U46619 (Sigma Chemical, St Louis, MO); Tempol (Fluka Chemika), Losartan was a gift of Merck Frosst Canada and Du Pont, Kirkland, QC.

Statistical analysis

Cumulative concentration-response curves were analyzed by computer fitting to a four-parameter sigmoid curve using the Prism 3 program (GraphPad, San Diego, CA) to evaluate the EC_{50} and E_{max} , the maximum asymptote of the curve. For the comparison of superoxide levels detected by chemiluminescence under control conditions versus in the presence of AngII +/- DPI or apocynin, analysis was performed using ANOVA. Comparison of superoxide levels between groups was performed using unpaired Student's t test. All values are expressed as means +/- SE. A p value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Effect of antenatal diet exposure on *ex vivo* vasomotor responses of adult male offspring

The maximal constriction generated by AngII (E_{max}) was significantly increased in LP compared to CTRL offspring; EC_{50} value was not different between groups (Figure 1A). Administration of Losartan nearly totally inhibited the vasoconstriction to AngII, whereas administration of PD123319 was without effect in both groups (Figure 1B and 1C).

The vasoconstriction in response to KCl at different tension was not different between groups, indicating that the tensional force was not different between the groups (Figure 2A). Vasoconstriction in response to U46619 (Figure 2B) was not altered by the different antenatal diet exposure

Vasomotor response to AngII was significantly enhanced after removal of the endothelium in both groups. Percent increase in E_{max} for LP offspring rings in absence versus in the presence of endothelium was significantly more than for CTRL offspring rings (Figure 3A and B).

Phosphoramidon which blocks both endothelin converting enzyme and neutral endopeptidase 24.11 (which converts angiotensin I to Ang(1-7)) slightly but significantly decreased maximal constriction and increased $-\log EC_{50}$ of the cumulative response curves to AngII in both group (Figure 4A and B, Table 1).

As AngII can be metabolized by angiotensin converting enzyme 2 to vasodilator Ang(1-7), its potential role in modulating vasoconstriction to AngII was examined. Cumulative doses of Ang(1-7) elicited no vasomotor effect in

either group. Integrity of the vasorelaxant properties of the rings was verified at the end of each experiment with Carbachol (100 μ M) (Figure 4C and D).

Effect of Tempol on ex vivo vasomotor response to AngII

In the presence of Tempol, maximal vasoconstriction to AngII of LP offspring ring was significantly decreased and $-\log EC_{50}$ significantly increased to values similar to CTRL. Tempol did not modify vasomotor response to AngII of CTRL offspring (Figure 5A and B, Table 1).

Effect of antenatal diet exposure on vascular production of reactive oxygen species

Superoxide production in the aortic artery was measured using lucigenin-enhanced chemiluminescence (Figure 6A). LP offspring basal levels of superoxide were significantly higher than CTRL. AngII further increased significantly superoxide generation in LP offspring only; co-incubation of the aortic segments with DPI or apocynin prevented the increased in superoxide generation observed in the presence of AngII. In the CTRL group, we did not observe differences in the levels of superoxide between baseline conditions and in the presence of AngII +/- DPI or apocynin.

Superoxide production evaluated by the oxidative fluorescent dye hydroethidine was also markedly increased in LP aorta ($n = 6$ vs. CTRL $n = 4$) and localized in vascular smooth muscle cells (Figure 6 B and C).

Western blotting

AT₁R expression in carotid arteries was significantly increased in LP whereas SOD expression was not different between groups (Figure 7).

DISCUSSION

In the current studies we demonstrate exaggerated vascular (carotid arteries) response to AngII in adult male offspring of dams fed a low protein diet during gestation. This enhanced vascular response to AngII seems specific as response to another vasoconstrictor U44619, analogue of thromboxane A₂, was found unaltered in LP compared CTRL offspring. This vasomotor response is mediated by AngII AT₁R subtype, which expression is increased in LP offspring carotid arteries, and by the production of superoxide anions. We found no difference between groups in the carotid arteries expression of SOD. We show that production of superoxide anions is significantly increased in baseline conditions and in response to AngII in LP offspring aortic wall, and that this increased production of superoxide anion is mediated by NADPH oxidase. Our results also show that the exaggerated carotid arteries vasoconstriction to AngII is not caused by increased tensional force of the LP vessels, by a defect in endothelium released relaxing factor or by secondary release of endothelin. Finally, the current results show that in both diet groups vasomotor response to AngII is not mediated by either AT₂R or the Ang(1-7) Mas receptor.

Many studies have demonstrated the key role of the RAS in the initiation and maintenance of hypertension associated with intra-uterine protein restriction. In adult LP offspring, plasma renin activity is increased and blood pressure is normalized by ACEi (21; 35; 36). The activity of ACE, which generates AngII from its precursor angiotensin I, is elevated in LP offspring (although AngII levels are not consistently found increased) (21; 22), which could suggest increased sensitivity of LP offspring to circulating AngII. Supporting this are reports of increased blood pressure response to

intravenously infused AngII in LP adult offspring (27; 36), and the current data examining carotid arteries confirm this is the case.

Vascular hyper responsiveness to AngII, more markedly so than to other vasoconstrictor, has been reported in human and experimental animal models of hypertension (48). However the current study is the first confirming exaggerated vascular response specifically to AngII in an adult hypertension associated with altered antenatal environment. Previous studies have reported no modification in E_{max} response to U46619 and to phenylephrine in pial microvessels and mesenteric arteries (7; 17) although Brawley reported a slight increase in EC_{50} to U46619 in mesenteric arteries at 12 but not 23 weeks (7).

Increased vasomotor response to AngII can be observed in the presence of vascular remodeling and/or increase in the expression of AngII AT_1R subtype, decrease in the expression of AngII AT_2R subtype which favors vasodilatation, or changes in AngII-mediated signal transduction at or beyond the level of the cell membrane receptor as it has been described in other forms of chronic hypertension (48). Alternatively, increased vasoconstriction can be encountered in the presence of defective vasodilation.

Vascular remodeling (which could result in increased tensional force capacity) seem absent in adult LP offspring. Vasomotor response to another potent constrictor U46619 is not different between LP and CTRL offspring. In addition, constriction response curves of both groups to KCl under increasing tensions applied to the rings were nearly identical. These functional data are supported by previous reports by us and others showing no difference between groups in lumen diameter, media cross sectional area, media thickness and media to lumen ratio of the carotid and mesenteric arteries (7; 35).

We identified the AT₁R as the sole receptor implicated in the carotid artery vasoconstriction response to AngII for the two groups (LP and CTRL). Indeed, in both groups, we observed a nearly complete inhibition of the vasoconstriction to AngII when we used Losartan whereas PD123319 did not modify the response to AngII, suggesting that AT₂R is not or functionally weakly expressed in rat carotid arteries (31; 33). However, from the current studies, we can not exclude a role for AT₂R in the resulting hypertension or in the AngII *in vivo* pressor response in this model of programmed hypertension. Indeed, although not in vessels, renal AT₂R mRNA expression is decreased in 4 week old female (but not male) LP offspring (27).

We observed increased carotid expression of AT₁R in LP offspring. Based on the Western blot analysis performed on whole vessels and the vasomotor response elicited by AngII in the absence of endothelium, we can conclude that AT₁R is present on the vascular smooth muscle cells. AT₁R had previously been studied in 4 week old male LP kidneys where protein expression (Western and binding analyses) was found increased (39)(54) but mRNA expression unchanged (27). In another model of fetal programming of hypertension associated with a 50% global nutrient restriction of the dam during gestation, AT₁R mRNA expression is also reported unchanged in mesenteric arteries of adult offspring (11). The underlying factors leading to enhanced AT₁R vascular expression in LP offspring are unknown. One of the most potent element affecting AngII receptor expression is AngII itself. *In vitro* and *in vivo*, AngII decreases vascular smooth muscle cell AT₁R expression (14; 23). Even though ACE and plasma renin activities are increased in adult LP offspring, circulating AngII has been reported as unchanged or inconsistently increased in LP adult offspring (19). However renal tissue AngII is decreased in newborn (51); it could therefore be postulated that this decrease in neonatal

AngII, if it applies also to circulating AngII, could permanently program vascular AT₁R expression. The fact that others have reported unchanged mRNA allows one to consider posttranscriptional and possibly also posttranslational changes in the regulation of AT₁R expression in LP offspring. Factors leading to enhanced expression of AT₁R could also comprise corticosteroids. Exposure of the fetus to elevated levels of corticosteroids has been shown to play a role in programming of hypertension (26). Blood pressure responsiveness to AngII but not to noradrenaline is enhanced in fetal sheep after cortisol infusion (45). In adult rats, glucocorticoids can increase pressor response to AngII and AT₁R expression on vascular smooth muscle cells (41). Whether vascular AT₁R expression is increased from early in development is unknown.

Increased response to AngII in the absence of endothelium raises the possibility that AngII stimulates liberation of endothelial relaxing factor(s). Activation of AT₁R located on endothelial cells can modulate the release of other vasoactive molecules such as nitric oxide (6), prostacyclin (12) and vasoconstrictor endothelin.

We and others reported decreased vasorelaxation to nitric oxide-dependent mechanisms in programmed hypertension *in vivo* (36) and *ex vivo* (7; 17) which seem to be largely attributed to decreased soluble guanylyl cyclase expression and cyclic guanosine monophosphate levels (7; 17; 34). Vasomotor response to prostacycline was studied in adult LP and CTRL offspring pial microvessels and was found unaltered (17). To test the hypothesis that the exaggerated vasoconstriction of carotid arteries could be explained by impairment in endothelium derived relaxant factor release or effect, we depleted the endothelium from the vascular rings of a subgroup of animals. For the two diet groups the vasoconstriction in response to AngII was increased in the endothelium-depleted compared to intact carotids. The fact that vasoconstriction to AngII increased in

both groups in the absence of endothelium suggests either that AngII does stimulate the release of vasorelaxant factors and/or that there is constitutive release of endothelial derived relaxing factors. If increased carotid vasomotor response to AngII had been secondary to defective endothelium derived relaxing factors, the difference between groups in their vasoconstriction to AngII would have been less in the absence of endothelium. On the contrary, the increase in the vasoconstriction response was significantly more in LP offspring suggesting that if some defective endothelium mediated relaxation prevails, exaggerated response of vascular smooth muscle cells to AngII predominates in LP carotid arteries rings. Carotid arteries are conductance and not resistance vessels, and properties of the different vascular beds or vessel type differ (30). Therefore the observation that defective endothelium mediated vasorelaxation does not play a (major) role in the carotid responses to AngII cannot be considered as contradictory with previously published studies (7; 17; 36).

AngII can lead to the synthesis of endothelin (38) thereby increasing vasoconstriction. Endothelin has been shown to play a role in some experimental models of hypertension (DOCA-salt hypertension, Dahl salt-sensitive rats) (42). Phosphoramidon, blocker of endothelin converting enzyme which metabolizes Big endothelin-1 into mature endothelin, slightly and similarly decreased maximal vasomotor response to AngII in both group suggesting that endothelin does not play a major role in the enhanced AngII-mediated vasoconstriction of the carotid arteries from LP offspring. These data are also in agreement with the observation that vasoconstriction was enhanced in the absence of endothelium: if endothelin had mediated part of the response observed to AngII, vasoconstriction to AngII would have decreased in the absence of endothelium.

Phosphoramidon also blocks NEP 24.11 which metabolizes angiotensin I to form Ang(1-7). Ang(1-7) can also be formed from AngII under the action of ACE2. Ang(1-7) through activation of the G protein-coupled Mas receptor can counteract the effects of AT₁R and result in vasodilatation (10; 40). Therefore concentration response curves to Ang(1-7) were generated to examine the potential role of Ang(1-7) in modulating response to AngII and to verify that the absence of modification of the response to AngII in the presence of phosphoramidon was not due to the simultaneous blockade of endogenous Ang(1-7) formation. We observed no vasomotor effect of Ang(1-7) in both groups. From this data, we conclude that vasoconstriction in response to AngII is not modulated by Ang(1-7) in carotid arteries and that Mas receptor seem absent from these arteries. We are not aware of studies demonstrating the presence (or absence) of Mas receptor in rat carotid arteries.

Animals and humans studies have shown that increased vascular reactive oxygen species, especially superoxide anion, contributes significantly to the vascular dysfunction present in hypertension (29). SOD mimetic can normalize blood pressure and regional blood flow in AngII-infused rats (32). In the current studies, SOD mimetic Tempol normalized the enhanced vasoconstriction in response to AngII in the LP offspring and had no effect on the response of the CTRL group, suggesting indeed an increased vascular production of superoxide anion after AngII stimulation in LP but not in CTRL offspring. This is supported by the lucigenin-enhanced chemiluminescence revealing a marked increase in the aortic production of superoxide anion in the presence of AngII in the LP group only, which is inhibited by the addition of DPI. The latter element suggests that AngII increases vascular production of superoxide anion in LP offspring through a flavin containing enzyme. Among all the potential flavin-containing

enzymatic sources of reactive oxygen species, a functional role in adult hypertension has been recognized for NAD(P)H oxidases, uncoupled nitric oxide synthase and xanthine oxidase as well as for the mitochondrial electron transport chain (8; 53). The nearly complete inhibition of superoxide production in the presence of apocynin indicates that NADPH oxidase is the main source of superoxide in LP offspring aorta, both in baseline conditions and after stimulation by AngII. These results are supported by reports showing that, in adults with chronic hypertension, membrane-bound NAD(P)H oxidases are the most significant ROS source in the vascular wall (15; 53) and that AngII enhances the vascular production of ROS (mostly superoxide) essentially through the activation of NAD(P)H oxidases. (5; 46; 47; 49). Furthermore, in another model of fetal programming of hypertension, AngII was shown to increase superoxide production through NADPH oxidase in mesenteric arteries; the latter studies however did not examine the vasomotor response to AngII (11) but did show that apocynin normalized defective vasodilatation to bradykinin and acetylcholine.

These results provide a basic mechanism by which increased vascular reactivity to AngII prevails in adult LP offspring. However, it is unknown from our and previously published data whether oxidative stress was present early in life and could have initiated vascular dysfunction and hypertension. This can be hypothesized considering the key role of AngII in the development of “programmed” hypertension (see introduction). AngII can increase NADPH oxidase activity and expression of its components (9; 13; 16; 29; 37). In turn, NADH and NADPH oxidase enhance the production of ROS through activation of xanthine oxidase, the auto-oxidation of NADH, and the inactivation of SOD (9; 13; 16; 29; 37). Hence increased RAS activity contributes

significantly to augmented ROS and could lead to vascular dysfunction and vascular structural changes such as microvascular rarefaction (36).

Figure Legends:

Figure 1: Vasoconstrictor response to angiotensin II (AngII) of carotid artery rings from 9-12 week old male rats exposed during gestation to a low protein (LP) or control (CTRL) diet (panel A) * $p < 0.05$ compared with CTRL. Role of AngII receptor subtypes in mediating vasoconstriction was studied in the presence of Losartan ($1 \mu\text{M}$) and PD123319 ($0.1 \mu\text{M}$), respectively AT_1 and AT_2R antagonists (LP in panel B and CTRL in panel C). Data are mean \pm SEM of $n = 6$ rats per group.

Figure 2: Vasoconstrictor response of carotid artery rings from 9-12 week old male rats exposed during gestation to a low protein (LP) or control (CTRL) diet to KCl (80 mM) under increasing tension (panel A, $n = 3$ rats per group) and to thromboxane A_2 analogue U46619 (panel B, $n = 6$ rats per group). Data are mean \pm SEM.

Figure 3: Vasoconstrictor response to angiotensin II (AngII) of carotid artery rings with (+) or without (-) endothelium from 9-12 week old male rats exposed during gestation to a low protein (LP, panel A) or control (CTRL, panel B) diet. Constriction is expressed relative (percent) to the response elicited by KCl (80 mM). * $p < 0.05$ compared with the response with intact endothelium in the same diet group. Data are mean \pm SEM of $n = 6$ rats per group.

Figure 4: Vasoconstrictor response to angiotensin II (AngII) of carotid artery rings from 9-12 week old male rats exposed during gestation to a low protein (LP, panel A, $n = 6$ rats) or control (CTRL, panel B, $n = 7$ rats) diet in the presence or not of

phosphoramidon (1 μM). Constriction is expressed relative (percent) to the response elicited by KCl (80 mM). C and D: Cumulative dose response curve to angiotensin 1-7 (Ang(1-7)) of carotid artery rings from 9-12 week old LP (panel C) or CTRL (panel D) male rats ($n = 3$ rats per group). At the end of each experiment, integrity of the rings was tested by the addition to Carbachol (100 μM) to the organ chambers. Relaxation is expressed as percent reversal of U46619 (0.3 μM)-induced vasoconstriction. Data are mean \pm SEM.

Figure 5: Vasoconstrictor response to angiotensin II (AngII) of carotid artery rings from 9-12 week old male rats exposed during gestation to a low protein (LP, panel A) or control (CTRL, panel B) diet in the presence (+) or not (-) of superoxide dismutase mimetic Tempol (1 mM). Constriction is expressed relative (percent) to the response elicited by KCl (80 mM). * $p < 0.05$ compared with the response without Tempol in the same diet group. Data are mean \pm SEM of $n = 6$ rats per group.

Figure 6: A: Superoxide levels measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence in aortas from 9-12 week old male rats exposed during gestation to a low protein (LP, black columns, $n = 6$) or control (CTRL, white columns, $n = 4$) diet in baseline conditions, after a 5 minutes preincubation with angiotensin II (AngII, 1 μM) or with AngII plus diphenylene iodonium (DPI, 100 μM) or apocynin (1 mM). RLU: relative light units. Data are mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared with baseline. ** $p < 0.05$ compared with CTRL in same conditions. & $p < 0.05$ compared with response to AngII alone for the same group. B and C: Representative sections of aorta from 9-12 week old

male LP (panel B) or CTRL (panel C), after treatment with hydroethidine (2 μ M) (see Methods). Images were obtained with a laser scanning confocal microscope (LSM 510 laser scanning microscope, Zeiss) equipped with an argon laser. Fluorescence was detected with a 514-nm long-pass filter. Bar scale = 10 μ m.

Figure 7: A: Representative immunoblots of Western analysis of angiotensin II AT₁ receptor subtype and of superoxide dismutase (SOD) (30 μ g of protein was loaded) in whole carotid arteries (n = 4 LP and n = 5 CTRL); the arrows point to the AT₁ 40-kDa protein, the SOD 16-kDa protein and the beta actin 40-kDa protein. The panel B represents compiled immunoreactive densitometry relative to that of the CTRL protein diet set at 100%.

Figure 1

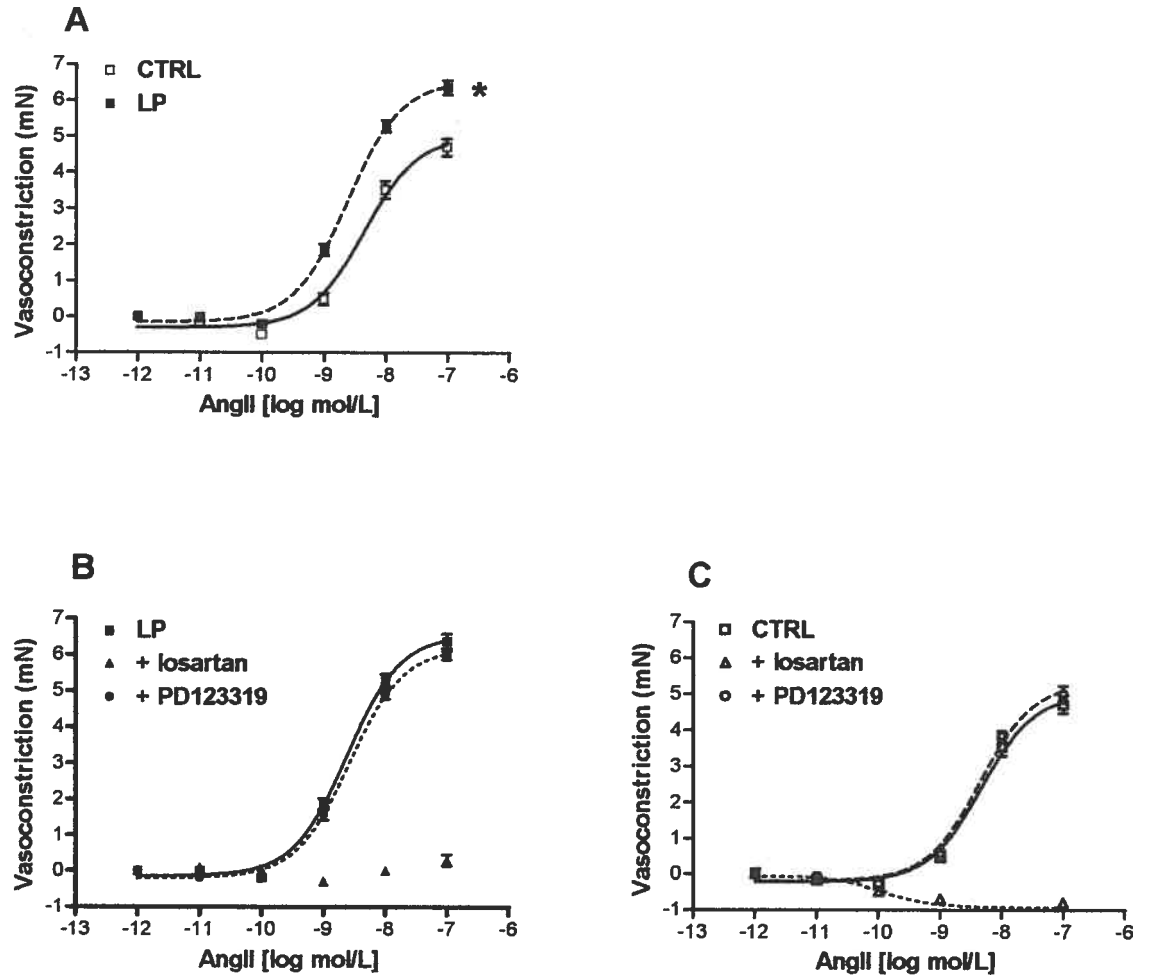


Figure 2

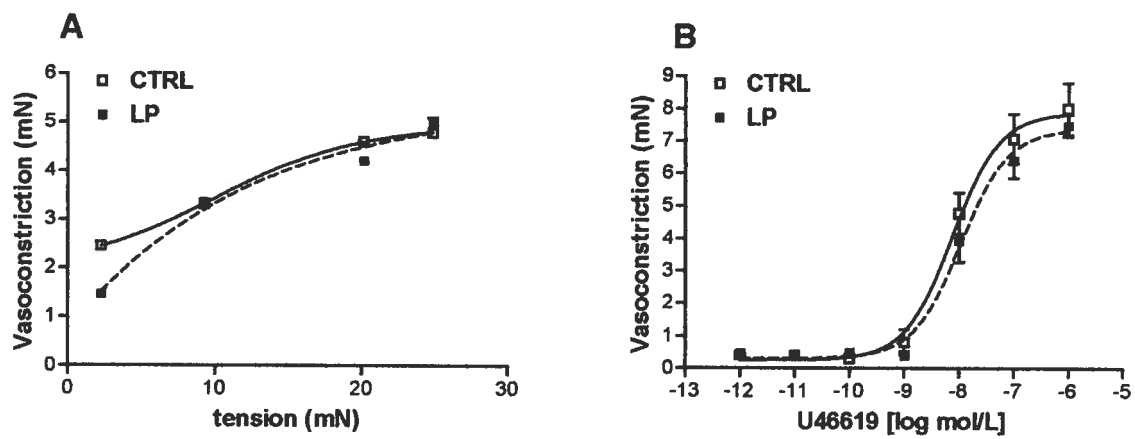


Figure 3

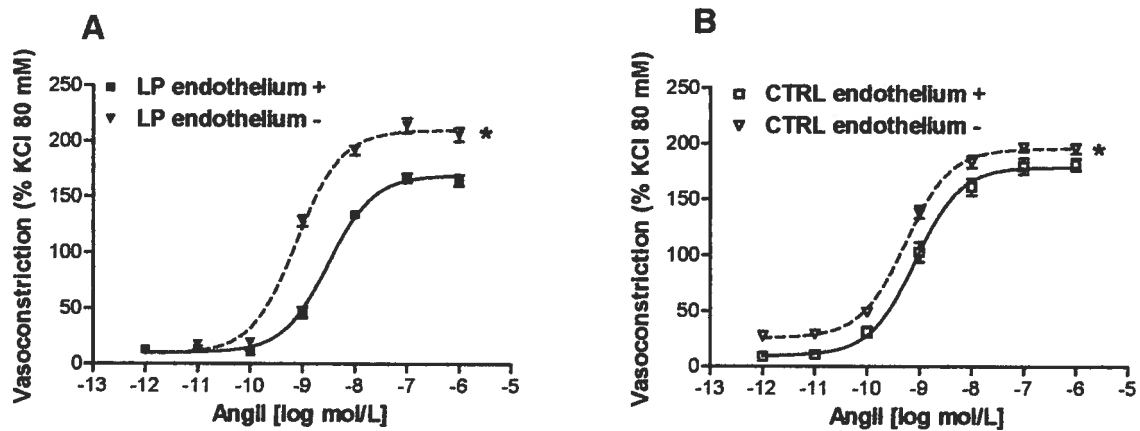


Figure 4

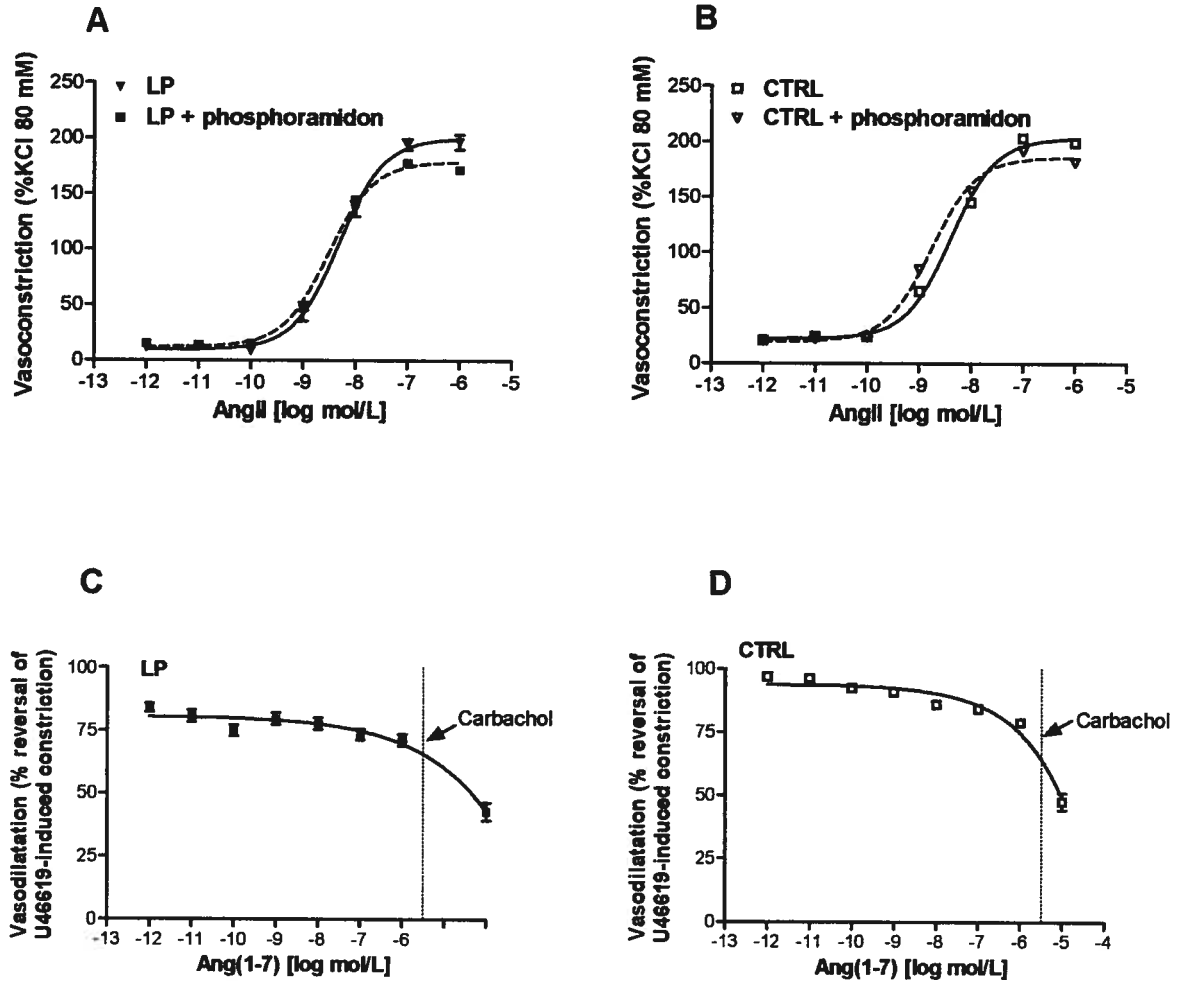


Figure 5

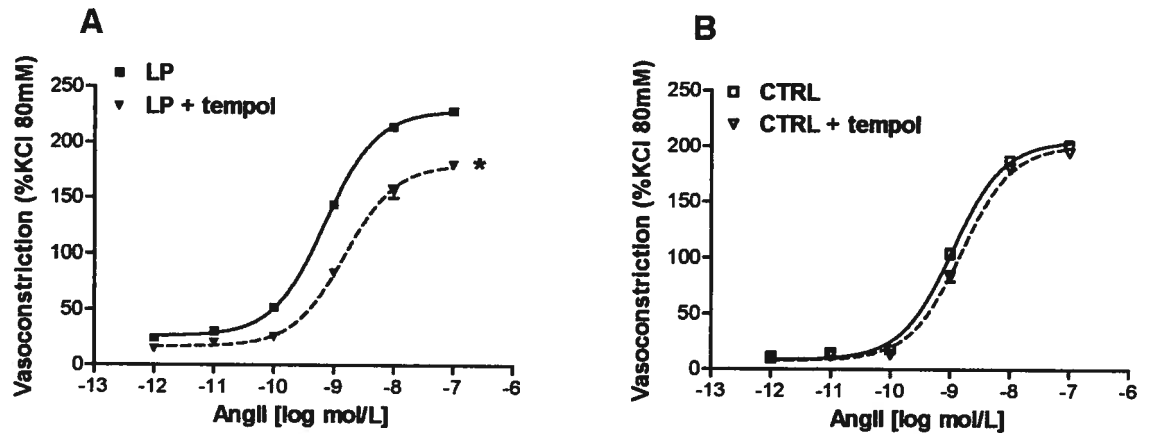
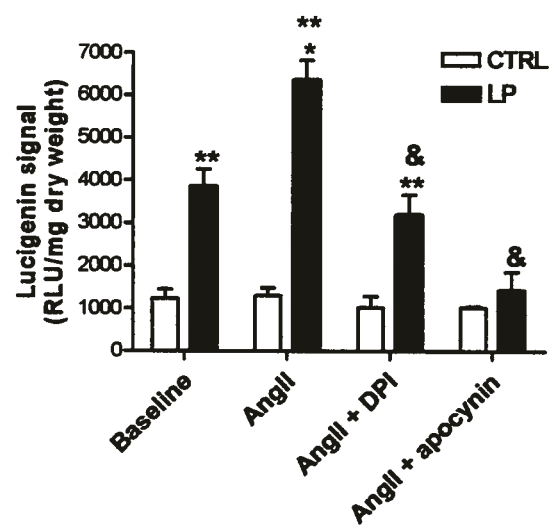
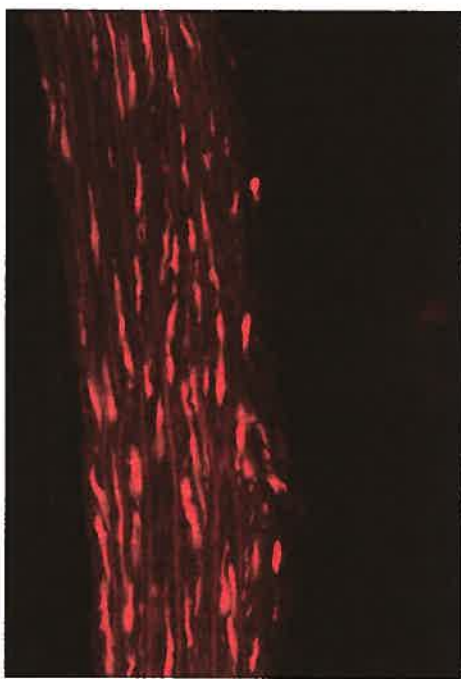


FIGURE 6

A



B



C

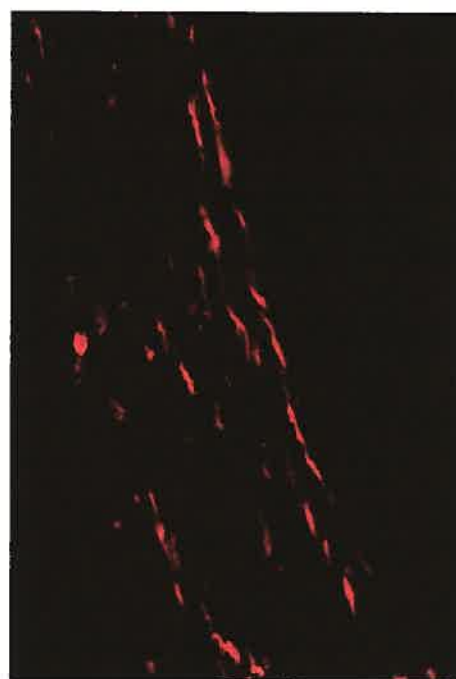
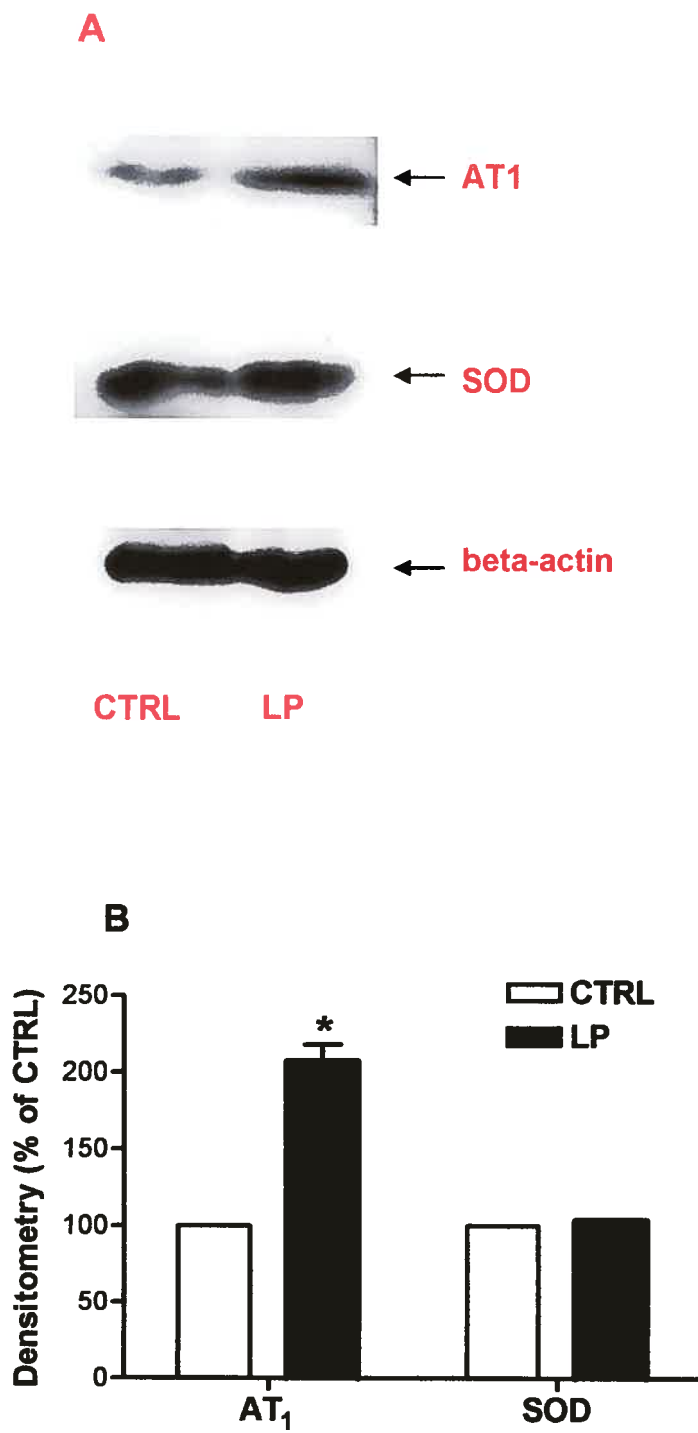


FIGURE 7



Reference List

1. **Barker DJ.** Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol Metab* 13: 364-368, 2002.
2. **Barker DJ and Martyn CN.** The maternal and fetal origins of cardiovascular disease. *J Epidemiol Community Health* 46: 8-11, 1992.
3. **Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D and Wadsworth ME.** Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298: 564-567, 1989.
4. **Berry C, Hamilton CA, Brosnan MJ, Magill FG, Berg GA, McMurray JJ and Dominiczak AF.** Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation* 101: 2206-2212, 2000.
5. **Berry CB and McBean GJ.** An investigation into the role of calcium in the modulation of rat synaptosomal D-[3H]aspartate transport by docosahexaenoic acid. *Brain Res* 973: 107-114, 2003.

6. **Boulanger CM, Caputo L and Levy BI.** Endothelial AT1-mediated release of nitric oxide decreases angiotensin II contractions in rat carotid artery. *Hypertension* 26: 752-757, 1995.
7. **Brawley L, Itoh S, Torrens C, Barker A, Bertram C, Poston L and Hanson M.** Dietary protein restriction in pregnancy induces hypertension and vascular defects in rat male offspring. *Pediatr Res* 54: 83-90, 2003.
8. **Cai H and Harrison DG.** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87: 840-844, 2000.
9. **Dzau VJ.** Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension* 37: 1047-1052, 2001.
10. **Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB and Diz DI.** Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension* 30: 535-541, 1997.
11. **Franco MC, Akamine EH, Di Marco GS, Casarini DE, Fortes ZB, Tostes RC, Carvalho MH and Nigro D.** NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in intrauterine undernourished rats: involvement of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res* 59: 767-775, 2003.

12. **Frias MA, Dubouloz F, Rebsamen MC and Lang U.** Prostacyclin production in rat aortic smooth muscle cells: role of protein kinase C, phospholipase D and cyclooxygenase-2 expression. *Cardiovasc Res* 60: 438-446, 2003.
13. **Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD and Alexander RW.** Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74: 1141-1148, 1994.
14. **Gunther S, Gimbrone MA, Jr. and Alexander RW.** Regulation by angiotensin II of its receptors in resistance blood vessels. *Nature* 287: 230-232, 1980.
15. **Heitzer T, Wenzel U, Hink U, Krollner D, Skatchkov M, Stahl RA, MacHarzina R, Brasen JH, Meinertz T and Munzel T.** Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int* 55: 252-260, 1999.
16. **Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T and Chayama K.** Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med* 346: 1954-1962, 2002.
17. **Lamireau D, Nuyt AM, Hou X, Bernier S, Beauchamp M, Gobeil F, Jr., Lahaie I, Varma DR and Chemtob S.** Altered vascular function in fetal programming of hypertension. *Stroke* 33: 2992-2998, 2002.

18. **Langley-Evans S and Jackson A.** Intrauterine programming of hypertension: nutrient-hormone interactions. *Nutr Rev* 54: 163-169, 1996.
19. **Langley-Evans SC.** Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proc Nutr Soc* 60: 505-513, 2001.
20. **Langley-Evans SC, Gardner DS and Jackson AA.** Association of disproportionate growth of fetal rats in late gestation with raised systolic blood pressure in later life. *J Reprod Fertil* 106: 307-312, 1996.
21. **Langley-Evans SC and Jackson AA.** Captopril normalises systolic blood pressure in rats with hypertension induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 110: 223-228, 1995.
22. **Langley-Evans SC, Welham SJ, Sherman RC and Jackson AA.** Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Lond)* 91: 607-615, 1996.
23. **Lassegue B, Alexander RW, Nickenig G, Clark M, Murphy TJ and Griendling KK.** Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol Pharmacol* 48: 601-609, 1995.

24. **Law CM and Shiell AW.** Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature. *J Hypertens* 14: 935-941, 1996.
25. **Li Y, Zhu H, Kuppusamy P, Roubaud V, Zweier JL and Trush MA.** Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol Chem* 273: 2015-2023, 1998.
26. **McMillen IC and Robinson JS.** Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 85: 571-633, 2005.
27. **McMullen S, Gardner DS and Langley-Evans SC.** Prenatal programming of angiotensin II type 2 receptor expression in the rat. *Br J Nutr* 91: 133-140, 2004.
28. **Miller FJ, Jr., Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD and Davidson BL.** Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 82: 1298-1305, 1998.
29. **Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Forstermann U, Meinertz T, Griendling K and Munzel T.** Effects of

- angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 90: E58-E65, 2002.
30. **Mulvany MJ.** Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci* 17: 105-109, 2002.
 31. **Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE and Dzau VJ.** The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10663-10667, 1995.
 32. **Nishiyama A, Fukui T, Fujisawa Y, Rahman M, Tian RX, Kimura S and Abe Y.** Systemic and Regional Hemodynamic Responses to Tempol in Angiotensin II-Infused Hypertensive Rats. *Hypertension* 37: 77-83, 2001.
 33. **Nozawa Y, Matsuura N, Miyake H, Yamada S and Kimura R.** Effects of TH-142177 on angiotensin II-induced proliferation, migration and intracellular signaling in vascular smooth muscle cells and on neointimal thickening after balloon injury. *Life Sci* 64: 2061-2070, 1999.
 34. **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.

35. **Pladys P, Lahaie I, Cambonie G, Thibault G, Le NL, Abran D and Nuyt AM.** Role of brain and peripheral angiotensin II in hypertension and altered arterial baroreflex programmed during fetal life in rat. *Pediatr Res* 55: 1042-1049, 2004.
36. **Pladys P, Sennlaub F, Brault S, Checchin D, Lahaie I, Le NL, Bibeau K, Cambonie G, Abran D, Brochu M, Thibault G, Hardy P, Chemtob S and Nuyt AM.** Microvascular rarefaction and decreased angiogenesis in rats with fetal programming of hypertension associated with exposure to a low protein diet in utero. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005.
37. **Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK and Harrison DG.** Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97: 1916-1923, 1996.
38. **Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, Kurz S, Keiser J, Haleen S, Giaid A and Harrison DG.** Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 30: 29-34, 1997.
39. **Sahajpal V and Ashton N.** Increased glomerular angiotensin II binding in rats exposed to a maternal low protein diet in utero. *J Physiol* 563: 193-201, 2005.
40. **Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de B, I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos**

- VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R and Walther T.** Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8258-8263, 2003.
41. **Saruta T.** Mechanism of glucocorticoid-induced hypertension. *Hypertens Res* 19: 1-8, 1996.
42. **Schiffrin EL.** Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 43: 19-29, 2005.
43. **Sherman RC and Langley-Evans SC.** Early administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril, prevents the development of hypertension programmed by intrauterine exposure to a maternal low-protein diet in the rat. *Clin Sci (Lond)* 94: 373-381, 1998.
44. **Sherman RC and Langley-Evans SC.** Antihypertensive treatment in early postnatal life modulates prenatal dietary influences upon blood pressure in the rat. *Clin Sci (Lond)* 98: 269-275, 2000.
45. **Tangalakis K, Lumbers ER, Moritz KM, Towstoles MK and Wintour EM.** Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. *Exp Physiol* 77: 709-717, 1992.

46. **Thannickal VJ and Fanburg BL.** Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1005-L1028, 2000.
47. **Touyz RM.** Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* 37: 1263-1273, 2004.
48. **Touyz RM and Schiffrin EL.** Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52: 639-672, 2000.
49. **Touyz RM and Schiffrin EL.** Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 122: 339-352, 2004.
50. **Woodall SM, Johnston BM, Breier BH and Gluckman PD.** Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res* 40: 438-443, 1996.
51. **Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR and Rasch R.** Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* 49: 460-467, 2001.

52. **Wyse DG.** On the "Normalization" of active developed force of isolated helical strips of muscular and elastic arteries for variation in wall thickness. *J Pharmacol Methods* 4: 313-326, 1980.
53. **Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ and Diez J.** Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 38: 1395-1399, 2001.

Référence complémentaire

54. **Vehaskari VM, Stewart T, Lafont D, Soyez C, Seth D and Manning J.** Kidney angiotensin and angiotensin receptor expression in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F262-F267, 2004.

IV) Résultats complémentaires

Tableau 1. (-logEC₅₀) et Emax de différents agents sur les artères carotides des rats CTRL et LP

Agents	CTRL(18%)	LP(9%)	CTRL(18%)	LP(9%)
AngII (mN)	8,346±0,016	8,622±0,009*	5,012±0,04	6,551±0,03*
U46619(mN)	8,117±0,026	7,964±0,037	7,895±0,08	7,394±0,11
AngII+ endothelium(%KCl 80mM)	9,082±0,005*	8,508±0,006**	179±0,27**	169±0,37**
AngII- endothelium(%KCl 80mM)	9,266±0,003	9,111±0,01	196±0,18	210±0,67
AngII-phosphoramidon(%KCl 80mM)	8,391±0,008	8,315±0,005	203±0,52	200±0,38
AngII+phosphoramidon(%KCl 80mM)	8,767±0,007*	8,520±0,008**	186±0,43**	179±0,48**
AngII-tempol (%KCl 80mM)	8,961±0,004	9,146±0,001	206±0,35	229±0,12
AngII+tempol (%KCl 80mM)	8,817±0,006	8,821±0,004**	202±0,53	180±0,28**

Les valeurs correspondent aux moyennes +/- SEM. Le (-logEC₅₀) est calculé à partir de la courbe dose-réponse de divers agents (concentrations comprises entre 10⁻¹² M et 10⁻⁵ M). * $p < 0.05$ comparé aux valeurs obtenues dans le groupe CTRL. ** $p < 0.05$ comparé aux valeurs obtenues dans le même groupe avec endothélium, phosphoramidon et tempol. Test t de Student pour série appariées.

V) Discussion.

A) La vasoréactivité à l'AngII.

Toutes les études de vasoréactivité effectuées dans ce mémoire ont été réalisées sur des artères carotides. Ces artères ne sont pas des artères de résistances. Des artères de résistance, comme leur nom l'indique, exercent une résistance vis-à-vis du flot sanguin et par conséquent une modification de leur calibre (remodelage) ou de leur vasomotricité a une implication de premier ordre dans l'hypertension artérielle primaire qui est associée avec une augmentation de cette résistance. De ce fait, les observations rapportées dans ce mémoire ne peuvent être généralisées à tout l'arbre vasculaire et donc ne permettent pas de démontrer le rôle de cette réponse exagérée à l'AngII dans l'hypertension artérielle programmée. Cependant, les données in vivo rapportée par le laboratoire démontrant aussi une augmentation de la réponse in vivo à l'AngII chez les LP (ceci ne pouvant résulter que d'une vasocontraction exagérée des carotides), de même que la normalisation de la vasodilatation des artères mésentériques (qui sont des artères de résistance) à la bradikinine en présence d'inhibiteur de NADPH oxydase nous permettent d'émettre l'hypothèse que cette vasocontraction exagérée à l'AngII secondaire à une genèse excessive d'anion superoxyde se retrouve aussi dans les artères de résistance périphériques.

Nous avons démontré que la vasocontraction en réponse à l'AngII était augmentée chez des rats adultes exposés à une diète faible en protéines (LP) in utero, en comparaison aux contrôles (CTRL). Cette vasocontraction exagérée semble être spécifique de l'AngII, puisque nous n'avons pas observé de différence en réalisant des courbes doses réponse à un autre vasoconstricteur, le U46619 (analogue du Thromboxane A2) aussi bien dans le groupe LP que CTRL.

Cette augmentation de vasocontraction en réponse à l'AngII a été décrite dans d'autre forme d'hypertension artérielle chronique (55). D'un point de vue expérimental, il a été démontré que la réponse vasocontractile à l'AngII était augmentée chez les rats spontanément hypertendus (SHR) en période précoce d'hypertension comparés aux rats présentant une hypertension bien établie (30). D'un point de vue clinique maintenant, il a été montré chez certains patients présentant une hypertension, un polymorphisme dans le récepteur AT1 (substitution d'une base [adénine/cytosine] en position (71) avec comme conséquence chez les patients homozygotes pour l'allèle C (génotype CC), une augmentation dans la réponse vasocontractile à l'AngII (148).

Pour notre part, nous démontrons une augmentation dans la réponse vasocontractile à l'AngII chez l'adulte avec une hypertension artérielle «programmée» soit associée à une altération du milieu intra-utérin.

B) Les mécanismes potentiellement impliqués dans ce phénomène.

Une augmentation de la réponse vasocontractile à l'AngII peut-être secondaire à un remodelage vasculaire, à un changement au niveau des récepteurs de l'AngII (AT1R et AT2R) ou au niveau de la signalisation post-récepteur.

i) Le remodelage vasculaire.

Il a été démontré que l'hypertension essentielle est non seulement associée avec une augmentation de la résistance périphérique mais également avec une altération dans la structure des vaisseaux de résistance, on parle alors de remodelage

vasculaire (148). Nos données suggèrent qu'il n'existe pas de remodelage vasculaire entre le groupe LP et CTRL puisque les courbes dose-réponse au KCL (les artères carotides ont été soumises à des tensions croissantes) sont similaires entre les deux groupes, traduisant que la force tensionnelle exercée par les artères carotides de chacun des groupes est identique. Cela est supporté par nos études histologiques antérieures qui avaient démontré une absence de remodelage vasculaire entre les groupes LP et CTRL en étudiant différents paramètres (diamètre de la lumière, aire et épaisseur de la média, rapport média/lumière) aussi bien au niveau des artères mésentériques que des artères carotides (148).

ii) AT1 et AT2.

Nous avons démontré que le récepteur AT1 était responsable de cette vasocontraction en réponse à l'AngII. L'utilisation d'un antagoniste du récepteur AT1, le losartan, conduit dans les deux groupes à une inhibition totale de la vasocontraction à l'AngII. Notons cependant que dans le groupe CTRL une réponse vasodilatatrice qui est apparente à de hautes concentrations d'AngII et en présence de losartan. Ceci suggère un effet vasodilatateur de l'AngII qui pourrait s'exercer par l'activation d'AT2 ou le métabolisme de l'AngII en Ang(1-7). Pour vérifier l'implication possible du récepteur AT2 (l'implication possible de l'Ang(1-7) sera évoquée plus loin), nous avons utilisé un antagoniste du récepteur AT2, PD123319, qui ne modifie pas la vasocontraction à l'AngII dans les deux groupes. Ceci suggère que le récepteur AT2 n'est pas fonctionnellement présent au niveau des artères carotides dans notre modèle animal. Peu d'études rapportent d'ailleurs l'expression d'AT2 au niveau des artères carotides de rat (103; 105). Cependant nous ne pouvons totalement exclure un rôle d'AT2 dans ce modèle de programmation fœtale

d'hypertension artérielle chez l'adulte, puisqu'au niveau rénal, il a été démontré que l'expression de l'ARNm du récepteur AT2 était diminuée dans la descendance LP à 4 semaines, mais uniquement chez les femelles (97).

Nous avons montré par immunobuvardage Western que l'expression du récepteur AT1 au niveau des artères carotides était significativement augmentée dans le groupe LP comparé au groupe CTRL. Une augmentation dans l'expression d'AT1 a aussi été montrée au niveau vasculaire chez les rats SHR comparés aux rats Wistar (111). Nous pouvons donc envisager que cette augmentation de vasocontraction à l'AngII dans le groupe LP pourrait s'expliquer par une augmentation de l'expression d' AT1R. Il a déjà été étudié dans le rein de rats LP à 4 semaines et l'expression de sa protéine (par Western et analyse de liaison) semble augmentée (125; 150) mais les taux d'ARNm sont inchangés par rapport aux CTRL (97). Dans un autre modèle de programmation fœtale d'hypertension associé à une restriction globale de 50% de la diète de la rate gestante, l'ARNm d'AT1 dans les artères mésentériques d'adulte est aussi semblable aux CTRL (37). Les facteurs sous-jacents conduisant à une augmentation de l'expression vasculaire d'AT1 dans la descendance LP à l'âge adulte restent inconnus. Parmi les facteurs pouvant affecter l'expression du récepteur de l'AngII, l'AngII elle-même semble être le facteur le plus puissant. A la fois in vivo et in vitro, l'AngII diminue l'expression d'AT1 au niveau des CMLV (45; 83). Même si les niveaux d'activité d'ACE et de la rénine plasmatique sont augmentés, le niveau d'activité de l'AngII circulante reste inchangé voire augmenté mais de façon non consistante dans la descendance LP à l'âge adulte (76). Au niveau rénal cependant, l'AngII est diminuée chez le nouveau-né (159); et il pourrait être envisagé que cette diminution de l'AngII néonatale, si elle s'applique aussi pour l'AngII circulante,

pourrait par conséquent programmer de façon permanente l'expression d'AT1. Puisqu'il a été rapporté que l'ARNm était inchangé, cela permet d'envisager des changements aux niveaux post-transcriptionnels mais également post-traductionnels dans la régulation de l'expression d'AT1 chez la descendance LP. Les corticostéroïdes pourraient conduire à une augmentation de l'expression d'AT1. En effet, l'exposition du fœtus à des niveaux élevés de corticostéroïdes joue un rôle dans la programmation de l'hypertension (96). Il a été rapporté que la réponse de la pression sanguine à l'AngII, mais pas à la noradrénaline, est augmentée chez les agneaux fœtaux après infusion de cortisol (139) et chez le rat adulte, il a été montré que les glucocorticoïdes peuvent augmenter l'effet presseur de l'AngII ainsi que l'expression d'AT1 au niveau des CMLV. (127).

iii) L'endothélium.

L'endothélium peut donc être impliqué dans l'hypertension systémique suite à une production excessive de vasoconstricteurs et/ou un défaut de production de vasodilatateurs ou un défaut d'action des vasodilatateurs (15; 40; 149).

Nous avons démontré ainsi que d'autres groupes que la programmation développementale de l'hypertension artérielle était non seulement associée à une activation à la fois centrale et périphérique du SRA (78;; 117, 118) mais également due à un dysfonctionnement vasculaire se traduisant par un défaut de vasodilatation NO-dépendante attribuable à une diminution de l'expression de la guanylate cyclase soluble ainsi que des niveaux de GMPcyclique (38; 70;)

Nous avons voulu étudier la possibilité d'un défaut de libération des facteurs relaxant dérivés de l'endothélium pour expliquer l'observation de cette augmentation

de vasocontraction. Pour cela, nous avons déplété les artères carotides de leur endothélium et avons observé que la vasocontraction en réponse à l'AngII était augmentée pour les artères carotides dont l'endothélium avait été endommagé comparée aux artères carotides possédant un endothélium intact comme déjà démontré sur les artères carotides de rats Sprague Dawley (134). Cependant, dans le groupe LP, cette vasocontraction demeure plus élevée que dans le groupe CTRL ce qui suggère que l'exagération de la vasocontraction observée dans le groupe LP n'est pas une conséquence d'un défaut de libération des facteurs relaxants dérivés de l'endothélium, sinon la différence entre les groupes dans la vasocontraction en réponse à l'AngII en absence d'endothélium serait amoindrie. Une augmentation de la contraction à l'AngII en absence d'endothélium suggère une libération stimulée par l'AngII ou constitutive de facteurs relaxants dérivés de l'endothélium. Il a été montré que l'activation du récepteur AT1 au niveau des cellules endothéliales pouvait conduire à la libération de facteurs vasomoteurs tels que le NO (13), PGI2 (39) et l'endothéline.

L'AngII stimule l'endothéline-1 (ET-1), c'est l'endothéline la plus puissante, qui médie à court terme une partie des effets vasoconstricteurs de l'AngII (122). Il a été montré qu'à long terme ET-1 était impliquée dans le remodelage vasculaire des petites et larges artères (58). Puisque l'augmentation des taux plasmatiques d'ET-1 peut être responsable de la dysfonction endothéliale observée dans les processus pathologiques (129) nous avons envisagé que cela pouvait expliquer l'augmentation de la vasocontraction. Pour cela, nous avons bloqué la formation d'endothéline mature (ou Big endothéline) par l'utilisation du phosphoramidon, ceci n'a pas modifié l'effet vasoconstricteur en réponse à l'AngII dans les deux groupes, suggérant que

l'endothéline ne joue pas un rôle dans l'augmentation de la vasocontraction médiée par l'AngII. Dans les deux groupes, la sensibilité ($-\log EC_{50}$) des carotides prétraitées avec du phosphoramidon en réponse à l'AngII est légèrement mais statistiquement significativement plus élevée que pour les carotides n'ayant pas été prétraitées, ce qui laisse peut-être envisager un effet de l'endothéline sur la sensibilité en réponse à l'AngII.

iv) L'angiotensine(1-7).

Il a récemment été démontré que la vasodilatation induite par l'Ang(1-7) peut résulter non seulement par le récepteur AT2 mais aussi par un nouveau type de récepteur heptahélical dénommé MAS (115). Nous avons réalisé des courbes dose-réponse à l'Ang(1-7) (après constriction par U46619). Bien que la concentration employée de U46619 ($0,3\mu\text{M}$) conduise à une contraction pratiquement maximale, nous avons montré dans notre laboratoire que cette concentration n'altère pas la réponse vasodilatatrice (au carbachol ou SNP) quand cette réponse devait se produire. Dans cette présente étude, nous n'observons aucun effet vasodilatateur aussi bien dans le groupe LP que dans le groupe CTRL en réponse à des doses croissantes d'Ang(1-7), traduisant alors que la vasocontraction exagérée n'est pas secondaire à un défaut dans l'action de l'Ang(1-7) et cela laisse suggérer que le récepteur Mas n'est pas exprimé au niveau des artères carotides dans notre modèle d'étude. À notre connaissance, une seule étude démontre l'expression d'Ang(1-7) au niveau des artères carotides, chez le rat SHR (57). Afin de nous assurer que les propriétés vasodilatatrices des artères carotides étaient toujours intactes, nous avons ajouté après la dernière dose d'Ang(1-7) du carbachol.

v) Les espèces réactives de l'oxygène.

Des études animales et humaines ont montré que l'augmentation des ERO, en particulier de l'anion superoxide, contribuait à la dysfonction vasculaire retrouvée dans l'hypertension (10; 59). Chez les adultes présentant une hypertension artérielle, il a été montré que les niveaux de la superoxide dismutase (SOD) étaient diminués (59). Il existe 3 principales formes de SOD: manganèse SOD (Mn)-SOD, cuivre/zinc SOD (CuZn-SOD) et extra cellulaire SOD (EC-SOD). Le niveau basal d'anions superoxide est dépendant à la fois des taux de production d'anions superoxide ainsi que de l'activité de la SOD endogène qui catalyse la dismutation des anions superoxide en peroxyde d'hydrogène.

Solzbach et al. ont montré que l'administration de vitamines antioxydantes pouvait normaliser la vasodilatation médiée par le NO (133)

. Afin de démontrer le rôle potentiel des anions superoxide produits suite à une stimulation par AngII dans la vasocontraction exagérée à l'AngII, nous avons réalisé des courbes dose réponse à l'AngII en présence de tempol qui est un analogue de la SOD. Il a été montré que le tempol pouvait normaliser la pression sanguine et le flux artériel chez des rats infusés avec de l'AngII (170). Avec l'étude actuelle, nous avons montré que l'administration de tempol normalise la vasocontraction exagérée en réponse à l'AngII dans le groupe LP. Cela suggère donc une production accrue d'anions superoxide dans le groupe LP. Nous remarquons également que l'utilisation du tempol réduit la réponse E_{max} du groupe LP en dessous du groupe CTRL et réduit aussi significativement le $(-\log EC_{50})$. Ceci pourrait suggérer qu'en augmentant les défenses antioxydantes, il y aurait moins de peroxydites formés permettant alors au NO d'exercer son effet vasodilatateur ce qui pourrait expliquer alors que la réactivité

des LP est moins grande que celles observée chez les CRTL. Concernant l'expression de la CuZn-SOD, nos résultats d'immunobuvardage (Western) ne montrent pas de différence entre les deux groupes. Cette production accrue d'anions superoxide dans le groupe LP pourrait être reliée à l'augmentation de l'expression d'AT1 (5) comme cela a été démontré chez les rats SHR (5).

Les anions superoxide sont les ERO les plus importantes: de part leur électron non apparié, ils sont très instables et très réactifs. De part leur nombre impair d'électrons, ils possèdent une demi-vie très courte. Ainsi l'utilisation d'approches différentes pour les détecter dans les systèmes biologiques permet une meilleure validation des résultats obtenus (5). Nous avons détecté la génération d'anions superoxide par la technique de chemiluminescence en utilisant la lucigénine. Cette technique est couramment utilisée pour détecter la production d'anions superoxide tant au niveau d'enzymes isolées que de neutrophiles (46). La première détection d'anions superoxide dans le tissu vasculaire a été réalisée en 1991 (109), et depuis, la lucigénine a été utilisée pour détecter les anions superoxide dans de nombreuses formes d'hypertensions artérielles comme par exemple celles produites par l'infusion d'AngII (121), celles associées à un traitement sel-acétate déoxycorticostérone(160) ou bien celles produites par cerclage aortique (160).

La concentration de lucigénine utilisée est importante à considérer. En effet, Li et al. ont démontré que les fortes concentrations de lucigénine, jusqu'à 250 μ M, pouvaient réagir avec de nombreuses enzymes contenant un groupement flavine menant ainsi à une détection d'anions superoxide par chemiluminescence faussement élevée par rapport à la détection obtenue par d'autres méthodes, mais cependant

qu'aux faibles concentrations de lucigénine ($\leq 20\mu\text{M}$) cela ne se produisait pratiquement pas (87). Similairement, Münzel et al ont montré que des concentrations de lucigénine ($< 5\mu\text{M}$) étaient insuffisantes pour détecter la production d'anions superoxide à partir de segments vasculaires (102). En se basant sur toutes ces observations, nous avons utilisé une concentration de $5\mu\text{M}$ de lucigénine (167).

Nous avons observé une production d'anions superoxide plus importante au niveau basal (c'est à dire sans stimulation) dans le groupe LP comparé au groupe CTRL, et cette production d'anions superoxide augmente d'avantage après stimulation par l'AngII uniquement dans le groupe LP; l'AngII n'induit aucun changement dans les niveaux d'anions superoxide du groupe CTRL. Au niveau vasculaire, il a été démontré que l'AngII pouvait stimuler la production d'anions superoxide via la NAD(P)H oxydase (43; 44; 121).

Pour vérifier si cette production d'anions superoxide après stimulation par l'AngII est générée par la NADPH oxydase, nous avons utilisé deux inhibiteurs: le diphenylène iodonium (DPI) et l'apocynine. Le DPI est un inhibiteur des enzymes à flavine, dont fait partie la NADPH oxydase. Bien qu'au niveau vasculaire il a été démontré que la principale source d'ERO est la NADPH oxydase non phagocytaire, d'autres flavines peuvent également produire des anions superoxide et par conséquent peuvent être inhibées par le DPI. Parmi ces enzymes, nous retrouvons la NADPH cytochrome P450 réductase (95), la xanthine oxydase (108), la mitochondriale NADH-ubiquinone oxydoréductase(92) et la NO synthase. L'apocynine pour sa part est un inhibiteur réversible de la NADPH oxydase empêchant l'assemblage de la P47^{phox} au niveau de la membrane (98). Il a été montré que l'apocynine inhibait non

seulement la NADPH oxydase des neutrophiles mais également la NADPH oxydase vasculaire (138). L'apocynine diminue l'élévation de la pression sanguine, l'altération du dysfonctionnement endothélial ainsi que le dépôt de collagène au niveau de la media des petites artères chez des souris ayant reçu des infusions d'AngII (152). Dans nos études, l'utilisation du DPI et d'apocynine conduit dans le groupe LP à une inhibition significative dans les niveaux d'anions superoxide obtenus après administration d'AngII, et ne modifie pas les niveaux détectés dans le groupe CTRL. Nous pouvons toutefois observer que l'utilisation d'apocynine, mais non le DPI, conduit à une inhibition quasi-totale de la production d'anions superoxide. Pour expliquer cette légère différence, nous pouvons suspecter que 100 μ M de DPI (26) n'est peut-être pas une concentration satisfaisante pour inhiber pratiquement totalement la NADPH oxydase. Cependant d'autres groupes ont utilisé des doses nettement plus faibles (10 μ M) avec un temps d'action plus court (5 à 20 minutes) que nous (30 minutes) (8; 67; 154). En conclusion, nos résultats suggèrent que dans le groupe LP la NADPH oxydase est génératrice d'anions superoxide à la fois au niveau basal, mais également après stimulation par l'AngII.

Nous avons confirmé cette production plus importante d'anions superoxide au niveau basal, toujours par chemiluminescence mais en utilisant cette fois le dihydroéthidium (HE) qui est perméable aux cellules. En présence d'anions superoxide, le HE peut former du bromure d'éthidium et ainsi s'intercaler dans le noyau des cellules (9). Cependant, cette technique est d'avantage qualitative que quantitative

VI) Conclusion.

Nous avons démontré dans cette étude que la vasocontraction exagérée observée en réponse à l'AngII chez les adultes ayant été exposés à une diète faible en protéines in utero peut s'expliquer par une augmentation dans l'expression du récepteur AT1 et une augmentation dans les niveaux d'anions superoxide générés via la NADPH oxydase. Nous pouvons suspecter, comme il a été démontré chez le rat SHR (130), que cette augmentation dans l'expression du récepteur AT1 est responsable de la production plus importante d'anions superoxide.

VII) Perspectives

Il nous reste à déterminer l'expression des sous-unités (p47^{phox}, p22^{phox}, gp91^{phox}) de la NADPH oxydase au niveau des artères carotides dans les groupes LP et CTRL par immunobuvardage Western. En effet, l'implication de certaines de ces sous-unités a été montrée dans de nombreuses pathologies: l'homologue du gp91^{phox} (Nox1) joue un rôle dans la réponse pressive à l'AngII en diminuant la biodisponibilité du NO (94) et la sous-unité p22^{phox} est fortement exprimée dans les lésions athérosclérotiques (162).

Nous avons mesuré la production d'anions superoxide sur les aortes de rats, la majorité des études l'a mesurée sur ce segment vasculaire. Pour notre part, nous avons mesuré la vasoréactivité sur les artères carotides donc il nous reste à détecter cette production d'anions superoxide à ce niveau.

Finalement, le mécanisme liant une perturbation anté- ou péri-natale à l'hypertension artérielle et cette genèse excessive d'anions superoxide par l'AngII retrouvées chez l'adulte reste à déterminer. Tout d'abord l'ontogenèse des phénomènes démontrés dans les études actuelles permettra de préciser si la vasomotricité augmentée à l'AngII précède ou est la conséquence de l'augmentation de la pression artérielle.

VIII) RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Aguilera G, Kiss A and Luo X.** Increased expression of type 1 angiotensin II receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus following stress and glucocorticoid administration. *J Neuroendocrinol* 7: 775-783, 1995.
2. **Allen AM, Zhuo J and Mendelsohn FA.** Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens* 13: 31S-38S, 2000.
3. **Arima S and Ito S.** Angiotensin II type 2 receptors in the kidney: evidence for endothelial-cell-mediated renal vasodilatation. *Nephrol Dial Transplant* 15: 448-451, 2000.
4. **Barker DJ.** Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol Metab* 13: 364-368, 2002.
5. **Barker DJ and Law CM.** Birth weight and blood pressure in adolescence. Studies may be misleading. *BMJ* 308: 1634, 1994.
6. **Barker DJ and Martyn CN.** The maternal and fetal origins of cardiovascular disease. *J Epidemiol Community Health* 46: 8-11, 1992.
7. **Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D and Wadsworth ME.** Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298: 564-567, 1989.

8. **Begonja AJ, Gambaryan S, Geiger J, Aktas B, Pozgajova M, Nieswandt B and Walter U.** Platelet NAD(P)H-oxidase-generated ROS production regulates alphaIIbeta3-integrin activation independent of the NO/cGMP pathway. *Blood* 106: 2757-2760, 2005.
9. **Benov L, Sztejnberg L and Fridovich I.** Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic Biol Med* 25: 826-831, 1998.
10. **Berry C, Hamilton CA, Brosnan MJ, Magill FG, Berg GA, McMurray JJ and Dominiczak AF.** Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation* 101: 2206-2212, 2000.
11. **Berry CB and McBean GJ.** An investigation into the role of calcium in the modulation of rat synaptosomal D-[3H]aspartate transport by docosahexaenoic acid. *Brain Res* 973: 107-114, 2003.
12. **Bird IM, Zhang L and Magness RR.** Possible mechanisms underlying pregnancy-induced changes in uterine artery endothelial function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R245-R258, 2003.
13. **Boulanger CM, Caputo L and Levy BI.** Endothelial AT1-mediated release of nitric oxide decreases angiotensin II contractions in rat carotid artery. *Hypertension* 26: 752-757, 1995.

14. **Brawley L, Itoh S, Torrens C, Barker A, Bertram C, Poston L and Hanson M.** Dietary protein restriction in pregnancy induces hypertension and vascular defects in rat male offspring. *Pediatr Res* 54: 83-90, 2003.
15. **Brenner BM, Troy JL and Ballermann BJ.** Endothelium-dependent vascular responses. Mediators and mechanisms. *J Clin Invest* 84: 1373-1378, 1989.
16. **Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, DeGasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach MJ, Taylor DG, Jr. and Timmermans PB.** Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension* 17: 720-721, 1991.
17. **Bunnemann B, Lippoldt A, Aguirre JA, Cintra A and Metzger R.** Glucocorticoid regulation of angiotensinogen gene expression in discrete areas of the male rat brain. An in situ hybridization study. *Neuroendocrinology* 57: 856-862, 1993.
18. **Cai H and Harrison DG.** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87: 840-844, 2000.
19. **Campbell DM, Hall MH, Barker DJ, Cross J, Shiell AW and Godfrey KM.** Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later. *Br J Obstet Gynaecol* 103: 273-280, 1996.

20. **Carey RM and Siragy HM.** Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 24: 261-271, 2003.
21. **Chatelain A, Dupouy JP and Allaume P.** Fetal-maternal adrenocorticotropin and corticosterone relationships in the rat: effects of maternal adrenalectomy. *Endocrinology* 106: 1297-1303, 1980.
22. **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.
23. **Saavedra JM.** Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutics opportunities. *Cell Mol Neurobiol.* 25(3-4): 485-512, 2005.
24. **Dandona P, Kumar V, Aljada A, Ghanim H, Syed T, Hofmayer D, Mohanty P, Tripathy D and Garg R.** Angiotensin II receptor blocker valsartan suppresses reactive oxygen species generation in leukocytes, nuclear factor-kappa B, in mononuclear cells of normal subjects: evidence of an antiinflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4496-4501, 2003.
25. **DelliPizzi AM, Hilchey SD and Bell-Quilley CP.** Natriuretic action of angiotensin(1-7). *Br J Pharmacol* 111: 1-3, 1994.

26. **Didion SP and Faraci FM.** Effects of NADH and NADPH on superoxide levels and cerebral vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H688-H695, 2002.
27. **Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD, Bartolomei MS and Schultz RM.** Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 62: 1526-1535, 2000.
28. **Dzau VJ.** Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension* 37: 1047-1052, 2001.
29. **Edwards CR, Benediktsson R, Lindsay RS and Seckl JR.** Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet* 341: 355-357, 1993.
30. **Endemann D, Touyz RM, Li JS, Deng LY and Schiffrin EL.** Altered angiotensin II-induced small artery contraction during the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 12: 716-723, 1999.
31. **Felix D, Khosla MC, Barnes KL, Imboden H, Montani B and Ferrario CM.** Neurophysiological responses to angiotensin-(1-7). *Hypertension* 17: 1111-1114, 1991.

32. **Ferrario CM, Brosnihan KB, Diz DI, Jaiswal N, Khosla MC, Milsted A and Tallant EA.** Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension* 18: III126-III133, 1991.
33. **Ferrario CM and Chappell MC.** Novel angiotensin peptides. *Cell Mol Life Sci* 61: 2720-2727, 2004.
34. **Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB and Diz DI.** Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension* 30: 535-541, 1997.
35. **Flynn NE, Meininger CJ, Haynes TE and Wu G.** The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother* 56: 427-438, 2002.
36. **Forrester TE, Wilks RJ, Bennett FI, Simeon D, Osmond C, Allen M, Chung AP and Scott P.** Fetal growth and cardiovascular risk factors in Jamaican schoolchildren. *BMJ* 312: 156-160, 1996.
37. **Franco MC, Akamine EH, Di Marco GS, Casarini DE, Fortes ZB, Tostes RC, Carvalho MH and Nigro D.** NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in intrauterine undernourished rats: involvement of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res* 59: 767-775, 2003.
38. **Franco MC, Dantas AP, Akamine EH, Kawamoto EM, Fortes ZB, Scavone C, Tostes RC, Carvalho MH and Nigro D.** Enhanced oxidative

stress as a potential mechanism underlying the programming of hypertension in utero. *J Cardiovasc Pharmacol* 40: 501-509, 2002.

39. **Frias MA, Dubouloz F, Rebsamen MC and Lang U.** Prostacyclin production in rat aortic smooth muscle cells: role of protein kinase C, phospholipase D and cyclooxygenase-2 expression. *Cardiovasc Res* 60: 438-446, 2003.
40. **Furchgott RF.** The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 24: 175-197, 1984.
41. **Godfrey KM, Forrester T, Barker DJ, Jackson AA, Landman JP, Hall JS, Cox V and Osmond C.** Maternal nutritional status in pregnancy and blood pressure in childhood. *Br J Obstet Gynaecol* 101: 398-403, 1994.
42. **Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M and Kalinyak JE.** Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 88: 921-933, 1991.
43. **Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD and Alexander RW.** Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74: 1141-1148, 1994.
44. **Griendling KK, Sorescu D and Ushio-Fukai M.** NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501, 2000.

45. **Gunther S, Gimbrone MA, Jr. and Alexander RW.** Regulation by angiotensin II of its receptors in resistance blood vessels. *Nature* 287: 230-232, 1980.
46. **Gyllenhammar H.** Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J Immunol Methods* 97: 209-213, 1987.
47. **Hales CN and Barker DJ.** The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 60: 5-20, 2001.
48. **Harada K, Komuro I, Sugaya T, Murakami K and Yazaki Y.** Vascular injury causes neointimal formation in angiotensin II type 1a receptor knockout mice. *Circ Res* 84: 179-185, 1999.
49. **Heitzer T, Wenzel U, Hink U, Krollner D, Skatchkov M, Stahl RA, MacHarzina R, Brasen JH, Meinertz T and Munzel T.** Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int* 55: 252-260, 1999.
50. **Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ and Highsmith RF.** Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 248: C550-C556, 1985.

51. **Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T and Chayama K.** Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med* 346: 1954-1962, 2002.
52. **Hinchliffe SA, Lynch MR, Sargent PH, Howard CV and Van Velzen D.** The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons. *Br J Obstet Gynaecol* 99: 296-301, 1992.
53. **Hoet JJ and Hanson MA.** Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J Physiol* 514 (Pt 3): 617-627, 1999.
54. **Holemans K, Gerber R, Meurrens K, De Clerck F, Poston L and Van Assche FA.** Maternal food restriction in the second half of pregnancy affects vascular function but not blood pressure of rat female offspring. *Br J Nutr* 81: 73-79, 1999.
55. **Huang A and Koller A.** Endothelin and prostaglandin H₂ enhance arteriolar myogenic tone in hypertension. *Hypertension* 30: 1210-1215, 1997.
56. **Huentelman MJ, Zubcevic J, Katovich MJ and Raizada MK.** Cloning and characterization of a secreted form of angiotensin-converting enzyme 2. *Regul Pept* 122: 61-67, 2004.
57. **Igase M, Strawn WB, Gallagher PE, Geary RL and Ferrario CM.** angiotensin II AT₁ receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1-7) expression

- in aorta of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005.
58. **Intengan HD and Schiffrin EL.** Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension* 36: 312-318, 2000.
59. **Irani K.** Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 87: 179-183, 2000.
60. **Ishida M, Hiramatsu Y, Masuyama H, Mizutani Y and Kudo T.** Inhibition of placental ornithine decarboxylase by DL-alpha-difluoro-methyl ornithine causes fetal growth restriction in rat. *Life Sci* 70: 1395-1405, 2002.
61. **Jackson AA, Dunn RL, Marchand MC and Langley-Evans SC.** Increased systolic blood pressure in rats induced by a maternal low-protein diet is reversed by dietary supplementation with glycine. *Clin Sci (Lond)* 103: 633-639, 2002.
62. **Jaenisch R and Bird A.** Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl: 245-254, 2003.

63. **Jansson T and Lambert GW.** Effect of intrauterine growth restriction on blood pressure, glucose tolerance and sympathetic nervous system activity in the rat at 3-4 months of age. *J Hypertens* 17: 1239-1248, 1999.
64. **Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E and Amann K.** Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med* 348: 101-108, 2003.
65. **Kingdom JC, Hayes M, McQueen J, Howatson AG and Lindop GB.** Intrauterine growth restriction is associated with persistent juxtamedullary expression of renin in the fetal kidney. *Kidney Int* 55: 424-429, 1999.
66. **Kingdom JC, McQueen J, Connell JM and Whittle MJ.** Fetal angiotensin II levels and vascular (type I) angiotensin receptors in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 100: 476-482, 1993.
67. **Kishida KT, Pao M, Holland SM and Klann E.** NADPH oxidase is required for NMDA receptor-dependent activation of ERK in hippocampal area CA1. *J Neurochem* 94: 299-306, 2005.
68. **Konje JC, Bell SC, Morton JJ, de Chazal R and Taylor DJ.** Human fetal kidney morphometry during gestation and the relationship between weight, kidney morphometry and plasma active renin concentration at birth. *Clin Sci (Lond)* 91: 169-175, 1996.

69. **Kunes J, Hojna S, Kadlecova M, Dobesova Z, Rauchova H, Vokurkova M, Loukotova J, Pechanova O and Zicha J.** Altered balance of vasoactive systems in experimental hypertension: the role of relative NO deficiency. *Physiol Res* 53 Suppl 1: S23-S34, 2004.
70. **Lamireau D, Nuyt AM, Hou X, Bernier S, Beauchamp M, Gobeil F, Jr., Lahaie I, Varma DR and Chemtob S.** Altered vascular function in fetal programming of hypertension. *Stroke* 33: 2992-2998, 2002.
71. **Lane RH, Chandorkar AK, Flozak AS and Simmons RA.** Intrauterine growth retardation alters mitochondrial gene expression and function in fetal and juvenile rat skeletal muscle. *Pediatr Res* 43: 563-570, 1998.
72. **Langley SC, Browne RF and Jackson AA.** Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. *Comp Biochem Physiol Physiol* 109: 223-229, 1994.
73. **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.
74. **Langley-Evans S and Jackson A.** Intrauterine programming of hypertension: nutrient-hormone interactions. *Nutr Rev* 54: 163-169, 1996.

75. **Langley-Evans SC.** Hypertension induced by foetal exposure to a maternal low-protein diet, in the rat, is prevented by pharmacological blockade of maternal glucocorticoid synthesis. *J Hypertens* 15: 537-544, 1997.
76. **Langley-Evans SC.** Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proc Nutr Soc* 60: 505-513, 2001.
77. **Langley-Evans SC, Gardner DS and Welham SJ.** Intrauterine programming of cardiovascular disease by maternal nutritional status. *Nutrition* 14: 39-47, 1998.
78. **Langley-Evans SC and Jackson AA.** Captopril normalises systolic blood pressure in rats with hypertension induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 110: 223-228, 1995.
79. **Langley-Evans SC, Sherman RC, Welham SJ, Nwagwu MO, Gardner DS and Jackson AA.** Intrauterine programming of hypertension: the role of the renin-angiotensin system. *Biochem Soc Trans* 27: 88-93, 1999.
80. **Langley-Evans SC, Welham SJ and Jackson AA.** Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci* 64: 965-974, 1999.
81. **Langley-Evans SC, Welham SJ, Sherman RC and Jackson AA.** Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Lond)* 91: 607-615, 1996.

82. **Langley-Evans SC, Wood S and Jackson AA.** Enzymes of the gamma-glutamyl cycle are programmed in utero by maternal nutrition. *Ann Nutr Metab* 39: 28-35, 1995.
83. **Lassegue B, Alexander RW, Nickenig G, Clark M, Murphy TJ and Griendling KK.** Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol Pharmacol* 48: 601-609, 1995.
84. **Leger J, Levy-Marchal C, Bloch J, Pinet A, Chevenne D, Porquet D, Collin D and Czernichow P.** Reduced final height and indications for insulin resistance in 20 year olds born small for gestational age: regional cohort study. *BMJ* 315: 341-347, 1997.
85. **Leon DA, Lithell HO, Vagero D, Koupilova I, Mohsen R, Berglund L, Lithell UB and McKeigue PM.** Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15 000 Swedish men and women born 1915-29. *BMJ* 317: 241-245, 1998.
86. **Li XC and Widdop RE.** AT2 receptor-mediated vasodilatation is unmasked by AT1 receptor blockade in conscious SHR. *Br J Pharmacol* 142: 821-830, 2004.
87. **Li Y, Zhu H, Kuppusamy P, Roubaud V, Zweier JL and Trush MA.** Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe

for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol Chem* 273: 2015-2023, 1998.

88. **Liggins GC.** Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J Endocrinol* 45: 515-523, 1969.
89. **Lucas A.** Programming by early nutrition: an experimental approach. *J Nutr* 128: 401S-406S, 1998.
90. **Mackenzie HS and Brenner BM.** Fewer nephrons at birth: a missing link in the etiology of essential hypertension? *Am J Kidney Dis* 26: 91-98, 1995.
91. **MacLennan NK, James SJ, Melnyk S, Piroozi A, Jernigan S, Hsu JL, Janke SM, Pham TD and Lane RH.** Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. *Physiol Genomics* 18: 43-50, 2004.
92. **Majander A, Finel M and Wikstrom M.** Diphenyleneiodonium inhibits reduction of iron-sulfur clusters in the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J Biol Chem* 269: 21037-21042, 1994.
93. **Manalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C and Fundora I.** Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. *Kidney Int* 58: 770-773, 2000.

94. **Matsuno K, Yamada H, Iwata K, Jin D, Katsuyama M, Matsuki M, Takai S, Yamanishi K, Miyazaki M, Matsubara H and Yabe-Nishimura C.** Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation* 112: 2677-2685, 2005.
95. **McGuire JJ, Anderson DJ, McDonald BJ, Narayanasami R and Bennett BM.** Inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase and glyceryl trinitrate biotransformation by diphenyleneiodonium sulfate. *Biochem Pharmacol* 56: 881-893, 1998.
96. **McMillen IC and Robinson JS.** Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 85: 571-633, 2005.
97. **McMullen S, Gardner DS and Langley-Evans SC.** Prenatal programming of angiotensin II type 2 receptor expression in the rat. *Br J Nutr* 91: 133-140, 2004.
98. **Meyer JW, Holland JA, Ziegler LM, Chang MM, Beebe G and Schmitt ME.** Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in human endothelial cells :a potential atherogenic source of reactive oxygen species. *Endothelium* 7: 11-22, 1999.
99. **Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Forstermann U, Meinertz T, Griendling K and Munzel T.** Effects of

- angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 90: E58-E65, 2002.
100. **Moore AF, Heiderstadt NT, Huang E, Howell NL, Wang ZQ, Siragy HM and Carey RM.** Selective inhibition of the renal angiotensin type 2 receptor increases blood pressure in conscious rats. *Hypertension* 37: 1285-1291, 2001.
 101. **Mulvany MJ.** Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci* 17: 105-109, 2002.
 102. **Munzel T, Afanas'ev IB, Kleschyov AL and Harrison DG.** Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1761-1768, 2002.
 103. **Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE and Dzau VJ.** The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10663-10667, 1995.
 104. **Nishiyama A, Fukui T, Fujisawa Y, Rahman M, Tian RX, Kimura S and Abe Y.** Systemic and Regional Hemodynamic Responses to Tempol in Angiotensin II-Infused Hypertensive Rats. *Hypertension* 37: 77-83, 2001.

105. **Nozawa Y, Matsuura N, Miyake H, Yamada S and Kimura R.** Effects of TH-142177 on angiotensin II-induced proliferation, migration and intracellular signaling in vascular smooth muscle cells and on neointimal thickening after balloon injury. *Life Sci* 64: 2061-2070, 1999.

108. **O'Donnell BV, Tew DG, Jones OT and England PJ.** Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J* 290 (Pt 1): 41-49, 1993.

109. **Omar HA, Cherry PD, Mortelliti MP, Burke-Wolin T and Wolin MS.** Inhibition of coronary artery superoxide dismutase attenuates endothelium-dependent and -independent nitrovasodilator relaxation. *Circ Res* 69: 601-608, 1991.

110. **Osmond C, Barker DJ, Winter PD, Fall CH and Simmonds SJ.** Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ* 307: 1519-1524, 1993.

111. **Otsuka S, Sugano M, Makino N, Sawada S, Hata T and Niho Y.** Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 32: 467-472, 1998.

112. **Ozaki T, Nishina H, Hanson MA and Poston L.** Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol* 530: 141-152, 2001.
113. **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.
114. **Pham TD, MacLennan NK, Chiu CT, Laksana GS, Hsu JL and Lane RH.** Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R962-R970, 2003.
115. **Pinheiro SV, Simoes e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, Pesquero JB, Walther T, Alenina N, Bader M, Bleich M and Santos RA.** Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension* 44: 490-496, 2004.
117. **Pladys P, Lahaie I, Cambonie G, Thibault G, Le NL, Abran D and Nuyt AM.** Role of brain and peripheral angiotensin II in hypertension and altered arterial baroreflex programmed during fetal life in rat. *Pediatr Res* 55: 1042-1049, 2004.

118. **Pladys P, Sennlaub F, Brault S, Checchin D, Lahaie I, Le NL, Bibeau K, Cambonie G, Abran D, Brochu M, Thibault G, Hardy P, Chemtob S and Nuyt AM.** Microvascular rarefaction and decreased angiogenesis in rats with fetal programming of hypertension associated with exposure to a low protein diet in utero. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005.
119. **Poulter NR.** Birthweights, maternal cardiovascular events, and Barker hypothesis. *Lancet* 357: 1990-1991, 2001.
120. **Racasan S, Braam B, Koomans HA and Joles JA.** Programming blood pressure in adult SHR by shifting perinatal balance of NO and reactive oxygen species toward NO: the inverted Barker phenomenon. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F626-F636, 2005.
121. **Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK and Harrison DG.** Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97: 1916-1923, 1996.
122. **Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, Kurz S, Keiser J, Haleen S, Giaid A and Harrison DG.** Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 30: 29-34, 1997.

123. **Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN and Bleker OP.** Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 351: 173-177, 1998.
124. **Reinisch JM, Simon NG, Karow WG and Gandelman R.** Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth. *Science* 202: 436-438, 1978.
125. **Sahajpal V and Ashton N.** Increased glomerular angiotensin II binding in rats exposed to a maternal low protein diet in utero. *J Physiol* 563: 193-201, 2005.
126. **Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de B, I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R and Walther T.** Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8258-8263, 2003.
127. **Saruta T.** Mechanism of glucocorticoid-induced hypertension. *Hypertens Res* 19: 1-8, 1996.
128. **Schiffrin EL.** Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 43: 19-29, 2005.
129. **Schini VB and Vanhoutte PM.** Endothelin-1: a potent vasoactive peptide. *Pharmacol Toxicol* 69: 303-309, 1991.

130. **Schnackenberg CG, Welch WJ and Wilcox CS.** Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* 32: 59-64, 1998.
131. **Sherman RC and Langley-Evans SC.** Early administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril, prevents the development of hypertension programmed by intrauterine exposure to a maternal low-protein diet in the rat. *Clin Sci (Lond)* 94: 373-381, 1998.
132. **Siragy HM and Carey RM.** The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest* 100: 264-269, 1997.
133. **Solzbach U, Hornig B, Jeserich M and Just H.** Vitamin C improves endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in hypertensive patients. *Circulation* 96: 1513-1519, 1997.
134. **Somoza B, Gonzalez MC, Gonzalez JM, Abderrahim F, Arribas SM and Fernandez-Alfonso MS.** Modulatory role of the adventitia on noradrenaline and angiotensin II responses role of endothelium and AT2 receptors. *Cardiovasc Res* 65: 478-486, 2005.
135. **Spencer J, Wang Z and Hoy W.** Low birth weight and reduced renal volume in Aboriginal children. *Am J Kidney Dis* 37: 915-920, 2001.

136. **Stanner SA, Bulmer K, Andres C, Lantseva OE, Borodina V, Poteen VV and Yudkin JS.** Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. *BMJ* 315: 1342-1348, 1997.
137. **Stein CE, Fall CH, Kumaran K, Osmond C, Cox V and Barker DJ.** Fetal growth and coronary heart disease in south India. *Lancet* 348: 1269-1273, 1996.
138. **Stolk J, Rossie W and Dijkman JH.** Apocynin improves the efficacy of secretory leukocyte protease inhibitor in experimental emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 1628-1631, 1994.
139. **Tangalakis K, Lumbers ER, Moritz KM, Towstoless MK and Wintour EM.** Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. *Exp Physiol* 77: 709-717, 1992.
140. **Tannirandorn Y, Fisk NM, Shah V, Dillon MJ, Nicolini U and Rodeck CH.** Plasma renin activity in fetal disease. *J Perinat Med* 18: 229-231, 1990.
141. **Tarpey MM and Fridovich I.** Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res* 89: 224-236, 2001.

142. **Thame M, Wilks RJ, McFarlane-Anderson N, Bennett FI and Forrester TE.** Relationship between maternal nutritional status and infant's weight and body proportions at birth. *Eur J Clin Nutr* 51: 134-138, 1997.
143. **Thannickal VJ and Fanburg BL.** Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1005-L1028, 2000.
144. **Touyz RM.** Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* 37: 1263-1273, 2004.
145. **Touyz RM, El Mabrouk M, He G, Wu XH and Schiffrin EL.** Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition attenuates angiotensin II-mediated signaling and contraction in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 84: 505-515, 1999.
146. **Touyz RM and Schiffrin EL.** Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52: 639-672, 2000.
147. **Touyz RM and Schiffrin EL.** Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 122: 339-352, 2004.
148. **Van Geel PP, Pinto YM, Voors AA, Buikema H, Oosterga M, Crijsns HJ and van Gilst WH.** Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene

- polymorphism is associated with an increased response to angiotensin II in human arteries. *Hypertension* 35: 717-721, 2000.
149. **Vanhoutte PM.** Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Adv Nephrol Necker Hosp* 19: 3-16, 1990.
150. **Vehaskari VM, Aviles DH and Manning J.** Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int* 59: 238-245, 2001.
151. **Vehaskari VM, Stewart T, Lafont D, Soyez C, Seth D and Manning J.** Kidney angiotensin and angiotensin receptor expression in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F262-F267, 2004.
152. **Virdis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM and Schiffrin EL.** Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens* 22: 535-542, 2004.
153. **Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, Schneider B, Waldhausl W and Binder BR.** Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 267: 16066-16068, 1992.
154. **Wartenberg M, Hoffmann E, Schwindt H, Grunheck F, Petros J, Arnold JR, Hescheler J and Sauer H.** Reactive oxygen species-linked regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in Nox-1 overexpressing prostate tumor spheroids. *FEBS Lett* 579: 4541-4549, 2005.

155. **Waterland RA and Jirtle RL.** Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 20: 63-68, 2004.
156. **Whitebread S, Mele M, Kamber B and de Gasparo M.** Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 163: 284-291, 1989.
157. **Wintour EM, Johnson K, Koukoulas I, Moritz K, Tersteeg M and Dodic M.** Programming the cardiovascular system, kidney and the brain--a review. *Placenta* 24 Suppl A: S65-S71, 2003.
158. **Woodall SM, Johnston BM, Breier BH and Gluckman PD.** Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res* 40: 438-443, 1996.
159. **Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR and Rasch R.** Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* 49: 460-467, 2001.
160. **Wu R, Millette E, Wu L and de Champlain J.** Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 19: 741-748, 2001.

161. **Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K and Masaki T.** A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415, 1988.
162. **Yokoyama M, Inoue N and Kawashima S.** Role of the vascular NADH/NADPH oxidase system in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 902: 241-247, 2000.
163. **Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ and Diez J.** Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 38: 1395-1399, 2001.
164. **Zhuo J, Moeller I, Jenkins T, Chai SY, Allen AM, Ohishi M and Mendelsohn FA.** Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors. *J Hypertens* 16: 2027-2037, 1998.

Références complémentaires

165. **Ferreira A J, Santos R A S.** Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian Journal of Medical And Biological Research* 38: 499-507, 2005.
166. **Touyz RM.** Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Anti Redox Signal.* 7(9-10): 1302-1314, 2005.
167. **Ryan MJ, Didion SP, Mathur S, Faraci FM, Sigmund CD.** Angiotensin II-induced vascular dysfunction is mediated by the AT1A receptor in mice. *hypertension.* 43(5):1074-9.

168. **Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RE, Szocs K, Sorescu GP.** Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*. 105:1429-35, 2002.
169. **Gorlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R.** A gp 91 phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res*. 87:26-32, 2000.
170. **Rey FE, Pagano PJ.** The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22: 1962-71, 2002.
171. **Lassegue B, Clempus RE.** Vascular NAD(P)H oxidase: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285:R277-97, 2003.
172. **Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hugues EJ, Jones OTG.** Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol*. 271:H1626-34,1996
173. **Pagano PJ, Chanock SJ, Siwik DA, Colucci WS, Clark JK.** Angiotensin II induces p67 phox mRNA expression in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension*. 32:331-7, 1998.
174. **Szocs K, Lassegue B, Sorescu D, Hilenny LL, Valppu L, Couse TL.** Up regulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vas Bio*. 22: 2037-43, 2002.