

Université de Montréal

**Évolution de la nature et de l'efficacité du facteur  
hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) au cours  
du vieillissement associé ou non à l'hypercholestérolémie  
dans les artères de résistance du muscle squelettique de la  
souris**

Par :

**Stéphane Krummen**

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Université de Montréal

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de PhD en Physiologie



Septembre 2004

©, Stéphane Krummen, 2004  
Université de Montréal  
Faculté des études supérieures





**Direction des bibliothèques**

**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.

Cette thèse intitulée :  
**“Évolution de la nature et de l’efficacité du facteur hyperpolarisant dérivé de  
l’endothélium (EDHF) au cours du vieillissement associé ou non à  
l’hypercholestérolémie dans les artères de résistance du muscle squelettique de la  
souris”**

Présentée par : Stéphane Krummen

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

- Dr Éric Thorin, directeur de recherche
- Dr Jacques de Champlain, président-rapporteur
- Dr Daniel Lamontagne, membre interne
- Dr Daniel Henrion, membre externe
- Un représentant du doyen de la faculté de Médecine

## Résumé Français

Des trois vasodilatateurs libérés par l'endothélium en réponse à l'acétylcholine, l'EDHF est le plus important au niveau des artères de résistance. La nature et le mécanisme d'action du facteur EDHF au niveau de l'artère *gracilis* de la souris n'ont pas été bien élucidés. Les effets des diverses conditions pathologiques et du vieillissement sur la fonction EDHF ne sont pas bien connus non plus. Nous avons donc décidé d'étudier la nature et le mécanisme d'action du facteur EDHF au niveau de l'artère *gracilis* de la souris ainsi que les effets du vieillissement, de l'hypercholestérolémie et de ces deux facteurs combinés.

Nous avons utilisé des artères *gracilis* de souris mâles témoins de souche C57Bl6 âgées de 3, 12 et 18 mois et de souris mâle transgéniques âgées de 3, 12 et 20 mois exprimant le gène codant pour l'apolipoprotéine B-100 humaine (hApoB<sup>+/+</sup>). Des segments d'artères étaient montés dans un artériographe et pressurisés à 80 mmHg. Des dilatations dépendantes d'EDHF induites par l'acétylcholine étaient mesurées en présence de L-NNA et d'indométhacine afin de bloquer la formation de NO et de PGI<sub>2</sub>, respectivement. Les résultats étaient exprimés sous forme de moyenne ± erreur standard.

Dans l'artère *gracilis* de la souris, l'EDHF est constitué par une augmentation extracellulaire de la concentration d'ions K<sup>+</sup> générée par les canaux endothéliaux SK<sub>Ca</sub> et IK<sub>Ca</sub> qui activent les canaux K<sub>ir</sub> et les pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases provoquant ainsi l'hyperpolarisation et la relaxation des cellules musculaires lisses. Le vieillissement réduit la dilatation dépendante d'EDHF. La réponse EDHF perd de l'efficacité entre 3 mois et 12 mois et la sensibilité à l'acétylcholine diminue entre 12 mois et 18 mois. À 12 mois, un métabolite non-identifié de l'acide arachidonique généré par un cytochrome P450 participe à la réponse EDHF. À 18 mois, ce métabolite de l'acide arachidonique semble toujours jouer un rôle mais il ne semble plus être aussi impliqué qu'à 12 mois. L'hypercholestérolémie augmente la dilatation dépendante d'EDHF à 3 mois dans l'artère *gracilis* de la souris. La réponse EDHF est ensuite drastiquement détériorée, et ce de façon plus importante que chez la souris

saine, à 12 et à 20 mois chez la souris hypercholestérolémique. À 3 mois en condition hypercholestérolémique, un métabolite non-identifié de l'acide arachidonique généré par un cytochrome P450 participe à la réponse EDHF et compense pour une perte de l'efficacité du principal EDHF composé des ions  $K^+$ . À 12 mois, ce métabolite de l'acide arachidonique est toujours présent mais son action est inhibée par le stress oxydant. Un antioxydant, le n-acétyl-l-cystéine régénère la réponse EDHF à une valeur similaire à celle observable à 3 mois. À 18 mois, le n-acétyl-l-cystéine n'a pas d'effet sur la réponse EDHF suggérant la présence de dommages irréversibles par les radicaux libres. En conclusion, l'ion  $K^+$  est l'EDHF dans l'artère *gracilis* de la souris. Il perd cependant son efficacité avec l'âge. Un EDHF compensateur métabolite d'un cytochrome P450 apparaît chez la souris normale à 12 mois et dès l'âge de 3 mois en présence d'hypercholestérolémie. Le mécanisme responsable de l'expression de cet EDHF compensateur reste à définir.

**Mots clés;** EDHF, vieillissement, hypercholestérolémie, artère *gracilis*, endothélium, muscle lisse, ions  $K^+$ , EETs.

## Résumé Anglais

Of the three known vasodilatory substances secreted in response to acetylcholine by the endothelium, EDHF is the most important in resistance arteries. Both the nature and mechanism of EDHF in the mouse *gracilis* artery are not well known as well as the impact of risk factors for cardiovascular disease and aging on EDHF. We studied the nature and the mechanism of action of EDHF in the *gracilis* artery of mice with or without hypercholesterolemia and through age.

We used *gracilis* arteries from 3, 12 and 18 m/o male C57Bl6 mice and from 3, 12 and 20 m/o male transgenic mice expressing the human apolipoprotein B-100 (hApoB<sup>+/+</sup>). Arterial segments of 2 to 3 mm were mounted in an arteriograph and pressurized at 80 mmHg. EDHF-dependent dilations to acetylcholine were measured in the presence of L-NNA and indomethacin to block the formation of NO and PGI<sub>2</sub>, respectively. Results were expressed as mean ± SEM.

In the mice *gracilis* artery, EDHF is constituted by an extracellular increase of the K<sup>+</sup> ion concentration generated by endothelial SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> channels activating K<sub>ir</sub> channels and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pumps. This leads to hyperpolarization and relaxation of the smooth muscle cells. Aging reduces the EDHF-dependent dilation. The EDHF response loses efficacy between 3 and 12 months of age and the sensitivity to acetylcholine decreases between 12 and 18 months of age. At 12 months of age, an unidentified arachidonic acid metabolite generated by a cytochrome P450 participates in the EDHF response. At 18 months of age, this arachidonic acid metabolite still plays a role but its implication is less important than at 12 months of age. Hypercholesterolemia augments EDHF-dependent dilation at 3 months of age in the mouse *gracilis* artery. The EDHF response then declines dramatically with age, and more so than in the control mouse. In 3 month old HC mice, an unidentified arachidonic acid metabolite generated by a cytochrome P450 participates in the EDHF response and compensates for the loss of efficacy of K<sup>+</sup> ions. At 12 months of age, this arachidonic acid metabolite is still present but its action is inhibited by oxidative stress. The antioxidant, n-acetyl-l-cystein restores EDHF response. At 18 months of age, n-acetyl-l-cystein had no effect on EDHF suggesting irreversible

damages that reactive oxygen species have produced to the endothelium. In conclusion,  $K^+$  ions is EDHF in the mouse gracilis artery. Its efficacy declines with age. In healthy mice, a compensatory EDHF, metabolite of a CYP450, appears at 12 m/o. In HC mice, this compensatory EDHF pathway is already present at 3 m/o. The mechanism responsible for the apparition of this alternative pathway remains to be clarified.

**Keywords;** EDHF, aging, hypercholesterolemia, gracilis *artery*, endothelium, smooth muscle,  $K^+$  ions, EETs.



## Table des matières

Page titre.....	iii
Composition du jury.....	iii
Résumé Français.....	iii
Résumé Anglais.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des Figures.....	ix
Liste des Tableaux.....	xi
Abréviations.....	xii
<b>1.0- Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1- Endothélium.....	1
1.1.1- Substances vasoconstrictrices.....	1
1.1.2- Substances vasodilatatrices.....	3
1.1.2.1- Prostacycline.....	5
1.1.2.2. Monoxyde d'azote (NO).....	5
1.1.2.3- Vasodilatation indépendante du NO et de la PGI <sub>2</sub> .....	8
1.2- Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF).....	10
1.2.1- Mécanisme d'action d'EDHF.....	10
1.2.2- Facteurs EDHF.....	12
1.2.2.1- Endocannabinoïdes.....	13
1.2.2.2- Peptide C natriurétique.....	15
1.2.2.3- Peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	17
1.2.2.4- Jonctions Gap myoendothéliales.....	20
1.2.2.5- Acides époxyéicosatriénoïques (EETs).....	24
1.2.2.6- Ions potassiques (K <sup>+</sup> ).....	30
1.2.2.7- EDHF : un consensus?.....	35
1.3- Dysfonction endothéliale.....	36
1.3.1- Hypercholestérolémie.....	37
1.3.1.1- Effets de l'hypercholestérolémie sur la fonction vasodilatatrice endothéliale indépendante d'EDHF.....	38
1.3.1.2- Effets de l'hypercholestérolémie sur la fonction vasodilatatrice endothéliale dépendante d'EDHF.....	40
1.3.2- Athérosclérose.....	42
1.4- Vieillesse.....	45
1.4.1- Effets du vieillissement sur le système vasculaire.....	45
1.4.2- Endothélium régénéré.....	47

1.4.3- Effets du vieillissement sur la fonction vasodilatatrice endothéliale indépendante d'EDHF .....	49
1.4.4- Effets du vieillissement sur la fonction vasodilatatrice endothéliale dépendante d'EDHF .....	50
<b>2.0- Démarche scientifique .....</b>	<b>52</b>
<b>3.0- Méthodes expérimentales.....</b>	<b>54</b>
3.1- Modèle animal .....	54
3.2- Artère pressurisée .....	56
<b>4.0- Articles .....</b>	<b>59</b>
4.1- Article #1: Two distinct pathways account for EDHF-dependent dilatation in the gracilis artery of dyslipidemic hApoB <sup>+/+</sup> mice .....	59
4.2- Article #2: Age-associated decline in EDHF-dependent dilation of the <i>gracilis</i> artery is magnified by dyslipidemia in mice.....	85
<b>5.0- Discussion .....</b>	<b>110</b>
5.1- Nature et mécanisme d'action d'EDHF dans l'artère gracilis de la souris âgée de 3 mois.....	110
5.2- Effet du vieillissement sur la nature et le mécanisme d'action d'EDHF au niveau de l'artère gracilis de la souris .....	112
5.3- Effet de l'hypercholestérolémie et du vieillissement sur la nature et le mécanisme d'action d'EDHF au niveau de l'artère gracilis de la souris.....	117
<b>6.0- Conclusion .....</b>	<b>120</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>122</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>125</b>

## Liste des Figures

<b>Figure 1-</b> Sécrétion et mécanismes des substances vasodilatatrices dérivées de l'endothélium.....	4
<b>Figure 2-</b> Facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHFs).....	13
<b>Figure 3-</b> Hyperpolarisation endothéliale et musculaire lisse dépendante du peptide C natriurétique.....	16
<b>Figure 4-</b> Formation et dégradation du peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	18
<b>Figure 5-</b> Action du peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) sur les cellules musculaires lisses.....	20
<b>Figure 6-</b> L'acide arachidonique et ses métabolites.....	24
<b>Figure 7-</b> EETs et EDHF. Effets directs et, indirects par le biais des jonctions gap myoendothéliales.....	26
<b>Figure 8-</b> Structure de la pompe Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase.....	29
<b>Figure 9-</b> Progression de l'athérosclérose dans le temps.....	40
<b>Figure 10-</b> Canaux, pompes et enzymes et leurs inhibiteurs.....	55
<b>Figure 11-</b> Nature et mécanisme d'action d'EDHF dans l'artère <i>gracilis</i> de la souris âgée de 3 mois.....	124
<b>Figure 12-</b> Effet du vieillissement sur la nature et le mécanisme d'action d'EDHF dans l'artère <i>gracilis</i> de la souris âgée de 3, 12 et 18 mois.....	125
<b>Figure 13-</b> Effet du vieillissement associé à l'hypercholestérolémie sur la nature et le mécanisme d'action d'EDHF dans l'artère <i>gracilis</i> de la souris âgée de 3, 12 et 20 mois.....	130
<b>Figure de l'article #1</b> .....	81
Figure 1. Effect of combined addition of apamin (Apa; 1 μM) and charybdotoxin (ChTx, 100 nM) on Ach-induced dilatation of <i>gracilis</i> arteries isolated from hApoB <sup>+/+</sup> (DL, n = 5) and WT (n = 7) mice.....	81
Figure 2. Effect of combined addition of Ba <sup>2+</sup> (30 μM) and ouabain (Ouab, 1 mM) on Ach-induced dilatation of <i>gracilis</i> arteries isolated from hApoB <sup>+/+</sup> (DL, n = 6) and WT (n = 4) mice.....	82

Figure 3. Effect of EEZE (1  $\mu$ M) alone or with (n = 3) the combination of Ba<sup>2+</sup> (30  $\mu$ M) and ouabain (Ouab, 1 mM) on Ach-induced dilatation of *gracilis* arteries isolated from hApoB<sup>+/+</sup> (DL, n=6) and WT (n=4) mice.....83

**Figure de l'article #2**.....107

Figure 1. Acetylcholine-induced dilation of *gracilis* arteries isolated from 3, 12 and 20 m/o WT (left panels) and DL (right panels) mice. (A and B) In control conditions (n = 7, 8 and 5, respectively), (C and D) in the presence of ouabain (1 mmol l<sup>-1</sup>; n = 7, 6 and 4, respectively), and (E and F) in the presence of 17-ODYA (10  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>; n = 6, 6 and 5 respectively).....107

Figure 2. Acetylcholine-induced dilation of *gracilis* arteries isolated of 3 and 12 m/o DL mice (n=7 and 8 respectively). In arteries isolated from 12 m/o mice, the effects of N-Acetyl-L-Cystein (NAC; 1  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>) alone (n = 6), NAC plus 17-ODYA (10  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>, n = 6) and NAC plus 17-ODYA and ouabain (1 mmol l<sup>-1</sup>, n = 6) are reported.....108

## Liste des Tableaux

<b>Tableaux de l'article #1</b> .....	79
Table 1. Efficacy ( $E_{max}$ ) and sensitivity ( $pD_2$ ) to ACh of the <i>gracilis</i> artery isolated from wild type and dyslipidemic (hApoB <sup>+/+</sup> ) mice.....	79
Table 2. Myogenic tone of the <i>gracilis</i> artery isolated from wild type and dyslipidemic (hApoB <sup>+/+</sup> ) mice.....	80
<b>Tableaux de l'article #2</b> .....	107
Table 1. Efficacy ( $E_{max}$ ) and sensibility ( $pD_2$ ) to acetylcholine of the <i>gracilis</i> artery isolated from 3, 12 and 20 m/o WT and DL mice.....	107
Table 2. Myogenic tone of the <i>gracilis</i> artery isolated from 3, 12 and 20 m/o WT and DL mice.....	108

## Abréviations

Ach	Acétylcholine
ADMA	Diméthylarginine asymétrique
ADP	Adénosine diphosphate
AMPC	3'-5'-adénosine monophosphate cyclique
Ang I	Angiotensine I
Ang II	Angiotensine II
ANP	Peptide natriurétique auriculaire
Apa	Apamine
ApoE	Apolipoprotéine E
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
AT <sub>1</sub>	Récepteur 1 de l'angiotensine
AT <sub>2</sub>	Récepteur 2 de l'angiotensine
Ba <sup>2+</sup>	Ion Barium
BH <sub>4</sub>	5,6,7,8-tetra-hydrobioptérine réduite
BK <sub>Ca</sub>	Canal potassique activé par le calcium à grande conductance
BNP	Peptide natriurétique cérébral
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Chlorure de calcium
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentration de calcium intracellulaire
Ca <sub>L</sub>	Canal calcique voltage-dépendant de type L
CB <sub>1</sub>	Récepteur 1 des cannabinoïdes
CB <sub>2</sub>	Récepteur 2 des cannabinoïdes
Chtx	Charybdotoxine
CNP	Peptide natriurétique C
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
COX	Cyclooxygénase
Cx	Connexine
CYP450	Cytochrome P450
DAG	Diacylglycérol

DHET	Acide dihydroxyéicosatriénoïque
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
EDRF	Facteur relaxant dérivé de l'endothélium
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EEZE	Acide 14,15-époxyéicosa-5(Z)-énoïque
EET	Acide époxyéicosatriénoïque
EGTA	Acide éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)-N,N,N',N'- tétraacétique
eNOS	Monoxyde d'azote synthétase endothéliale
ET <sub>A</sub>	Récepteur A de l'endothéline
ET <sub>B</sub>	Récepteur B de l'endothéline
FAD	Adénine flavine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
GAP 27	Bloqueur des jonctions gap
GMPC	3'5'-guanoside monophosphate cyclique
hApoB <sup>+/+</sup>	Apolipoprotéine humaine B-100 double positif
HETE	Acide hydroxyéicosatriénoïque
HMG-CoA	β-hydroxy-β-méthylglutaryl-coenzyme A
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Péroxyde d'hydrogène
HTA	Hypertension artérielle
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire de type 1
IDL	Lipoprotéine à densité intermédiaire
IK <sub>Ca</sub>	Canal potassique activé par le calcium à conductance intermédiaire
Indo	Indométhacine
iNOS	Monoxyde d'azote synthétase inductible
IP	Récepteur I <sub>2</sub> des prostaglandines
IP <sub>3</sub>	Inositol triphosphate
K <sup>+</sup>	Ion potassium
K <sub>Ca</sub>	Canal potassique activé par le calcium
KCl	Chlorure de potassium
kDa	KiloDalton

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Phosphate de potassium
$\text{K}_{\text{ir}}$	Canal potassique à rectification entrante
$[\text{K}^+]_o$	Concentration de potassium extracellulaire
$\text{K}_v$	Canal potassique voltage-dépendant
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LDLR <sup>-/-</sup>	Récepteur des lipoprotéines de faible densité double négatif
L-NNA	N <sup>o</sup> -nitro-L-arginine
MDA	Malondialdéhyde
$\text{Mg}^{2+}$	Ion magnésium
$\text{MgSO}_4$	Sulfate de magnésium
mM	Millimolaire
MT	Tonus myogénique
mV	Millivolt
$\text{N}_2$	Azote
NA	Noradrénaline
$\text{Na}^+$	Ion sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NADPH-CYP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate cytochrome réductase
$\text{NaHCO}_3$	Bicarbonate de sodium
$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase	Pompe sodium/potassium
nNOS	Monoxyde d'azote synthétase neuronale
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Monoxyde d'azote synthétase
NPR	Récepteur des peptides natriurétiques
NPR-B	Récepteur de type B des peptides natriurétiques
NPR-C	Récepteur de type C des peptides natriurétiques
$\cdot\text{OH}$	Radical hydroxyl
O-1918	Analogue des cannabinoïdes
$\text{O}_2$	Oxygène
$\text{O}_2^-$	Anion superoxyde



PGH <sub>2</sub>	Prostaglandine H <sub>2</sub>
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandine D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PGF <sub>2</sub>	Prostaglandine F <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostacycline
PIP <sub>2</sub>	Phosphoinositol biphosphate
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMCA	Pompe calcium-dépendante de la membrane plasmique
P <sub>o</sub>	Probabilité d'ouverture
PSS	Solution saline physiologique
Rb <sup>+</sup>	Ion rubidium
ROS	Espèce oxygénée radicalaire (radicaux libres)
SERCA	Pompe calcium-dépendante du réticulum sarcoplasmique
SK <sub>Ca</sub>	Canal potassique activé par le calcium à petite conductance
SNP	Nitroprusside
SR141716A	Antagoniste du récepteur 1 des cannabinoïdes
TP	Récepteur du thromboxane de la famille des récepteurs TX
TRP	Canal récepteur à potentiel transitoire
TX	Récepteur du thromboxane
TxA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
μm	Micromètre
VCAM-1	Molécule d'adhésion vasculaire de type 1
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité
1-EBIO	1-éthyl-2-benzimidazolinone
5-HT	Sérotonine
5-HT <sub>2</sub>	Récepteur de la sérotonine
15-HPETE	15-hydropéroxyéicosatétranoïque
13-HPODE	13-hydropéroxyoctadécadiénoïque
17-ODYA	acide 17-octadécynoïque

## **1.0- Introduction**

### **1.1- Endothélium**

L'endothélium est un tissu d'environ 1 kg composé d'une couche monocellulaire tapissant la surface luminale des vaisseaux sanguins. Chez l'humain, il est composé de  $1 \text{ à } 6 \times 10^{13}$  cellules. Il y a environ 25 ans, l'endothélium était avant tout perçu comme une frontière empêchant le sang de quitter la lumière des vaisseaux sanguins et de s'infiltrer parmi les cellules musculaires lisses. Depuis, plusieurs fonctions ont été découvertes et associées à l'endothélium vasculaire. Plutôt qu'une simple barrière hémostatique, l'endothélium est maintenant reconnu comme étant une couche cellulaire semi-perméable permettant le transport de solutés et de macromolécules impliqués dans le métabolisme de plusieurs substances circulant dans le sang ou synthétisées localement. L'endothélium est aussi impliqué dans le contrôle de la prolifération des cellules musculaires sous-jacentes et il a une influence directe sur l'adhésion et la libération de composantes du système immunitaire et inflammatoire telles que les neutrophiles et les macrophages. L'endothélium contribue aussi à la régulation du tonus vasculaire et il présente une surface luminale non thrombogénique. Ces fonctions endothéliales dérivent directement de la capacité qu'a celui-ci de répondre à des stimuli humoraux et hémodynamiques entre autres en exprimant des protéines de liaison, des molécules d'adhésion et en sécrétant des facteurs vasoconstricteurs ou vasodilatateurs.

#### **1.1.1- Substances vasoconstrictrices**

L'endothélium est généralement reconnu comme étant vasodilatateur. En effet, il a déjà été observé *in vitro* que l'élimination de l'endothélium augmente l'amplitude des réponses aux agonistes vasoconstricteurs. Pourtant, l'endothélium vasculaire peut sécréter des substances vasoconstrictrices telles que le thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), la prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), l'angiotensine II, l'endothéline et l'anion superoxyde mais leur importance varie selon les lits vasculaires.

Le  $\text{TxA}_2$  et la  $\text{PGH}_2$  sont produits à partir de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases. La  $\text{PGH}_2$  peut être métabolisée en prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ) par la  $\text{PGI}_2$ -synthétase ou en prostaglandine  $\text{D}_2$  ( $\text{PGD}_2$ ), en prostaglandine  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ), en prostaglandine  $\text{F}_2$  ( $\text{PGF}_2$ ) ou en  $\text{TxA}_2$  par divers procédés enzymatiques. La  $\text{PGH}_2$  et le  $\text{TxA}_2$  ont des effets vasoconstricteurs et stimulent l'aggrégation plaquettaire lorsque liés à leur récepteur TX<sup>1;2</sup>. Le récepteur TX des cellules musculaires lisses est un récepteur TP composé de sept passages transmembranaires couplé à une protéine Gq<sup>3</sup>. Une fois stimulé, ce récepteur active la phospholipase C (PLC) responsable de la dégradation du phosphoinositol biphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ). Ces deux effecteurs augmentent la concentration intracellulaire calcique ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (via  $\text{IP}_3$ ) et la sensibilité de l'appareil contractile au  $\text{Ca}^{2+}$  (via DAG) et entraînent donc la contraction des cellules musculaires lisses<sup>4</sup>.

L'angiotensine II (Ang II) est synthétisée à partir de l'angiotensine I (Ang I) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) présente dans l'endothélium vasculaire<sup>5</sup>. Les effets vasoconstricteurs de l'Ang II sont obtenus par le biais de l'activation du récepteur  $\text{AT}_1$  des cellules musculaires lisses<sup>6</sup>. Ces récepteurs stimulent aussi la prolifération et l'hypertrophie des cellules musculaires lisses<sup>7</sup>. Le récepteur  $\text{AT}_1$  musculaire lisse génère ces effets en stimulant ou en inhibant l'activité de nombreux effecteurs secondaires tels que la PLC via une protéine Gq<sup>8</sup>, la phospholipase A2 ( $\text{PLA}_2$ )<sup>9</sup>, la phospholipase D (PLD)<sup>10</sup>, l'adénylate cyclase<sup>11</sup> et les canaux calciques<sup>12</sup>. L'Ang II peut aussi avoir des effets vasodilatateurs en activant les récepteurs  $\text{AT}_2$  endothéliaux, activation qui engendre la formation de NO et de  $\text{PGI}_2$ . Cependant, ces effets vasodilatateurs sont généralement masqués par les effets vasoconstricteurs beaucoup plus soutenus des récepteurs  $\text{AT}_1$ .

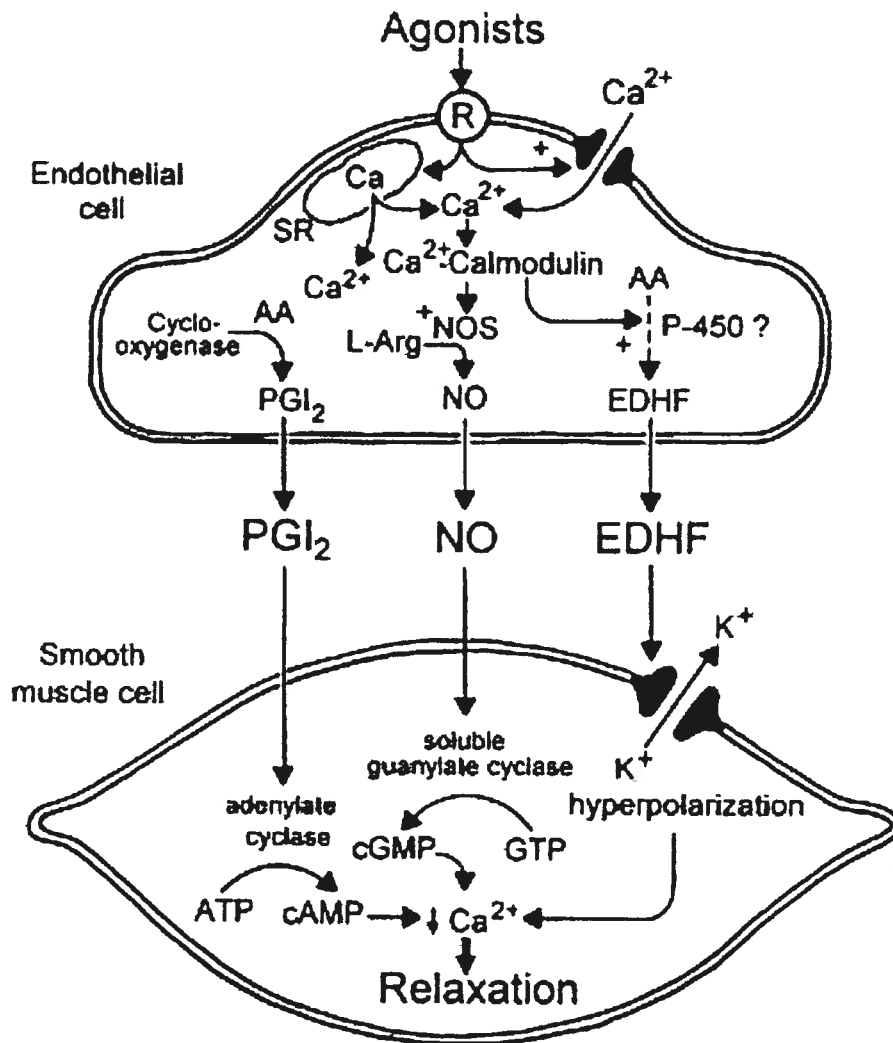
Les cellules endothéliales peuvent aussi synthétiser de l'endothéline à partir de la préproendothéline grâce à l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE)<sup>13</sup>. L'endothéline exerce ses effets par le biais de deux récepteurs couplés à des protéines G, soit le récepteur  $\text{ET}_A$  présent au niveau des cellules musculaires lisses et le récepteur  $\text{ET}_B$  présent au niveau de l'endothélium et du muscle lisse. L'activation du récepteur  $\text{ET}_A$  induit une vasoconstriction ainsi qu'une hypertrophie

et une prolifération des cellules musculaires lisses <sup>14;15</sup>. L'endothéline favorise aussi la production de NO et de PGI<sub>2</sub> par son action sur les récepteurs ET<sub>B</sub> endothéliaux provoquant donc une vasodilatation mais cet effet est beaucoup moins marqué que la vasoconstriction obtenue par l'activation des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> musculaires. Il a également été démontré que le récepteur ET<sub>B</sub> est responsable de la synthèse de la TxA<sub>2</sub> <sup>16</sup>.

Les anions superoxydes ont des effets vasoconstricteurs en condition de stress oxydant supranormal <sup>17</sup>. Des quantités élevées de ce radical libre peuvent être générées par les cellules endothéliales lorsque la protéine kinase C (PKC) est activée <sup>18</sup>, en condition de reperfusion <sup>19</sup>, ou encore en réponse à l'étirement <sup>20</sup>. De plus, les réactions catalysées par la cyclooxygénase et la NADH oxydoréductase peuvent aussi former des anions superoxydes <sup>21</sup>. Des niveaux élevés d'anions superoxydes agissent sur le tonus vasculaire principalement en inactivant le NO <sup>17</sup>. Lorsque l'anion superoxyde réagit avec le NO, il y a formation de peroxyde d'azote, un puissant radical libre <sup>22</sup>. L'anion superoxyde affecte aussi le tonus vasculaire en inhibant la synthèse endothéliale de PGI<sub>2</sub> <sup>23</sup>.

### **1.1.2- Substances vasodilatatrices**

L'endothélium agit aussi au niveau du tonus vasculaire en libérant des substances vasodilatatrices. Ces facteurs génèrent leurs effets directement sur les cellules musculaires lisses sous-jacentes. Plusieurs stimuli physiologiques entraînent une sécrétion endothéliale de substances vasodilatatrices telles que le NO, la PGI<sub>2</sub> et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) (figure 1).



(Vanhoutte, 2004)<sup>24</sup>

Figure 1. Sécrétion et mécanismes des substances vasodilatatrices dérivées de l'endothélium. L'activation du récepteur endothélial (R) induit une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme de la cellule endothéliale. L'augmentation de la quantité d'inositol phosphate ( $\text{IP}_3$ ) qui s'en suit peut contribuer à l'augmentation du niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique en favorisant un efflux du réticulum sarcoplasmique (RS). Suite à son interaction avec la calmoduline, le  $\text{Ca}^{2+}$  active la monoxyde d'azote synthétase (NOS) et favorise la libération du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). La production de prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ) par l'action de la cyclooxygénase sur l'acide arachidonique (AA) est aussi accélérée par l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$ . La relaxation induite par le NO est causée par l'activation de la formation de GMP cyclique à partir du GTP. La prostacycline induit la relaxation en activant la formation d'AMP cyclique à partir d'ATP. L'EDHF induit l'hyperpolarisation et la relaxation en ouvrant les canaux  $\text{K}^+$ .

### 1.1.2.1- Prostacycline

La prostacycline est un puissant vasodilatateur découvert en 1976<sup>24;25</sup>. Sa synthèse est catalysée par l'action de la PGI<sub>2</sub> synthétase sur la PGH<sub>2</sub><sup>24;26</sup>. Cette dernière est produite à partir de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases. La PGI<sub>2</sub> est le produit majeur issu de l'activation endothéliale de la cyclooxygénase 1<sup>27</sup>. La disponibilité de l'acide arachidonique libéré par la PLA<sub>2</sub> est l'étape limitante de la formation de PGI<sub>2</sub>. La PLA<sub>2</sub> est calcium-dépendante<sup>28</sup>. La PGI<sub>2</sub> agit sur le muscle lisse en activant les récepteurs IP (*Prostaglandin I<sub>2</sub>-receptor*)<sup>29</sup>. Ces récepteurs à sept passages transmembranaires sont couplés aux protéines G<sub>s</sub> et ils induisent la formation de 3'-5'-adénosine monophosphate cyclique (AMPC) par l'activation de l'adénylate cyclase<sup>30</sup>. L'AMPC a des effets relaxants au niveau des cellules musculaires lisses et inhibe l'aggrégation plaquettaire<sup>31;32</sup>. Les effets vasorelaxants de l'AMPC sont générés entre autres par l'ouverture de canaux potassiques et par l'activation des pompes calcium-dépendantes du réticulum sarcoplasmique (SERCA) et de la membrane plasmique (PMCA). Dans la plupart des vaisseaux sanguins, la contribution de la PGI<sub>2</sub> à la relaxation endothélium-dépendante est négligeable, et son effet s'ajoute essentiellement à ceux du NO et du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). Ainsi, de nombreux stimuli favorisant la libération de NO par les cellules endothéliales stimulent aussi la libération de PGI<sub>2</sub> comme, par exemple, l'hypoxie, les forces de cisaillements, la bradykinine, l'acétylcholine, l'angiotensine et l'endothéline<sup>33-36</sup>.

### 1.1.2.2. Monoxyde d'azote (NO)

Ce n'est qu'en 1980 que la fonction vasodilatatrice de l'endothélium vasculaire a été pour la première fois observée<sup>37</sup>. Le facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF) découvert par Furchgott a par la suite été identifié en 1987 comme étant le monoxyde d'azote (NO)<sup>38</sup>. Le NO est synthétisé à partir de l'extrémité guanidine de la L-arginine lors d'une réaction catalysée par la NO synthétase (NOS). En plus du NO, la L-citrulline est produite lors de cette réaction. La NOS existe sous trois

isoformes différentes soient les NOS endothéliale, neuronale et inducible. La NOS endothéliale (eNOS) est une enzyme membranaire constitutivement exprimée au niveau des cellules endothéliales, des plaquettes et du myocarde <sup>39</sup>. La NOS neuronale (nNOS), aussi exprimée de manière constitutive, est une enzyme cytosolique localisée dans les neurones et dans les muscles squelettiques <sup>40;41</sup>. L'activation de ces deux NOS requiert la présence de calcium et de calmoduline. De plus, pour avoir une activité optimale, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) et la 5,6,7,8-tetra-hydrobioptérine réduite (BH<sub>4</sub>) doivent être présents <sup>42</sup>. Il semblerait qu'il soit possible d'activer la eNOS et la nNOS de manière partiellement calcium-indépendante. Par exemple, l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase et, subséquemment, l'activation des sérines kinases Akt et de la protéine kinase A permettent la phosphorylation d'un résidu sérine du domaine réducteur de la NOS, augmentant ainsi l'activité de cette enzyme <sup>43</sup>. La chélation du calcium intracellulaire inhibe tout de même la NOS activée de cette façon démontrant donc que le calcium est nécessaire à l'activité de ces 2 isoformes de la NOS <sup>43</sup>. La NOS inducible (iNOS) est exprimée dans l'endothélium, le myocarde, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les plaquettes <sup>44-46</sup>. Elle est cytosolique, inducible et calcium-indépendante. Il y a stimulation de son expression lors de conditions physiopathologiques telles que l'infarctus du myocarde, l'ischémie cérébrale, l'inflammation, le cancer et le choc septique <sup>47-51</sup>. La NOS inducible ne nécessite pas d'élévation de la concentration intracellulaire de calcium pour être activée. Ceci semble être dû au fait que la iNOS est en mesure, contrairement aux deux autres NOS, de fortement lier la calmoduline même lorsque la concentration de calcium demeure à un niveau basal <sup>52</sup>. Cette liaison de la calmoduline à un niveau basal de calcium intracellulaire pourrait être la raison principale pour laquelle la iNOS peut produire du NO pendant des périodes allant jusqu'à 5 jours comparativement à quelques minutes de production pour les NOS constitutives <sup>53</sup>. La iNOS, comme les deux autres NOS, nécessite la présence de BH<sub>4</sub> et de NADPH pour fonctionner <sup>54</sup>.

Les gènes humains codant pour les NOS sont situés sur les chromosomes 7, 12 et 17 pour la eNOS, la nNOS et la iNOS, respectivement <sup>55;56</sup>. La NOS est inhibée de façon compétitive par les analogues de la L-arginine tels que le N<sup>G</sup>-monométhyl-L-

arginine et la N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine <sup>57</sup>. Le NO est un gaz hautement diffusible possédant une demie-vie de 3 à 5 secondes <sup>58</sup>. Il entre dans les cellules musculaires lisses où il active la guanylate cyclase soluble augmentant ainsi les concentrations de 3'5'-guanoside monophosphate cyclique (GMPc) <sup>59</sup>. L'élévation des concentrations cytoplasmiques de GMPc active une protéine kinase G (PKG), ce qui engendre une relaxation. Cette dernière découle directement de trois actions de la PKG. En premier lieu, elle active la phosphatase de la chaîne légère de la myosine inhibant ainsi l'appareil contractile de la cellule musculaire lisse <sup>60</sup>. La PKG peut aussi phosphoryler et ainsi inhiber les canaux calciques favorisant ainsi une diminution de la concentration intracellulaire de calcium <sup>61;62</sup>. Enfin, la PKG phosphoryle aussi les canaux potassiques, ce qui a pour effet d'augmenter leur activité qui favorise l'hyperpolarisation et entraîne ultimement la fermeture des canaux calciques et donc une baisse de la concentration intracellulaire de calcium <sup>63</sup>. Il a aussi été démontré que le NO pouvait activer directement les canaux potassiques musculaires lisses sans passer par la voie du GMPc <sup>64</sup>.

En plus de ces effets sur le tonus vasculaire, le NO a aussi des effets anti-thrombogéniques. En effet, en plus de diffuser vers le muscle lisse, le NO est aussi sécrété dans la lumière des vaisseaux sanguins où, avant d'être dégradé par l'oxyhémoglobine, il peut demeurer actif à proximité de l'endothélium en inhibant l'adhésion des leukocytes aux cellules endothéliales <sup>65</sup>. Une partie de cet effet implique probablement une régulation négative NO-dépendante de l'expression des molécules d'adhésion endothéliales, des molécules-1 d'adhésion intercellulaires (ICAM-1) et des molécules-1 d'adhésion vasculaires (VCAM-1) <sup>66;67</sup>. Le NO est aussi un puissant inhibiteur de l'aggrégation plaquettaire et il peut agir en synergie avec la PGI<sub>2</sub> pour inhiber l'activation des plaquettes et pour exercer des effets fibrinolytiques <sup>68</sup>. Il semblerait que le NO puisse aussi agir directement sur l'environnement composant la paroi vasculaire en limitant la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses <sup>69</sup>, ainsi qu'en diminuant leur production de molécules matricielles <sup>70</sup>.

La régulation de la production de NO a été le sujet de nombreuses études. Perçue au début comme une enzyme exclusivement constitutivement active, il a été démontré



depuis que l'activité de la eNOS peut être régulée par de nombreux stimuli. Les activateurs physiologiques les mieux connus de cette enzyme sont les forces de cisaillement et l'étirement circonférentiel cyclique <sup>71</sup>. Il a aussi été démontré que l'exercice physique stimulait la production de NO chez l'humain <sup>72</sup> et l'expression de la eNOS chez le porc <sup>73</sup>. La eNOS peut aussi être activée par les catécholamines, l'acétylcholine, l'hypoxie, la vasopressine, les oestrogènes, les autacoïdes tels que la bradykinine et l'histamine, les facteurs dérivés des plaquettes tels l'ADP et la sérotonine (5-HT) ainsi que des facteurs formés lors de la coagulation du sang tels que la thrombine <sup>65;74-79</sup>.

Le NO n'est pas uniquement anti-thrombogénique et vasodilatateur. Il a aussi d'autres rôles physiologiques. Il peut agir en tant que neurotransmetteur et participer aux mécanismes impliqués dans la mémoire <sup>80</sup>. Il est aussi cytotoxique et possède des activités antimicrobienne <sup>81</sup>, antitumorale <sup>82</sup> et immunosuppressive <sup>83</sup>. La plupart de ces activités, à l'exception de la mémoire, sont attribuables aux dérivés du NO formés, entre autres, par les réactions de ce dernier avec l'oxygène <sup>84</sup>. Au niveau de la mémoire, le NO semble agir sur la plasticité neuronale en augmentant les niveaux cérébraux de GMPc <sup>80;85</sup>.

### **1.1.2.3-Vasodilatation indépendante du NO et de la PGI<sub>2</sub>**

Il est rapidement devenu évident, suite à la découverte de la PGI<sub>2</sub> et du NO, qu'un autre facteur vasorelaxant dérivé de l'endothélium pouvait agir sur le muscle lisse. En effet, des observations ont permis de démontrer que les agonistes cholinergiques pouvaient provoquer l'hyperpolarisation de certaines cellules musculaires lisses artérielles <sup>86</sup>. Ce n'est qu'en 1984 que la dépendance endothéliale de cette hyperpolarisation a été observée <sup>87;88</sup>. Vint ensuite la démonstration de la sécrétion endothéliale d'EDHF ('*endothelial-derived hyperpolarizing factor*'), un médiateur diffusible causant l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses <sup>89</sup>. Étant donné la capacité qu'a le NO et probablement la PGI<sub>2</sub> de causer l'hyperpolarisation de certaines cellules musculaires lisses <sup>63;64</sup>, la question évidente qui fut soulevée était de savoir si l'EDHF était réellement un facteur différent du NO et de la PGI<sub>2</sub>.

Il a été observé que la synthèse de NO ne pouvait pas toujours être totalement inhibée en utilisant un inhibiteur de la NOS <sup>90</sup>. Les expériences de Cohen et collaborateurs ont démontré, premièrement, que la sécrétion de NO par l'acétylcholine n'est que partiellement bloquée par les inhibiteurs de la NOS et, deuxièmement, que la sécrétion de NO, plutôt que celle d'un autre facteur, est entièrement responsable des vasodilatations de l'artère carotide de lapin. De plus, les isoformes 3A, 2E et 1A du cytochromes P450 semblent être en mesure de générer du NO à partir de la L-arginine et pourraient contribuer à la synthèse de NO dépendante des cytokines par les hépatocytes <sup>91;92</sup>. Ainsi, cette synthèse de NO indépendante de la eNOS alimente la controverse quant à la possibilité d'avoir des EDHF différents du NO synthétisés par les cytochromes P450. Il a aussi été démontré que le NO pouvait être stocké dans les cellules endothéliales en de petites quantités sous forme de réserves résistantes aux inhibiteurs de la eNOS <sup>42</sup>.

Toutes ces observations mettent en doute l'existence d'un facteur vasodilatateur différent du NO ou de la PGI<sub>2</sub>. Pourtant, dans la plupart des lits artériels, le NO, à l'opposé de l'acétylcholine et de la bradykinine, ne cause pas d'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses <sup>93</sup>. Les libérations de NO et d'EDHF sont toutes deux calcium-dépendantes mais les antagonistes de la calmoduline préviennent plus efficacement les réponses EDHF-dépendantes que NO-dépendantes <sup>94;95</sup>. D'autres observations permettant la mise en évidence des différences entre le NO et EDHF démontrent que la production d'anions superoxydes, qui piègent efficacement le NO <sup>96;97</sup>, n'affecte pas les relaxations attribuables à EDHF <sup>98;99</sup>. D'autres études ont aussi démontré la présence de réponses vasodilatatrices EDHF-dépendantes chez des souris transgéniques ne possédant pas de gène codant pour la eNOS <sup>100;101</sup>. Ainsi, la possibilité que le NO et EDHF ne fasse qu'un est très minime. De plus, il a été démontré que la production de NO exerce un effet négatif sur la libération d'EDHF et que l'inhibition ou l'absence d'activité de la NOS favorise l'apparition et augmente l'amplitude des relaxations dépendantes de l'endothélium attribuables à EDHF <sup>101-103</sup>.

Les mêmes conclusions peuvent être appliquées lorsqu'on compare EDHF et la PGI<sub>2</sub>. En effet même si la PGI<sub>2</sub> peut hyperpolariser les cellules musculaires lisses par l'augmentation d'AMPc, un effet obtenu par l'ouverture des canaux potassiques dépendants de l'ATP, les relaxations dépendantes d'EDHF impliquent plutôt l'activation des canaux potassiques calcium-dépendants<sup>104</sup>. De plus, les inhibiteurs des cyclooxygénases bloquent les réponses dépendantes de la PGI<sub>2</sub> sans affecter les réponses dépendantes d'EDHF.

## **1.2- Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF)**

Les vasodilatations indépendantes du NO et de la PGI<sub>2</sub> sont plus marquées au niveau des petites artères. En effet, il a été observé que les relaxations dépendantes d'EDHF sont plus importantes au niveau des artères de résistance plutôt qu'au niveau des artères de conductance<sup>105</sup>. De nombreuses études ont pu observer des relaxations dépendantes d'EDHF chez un grand nombre d'espèces animales et au niveau de plusieurs lits vasculaires. Chez l'humain, des réponses dépendantes d'EDHF ont été observées au niveau des artères coronaires<sup>106-112</sup>, de l'artère mammaire interne<sup>107;113</sup>, de l'artère radiale<sup>107;114</sup>, de l'artère rénale<sup>115;116</sup>, des artères cérébrales<sup>117-119</sup> et des artères de résistances de divers lits vasculaires<sup>120-126</sup>.

### **1.2.1- Mécanisme d'action d'EDHF**

Par définition, le facteur EDHF est une substance libérée par l'endothélium qui provoque l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses sous-jacentes. Invariablement, les agonistes qui suscitent des relaxations de type EDHF causent un déplacement rapide du potentiel membranaire des cellules endothéliales vers le potentiel d'inversion du potassium ( -80 mV) suivi d'une stabilisation de 10 à 20 mV sous le potentiel de base ou d'un retour graduel vers ce dernier<sup>127;128</sup>. L'ouverture des canaux potassiques activés par le calcium (K<sub>Ca</sub>) endothéliaux est responsable de la réponse hyperpolarisante comme cela a été démontré par trois évidences soit : i) une sortie d'ions Rb<sup>+</sup> par les cellules endothéliales chargées avec cet ion<sup>129</sup>, ii) une relation inverse entre l'amplitude des changements de potentiel

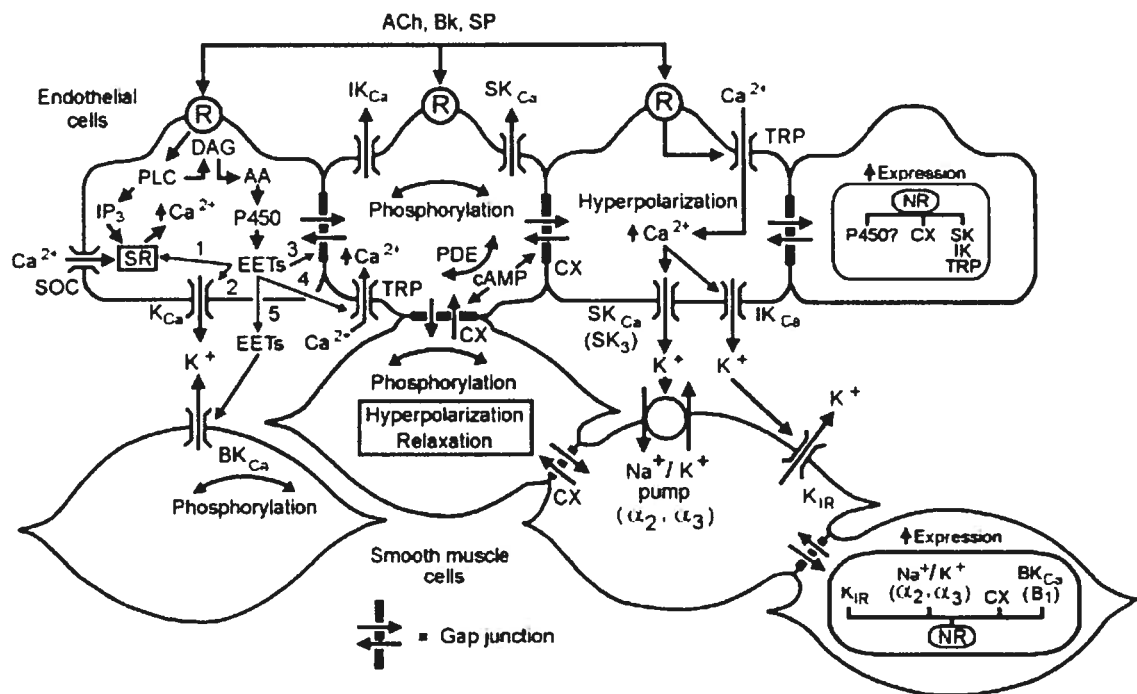
membranaire endothélial induits par des agonistes et la concentration extracellulaire d'ions potassiques ( $[K^+]_o$ ), de façon à transformer l'hyperpolarisation en dépolarisation à des  $[K^+]_o$  supérieures à 25-50 mM<sup>127</sup> et iii) une hyperpolarisation atténuée en présence de toxines peptidiques telles que l'apamine, un inhibiteur sélectif des canaux potassiques activés par le calcium à petite conductance ( $SK_{Ca}$ ), la charybdotoxine, un inhibiteur des canaux potassiques activés par le calcium à conductance intermédiaire ( $IK_{Ca}$ ) et à grande ( $BK_{Ca}$ ) conductance ainsi que de certains canaux potassiques voltage-dépendants ( $K_V$ ) et l'ibériotoxine, un inhibiteur sélectif des canaux potassiques activés par le calcium à grande conductance ( $BK_{Ca}$ )<sup>130;131</sup>. Le mécanisme endothélial qui permet l'activation des canaux potassiques est très méconnu. Comme pour le NO, l'EDHF pourrait être libéré suite à l'activation d'une protéine G. En fait, alors que le NO serait sécrété suite à l'activation de la sous-unité  $\beta\gamma$  d'une protéine G, l'EDHF serait plutôt dépendant de la sous-unité  $\alpha$ <sup>132</sup>. Les cibles potentielles de cette sous-unité  $\alpha$  sont incertaines. En effet, il pourrait s'agir de canaux potassiques, de canaux cationiques ou encore de récepteurs présents sur le réticulum endoplasmique.

Il a été démontré que le nickel, un inhibiteur des canaux cationiques non sélectifs, pouvait bloquer la réponse vasodilatatrice à la bradykinine indépendante du NO et de la  $PGI_2$ <sup>133</sup>. Les cellules endothéliales expriment un tel canal cationique non sélectif perméable au calcium qui est inhibé par la protéine kinase G<sup>134</sup>. Ainsi, il semblerait que la réponse vasodilatatrice dépendante d'EDHF produite par la bradykinine soit due à une inhibition de la protéine kinase G, ce qui augmenterait le calcium intracellulaire endothélial en levant l'inhibition sur les canaux cationiques sensibles au nickel<sup>133;134</sup>. Ce mécanisme pourrait aussi expliquer l'effet négatif qu'a la production de NO sur la libération d'EDHF. En effet, l'activation de la protéine kinase G par le NO favorise l'inhibition de ces canaux cationiques et limite ce type d'augmentation intracellulaire de calcium. Les cellules endothéliales sont dépourvues de canaux calciques activés par le voltage. Une hyperpolarisation permet donc l'élévation de la concentration de calcium intracellulaire ( $[Ca^{2+}]_i$ ) en augmentant le gradient électrochimique qui permet l'influx de calcium dans la cellule<sup>135</sup>.

En plus de la possible implication des canaux cationiques non sélectifs, un autre type de canal perméable au calcium pourrait être responsable de l'activation des  $K_{Ca}$ . Des études récentes semblent démontrer que ce canal calcique dépendant des réserves cellulaires est un canal nommé récepteur à potentiel transitoire (TRP) ("*transient receptor potential*")<sup>136</sup>. Les canaux TRP peuvent, dans certains cas, être activés par une stimulation de récepteurs couplés à une protéine  $G_q$  ainsi que par des récepteurs couplés à la tyrosine kinase<sup>137;138</sup>. L'ouverture de ces canaux est directement reliée à l'épuisement des réserves calciques du réticulum endoplasmique et elle permet une entrée capacitive de calcium dans l'endothélium<sup>139;140</sup>. Ainsi, lorsque les réserves calciques du réticulum endoplasmique diminuent, ces canaux sont activés permettant l'ouverture des  $K_{Ca}$  par le biais de l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$ . L'épuisement des réserves calciques du réticulum endoplasmique induit par des agonistes est en général relié à l'activation de la phospholipase C et la formation subséquente d' $IP_3$  qui stimule la libération de calcium par le réticulum<sup>141</sup>. Pourtant, d'autres mécanismes sont certainement impliqués puisque des études ont démontré que même en absence de récepteur  $IP_3$  dans les lymphocytes B, il était impossible de bloquer l'entrée capacitive de calcium<sup>142</sup>. L'ouverture des TRP ou d'autres types de canaux calciques dépendants des réserves cellulaires est obtenue soit grâce à un couplage mécanique direct avec les récepteurs  $IP_3$  ou par le calcium agissant comme un facteur activateur cytosolique et diffusible<sup>143;144</sup>. L'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  ne semble pas être l'acteur majeur responsable de l'activation d'une "synthétase" d'EDHF dépendante du calcium. En effet, au niveau des artères cérébrales moyennes de rat, l'agoniste direct des  $IK_{Ca}$ , le 1-EBIO, dont l'action est indépendante de la phospholipase C, suscite des relaxations de type EDHF sans élever la  $[Ca^{2+}]_i$  endothéliale au-dessus des niveaux basaux<sup>145;146</sup>.

### 1.2.2-Facteurs EDHF

Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium semble en fait être plusieurs facteurs plutôt qu'un seul (Figure 2). Sa nature, bien que différente du NO et de la  $PGI_2$  tel qu'expliqué précédemment, dépend du type d'artère et de l'espèce étudiés. Plusieurs candidats ont été proposés et étudiés lors des vingt dernières années



(Félétou et al., 2004)<sup>152</sup>

**Figure 2. Facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHFs)**

Les réponses générées par l'EDHF sont initiées par une augmentation de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  résultant d'une entrée de calcium par les canaux cationiques non-sélectifs ainsi que d'une libération de  $Ca^{2+}$  par le réticulum sarcoplasmique. L'activation des canaux potassiques dépendants du calcium qui s'en suit provoque l'hyperpolarisation des cellules endothéliales. Cette hyperpolarisation peut ensuite être transmise au muscle lisse adjacent par les jonctions Gap myoendothéliales ou par un efflux de  $K^+$  originant des canaux  $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$  endothéliaux qui peut hyperpolariser les myocytes adjacents en activant les canaux  $K_{IR}$  et la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase. Au niveau de certains vaisseaux sanguins, comme les grosses artères coronaires, l'activation du cytochrome P450 endothélial et la formation résultante d'EETs pourraient être une étape requise dans la régulation de la  $[Ca^{2+}]_i$  (1) et (4), l'activation des canaux  $K_{Ca}$  (2), ou la communication par les jonctions Gap (3). Enfin, la libération d'EETs peut activer les canaux  $BK_{Ca}$  au niveau des cellules musculaires lisses (5).

(Figure 1). En effet, au niveau de l'artère mammaire humaine, l'EDHF serait l'acide 11,12-époxyéicosatriénoïque <sup>113</sup>. Le peptide natriurétique de type C a aussi été proposé comme EDHF au niveau des artères mésentériques du rat selon Chauhan, alors qu'Edwards a quant à lui identifié les ions  $K^+$  comme EDHF dans ces artères <sup>130;147</sup>. Le groupe de Busse a démontré la présence d'un EDHF formé par le cytochrome P450 2C au niveau des artères coronaires du porc <sup>148</sup>. D'autres ont proposé un endocannabinoïde soit l'anandamide comme étant un EDHF au niveau des artères mésentériques du rat <sup>149</sup>. Chez la souris au niveau des artères mésentériques, l'EDHF serait le peroxyde d'hydrogène selon le groupe de Nakashima <sup>150</sup>. Enfin, Sandow a proposé un EDHF au niveau des artères

mésentériques du rat qui ne serait en fait pas un facteur diffusible mais plutôt un transfert électrique de l'hyperpolarisation endothéliale vers les cellules musculaires lisses par le biais des jonctions gap myoendothéliales <sup>151</sup>. EDHF demeure donc un terme qui regroupe plusieurs facteurs hyperpolarisants potentiels (Figure 2).

### 1.2.2.1-Endocannabinoïdes

L'anandamide et le 2-arachidonoylglycérol sont des endocannabinoïdes qui ont été suggérés comme EDHF possibles <sup>149</sup>. Ces deux substances sont synthétisées à partir de phospholipides membranaires contenant de l'acide arachidonique par l'action de la transacyclase. En 1995, Ellis et collaborateurs démontraient que l'anandamide causait une vasodilatation cérébrale chez le rat en libérant des prostanoides <sup>153</sup>. L'année suivante, il fut démontré par Randall que l'anandamide était un vasodilatateur au niveau des artères mésentériques du rat mais que les produits de la cyclooxygénase n'étaient pas impliqués dans la réponse <sup>149</sup>. Depuis cette étude, de nombreux mécanismes ont été proposés pour expliquer les actions vasculaires de l'anandamide. Ceux-ci incluent une libération de NO <sup>154</sup>, une activation de canaux potassiques <sup>149;155</sup>, une conversion en métabolites de l'acide arachidonique <sup>156</sup>, une activation des jonctions gap et d'EDHF <sup>157</sup>, une inhibition des canaux calciques <sup>158</sup>, une implication des prostanoides <sup>159</sup> et une action sur les nerfs sensoriels favorisant la libération, par ces derniers, de neurotransmetteurs tels que le peptide apparenté au gène de la calcitonine qui produit une vasorelaxation <sup>160</sup>.

Pourtant, pratiquement toutes ces démonstrations et études ont été subséquemment réfutées par d'autres groupes <sup>161;162</sup>. Les principaux points contentieux sont l'implication de l'endothélium et le rôle des récepteurs aux cannabinoïdes. Beaucoup de critiques ont été soulevées quant à la sélectivité de l'antagoniste des récepteurs aux cannabinoïdes CB<sub>1</sub>, le SR141716A. En 1999, il a été proposé que l'anandamide agissait en partie en se liant à un récepteur, différent de CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub>, présent sur l'endothélium au niveau des artères mésentériques du rat <sup>163</sup>. Ce récepteur, responsable de la vasorelaxation à l'anandamide, semble être couplé à l'activation de la MAP kinase et des IK<sub>Ca</sub> et BK<sub>Ca</sub> par l'entremise d'une protéine G. Il a été démontré par Kunos et ses collègues qu'un analogue des cannabidiols, le O-

1918, antagonise ce récepteur endothélial sans affecter CB<sub>1</sub> ou CB<sub>2</sub> <sup>164</sup>. Cet antagoniste s'avère être un outil potentiellement très utile pour l'étude de ce récepteur endothélial à l'anandamide mais bien qu'il semble être assez sélectif pour son récepteur, d'autres études devront être faites afin de démontrer son absence d'effets sur d'autres sites tels que les canaux potassiques. Malgré cela, sans être directement un EDHF, l'anandamide pourrait donc, par l'activation de ce récepteur endothélial au niveau des artères, être couplé à une libération d'EDHF <sup>164</sup>.

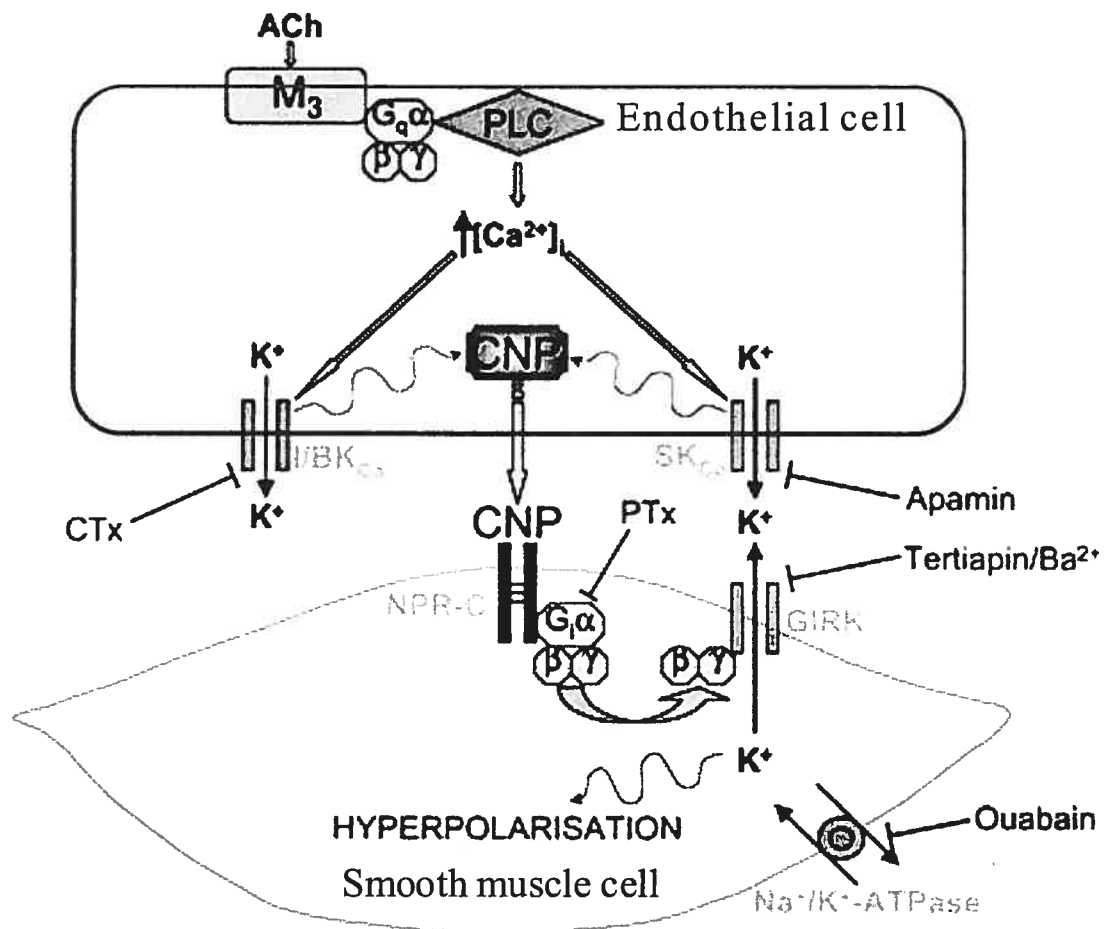
### 1.2.2.2-Peptide C natriurétique

Le peptide C natriurétique (CNP) appartient à une famille de peptides vasoactifs comme le peptide natriurétique auriculaire (ANP), le peptide natriurétique cérébral (BNP) et l'urodilatine. Ces peptides ont des propriétés vasodilatatrices et diurétiques et ils jouent un rôle important dans l'homéostasie cardiovasculaire <sup>165;166</sup>. Le CNP est présent en grandes concentrations dans les cellules endothéliales vasculaires <sup>165</sup>. C'est un puissant relaxant des cellules musculaires lisses, surtout au niveau coronaire <sup>167;168</sup>. Il inhibe aussi la prolifération des cellules vasculaires ainsi que la production d'aldostérone <sup>169-171</sup>. Les effets cardiovasculaires du CNP découlent de l'activation des récepteurs aux peptides natriurétiques (NPR) des sous-types B (NPR-B) et C (NPR-C) <sup>172</sup>. Les NPR-B et NPR-C sont abondamment exprimés au niveau du muscle lisse et il a été démontré que le mécanisme par lequel le CNP induit la vasorelaxation est par le biais d'une hyperpolarisation du muscle lisse dépendante des récepteurs NPR-C <sup>173</sup>. Cette hyperpolarisation est inhibée en présence de tétraéthylammonium <sup>173</sup>.

Le CNP a donc été proposé comme EDHF au niveau des artères mésentériques du rat par Hobbs et ses collaborateurs <sup>147</sup>. Selon ce groupe, l'activation d'une protéine Gq endothéliale active une phospholipase C augmentant ainsi la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. (Figure 3) Ceci a pour effet de stimuler l'ouverture des canaux K<sub>Ca</sub>. Cette ouverture des canaux potassiques et/ou l'augmentation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> provoque la libération de CNP par un mécanisme inconnu. Le CNP libéré se lie à son récepteur sur les cellules musculaires lisses soit le NPR-C et active les canaux potassiques à



rectification entrante ( $K_{ir}$ ) couplés à une protéine  $G_i$ . L'hyperpolarisation du muscle lisse et donc la vasorelaxation sont sensibles à une combinaison d'apamine, un bloqueur des  $SK_{Ca}$ , et de charybdotoxine, un bloqueur des  $IK_{Ca}$  <sup>130</sup>. De plus, une combinaison de  $Ba^{2+}$ , un bloqueur des  $K_{ir}$ , et de ouabaine, un inhibiteur de la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase, bloque aussi l'hyperpolarisation due au CNP. Chauhan a aussi démontré que la vasodilatation dépendante du CNP est sensible à l'acide 18 $\alpha$ -glycyrrhétinique, un bloqueur des jonctions gap, ce qui semble démontrer que ces jonctions sont nécessaires au mécanisme de relaxation peut-être en permettant un transfert direct de l'hyperpolarisation grâce à une stimulation des jonctions gap par le CNP ou par un produit de son activité. Cette étude semble bien démontrer que le CNP peut hyperpolariser le muscle lisse par un mécanisme d'action semblable à celui démontré par d'autres mais l'auteur n'explique pas l'activation de la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase par le CNP. En fait, alors que le CNP semble être un candidat intéressant, d'autres études devront être effectuées avant de pouvoir admettre avec certitude que le CNP est un EDHF.



(Chauhan et al., 2003)<sup>147</sup>

**Figure 3. Hyperpolarisation endothéliale et musculaire lisse dépendante du peptide C natriurétique.** La libération endothéliale de CNP active les récepteurs NPR-C du muscle lisse qui, par le biais d'un couplage à une protéine Gi, mène l'activation d'un canal potassique à rectification entrante (K<sub>ir</sub>) couplé à une protéine G<sub>i</sub> et ainsi à l'hyperpolarisation.

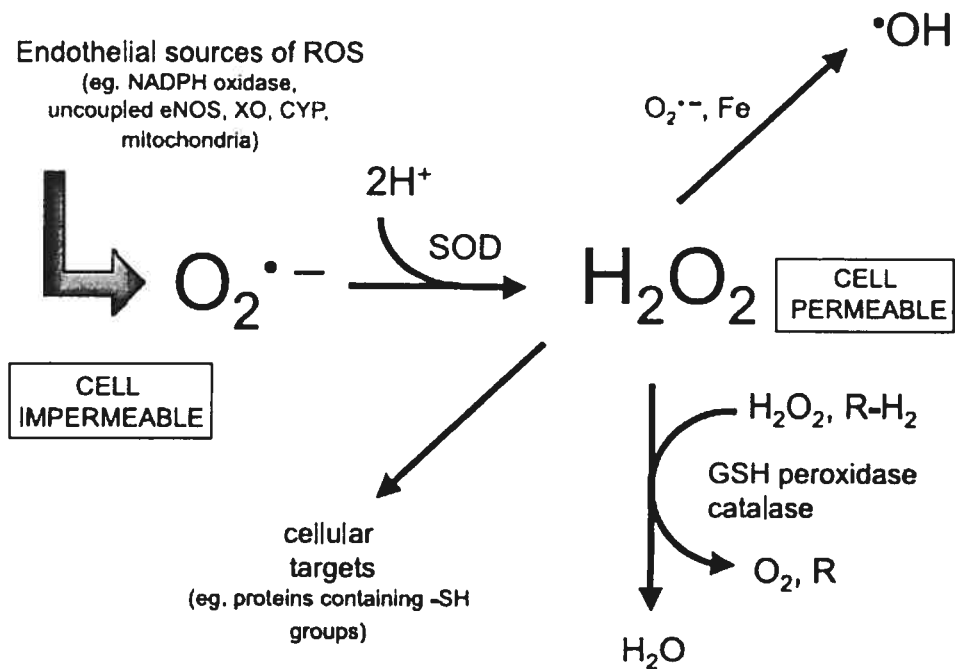
### 1.2.2.3-Péroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Les espèces oxygénées radicalaires (ROS) ont des effets vasoconstricteurs et, lorsque présentes en concentrations élevées, elles ont des effets cellulaires néfastes multiples. Pourtant, la découverte que la superoxyde dismutase et la catalase ont un effet positif sur les relaxations dépendantes de l'endothélium au niveau des artères cérébrales de chat suggèrent une action vasodilatatrice des ROS<sup>174</sup>. Il a été proposé qu'EDHF pouvait être un ROS étant donné que l'endothélium peut générer des quantités importantes de radicaux libres<sup>18;175</sup>. Les principaux ROS retrouvés au

niveau de l'endothélium incluent l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le radical hydroxyl (OH) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

Les sources endothéliales les plus importantes de ROS sont la NADPH oxydase, les enzymes du système du cytochrome P450, les mitochondries et la eNOS (Figure 4). La NADPH oxydase endothéliale peut être activée par l'angiotensine II, les facteurs de croissance libérés par les plaquettes, la thrombine, les glucocorticoïdes, les stimuli dépolarisants et les forces de cisaillement<sup>176-180</sup>. Les isoenzymes endothéliales et musculaires lisses du cytochrome P450 génèrent aussi des ROS lorsqu'elles sont activées mais aucune implication des ROS synthétisés par ces enzymes n'a été démontrée au niveau des relaxations dépendantes de l'endothélium<sup>181-183</sup>. Les mitochondries représentent une source physiologique importante de ROS et elles possèdent une peroxydase et une superoxyde dismutase toutes deux membranaires qui permettent le traitement local des ROS synthétisés<sup>184-187</sup>. Malgré cela, de grandes quantités de  $H_2O_2$  sont formées par les mitochondries<sup>188</sup>. Aucune étude n'a permis à ce jour de mettre en évidence une production concomitante de peroxyde d'hydrogène par les mitochondries endothéliales en réponse à un stimulus physiologique.

La eNOS peut être découplée lorsque deux éléments essentiels à son fonctionnement normal sont absents ou rares soit le cofacteur tétrahydrobioptérine et le substrat lui-même, la L-arginine<sup>190;191</sup>. Cette forme de la eNOS, dans laquelle la réduction de l'oxygène n'est plus couplée à l'oxydation de la L-arginine, génère des ROS<sup>192</sup>. Ainsi, la eNOS produit probablement peu de ROS chez un sujet sain alors qu'en condition pathologique, il est possible qu'elle en génère une quantité importante. Le peroxyde d'hydrogène endogène semble contribuer aux vasodilatations dépendantes de l'endothélium<sup>96;110;150;193;194</sup>. Le  $H_2O_2$  hyperpolarise le muscle lisse en activant les canaux potassiques par l'oxydation des groupements sulfhydryl qui les composent<sup>195;196</sup>. Les canaux principalement affectés semblent être les canaux  $BK_{Ca}$  dans la plupart des lits vasculaires<sup>193</sup> mais les canaux sensibles à l'ATP semblent aussi être ciblés par le  $H_2O_2$  au niveau de certaines artères<sup>197;198</sup> (Figure 5). Le  $H_2O_2$  a aussi des actions relaxantes indirectes en stimu-



(Ellis et al., 2003)<sup>189</sup>

**Figure 4. Formation et dégradation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).**

Les anions superoxydes (ROS) générés par les enzymes endothéliales (la nicotinamide adénine dinucléotide (NADPH) oxydase, la xanthine oxydoréductase (XO), la monoxyde d'azote synthétase découplée (eNOS), le cytochrome P450 (CYP), ou la chaîne mitochondriale de transport d'électrons) vont demeurer à l'endroit de leur formation puisque la charge qu'ils transportent limitent leur passage à travers les membranes cellulaires. Le superoxyde, formé spontanément ou par l'action de la superoxyde dismutase (SOD), est réduit au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui ne transporte pas de charge supplémentaire et peut donc traverser les membranes. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut soit traverser les membranes et agir sur des cellules cibles adjacentes, soit participer à des réactions de type Fenton ou Haber-Weiss avec les métaux (ex. Fe) et/ou avec le superoxyde pour former des radicaux hydroxyls (•OH). La présence de catalase ou de glutathione (GSH) peroxydase inactive le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le métabolise en eau.

lant la production d'acide arachidonique par un mécanisme dépendant de la protéine kinase C<sup>199;200</sup>. Il stimule aussi la formation de GMPc et d'AMPc par des mécanismes dépendants d'une libération de NO<sup>201;202</sup> et d'un récepteur à tyrosine kinase<sup>203</sup>, respectivement (Figure 5). L'augmentation de la quantité d'acide arachidonique induit une vasodilatation en activant les canaux BK<sub>Ca</sub> musculaires

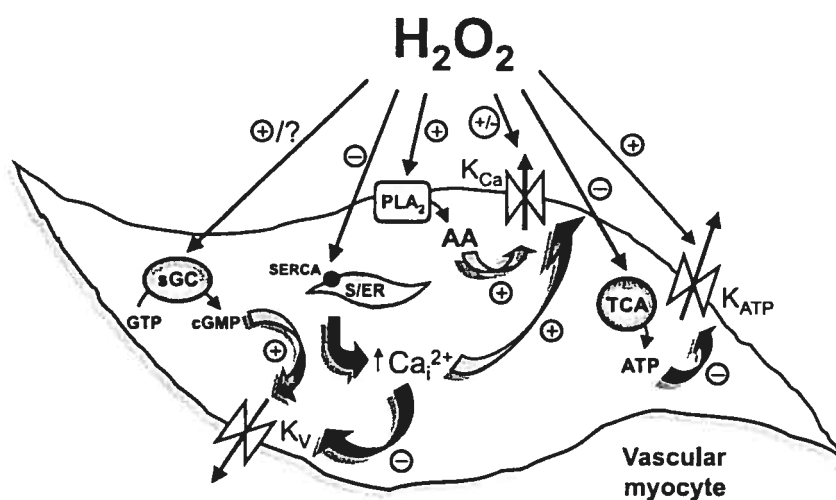
lisses <sup>204</sup>. De plus, les niveaux plus élevés de substrat pour la cyclooxygénase permettent une augmentation de la formation de PGI<sub>2</sub>, une substance reconnue pour son action vasodilatatrice. En effet, les relaxations induites par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> semblent être bloquées par des inhibiteurs de la cyclooxygénase dans certaines études <sup>205;206</sup>. Enfin, le GMPc et l'AMPc peuvent tous deux stimuler des canaux potassiques et donc hyperpolariser les cellules musculaires lisses. Le GMPc peut aussi favoriser la déphosphorylation de la myosine à chaîne légère créant ainsi une vasorelaxation, un effet obtenu avec le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <sup>207</sup>.

Ainsi, plusieurs arguments semblent démontrer que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pourrait être un EDHF soient : i) les cellules endothéliales produisent du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ii) le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relaxe et hyperpolarise le muscle lisse, iii) les canaux BK<sub>Ca</sub> sont impliqués dans les réponses à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, iv) les forces de cisaillement peuvent, dans certains cas, induire la production endothéliale de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, v) le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est une substance qui peut diffuser passivement au-travers des membranes cellulaires et vi) les synthèses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'EDHF sont inhibées par le NO. Pourtant, beaucoup d'évidences semblent réfuter la possibilité du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> d'être un EDHF soient : i) les relaxations dépendantes d'EDHF ne sont pas toujours inhibées par la catalase <sup>208;209</sup>, ii) la cinétique de l'hyperpolarisation due au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est différente de celle induite par EDHF <sup>196</sup>, iii) EDHF a une sensibilité différente aux inhibiteurs sélectifs des canaux potassiques <sup>210</sup>, iv) des excès de superoxyde dismutase n'élèvent pas nécessairement l'amplitude de la vasodilatation en augmentant la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <sup>211</sup> et, v) le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> affecte l'homéostasie du calcium et les mécanismes contractiles cellulaires <sup>207;212-214</sup>. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut donc être un EDHF chez certaines espèces mais il semble évident que la plupart des relaxations induites par EDHF diffèrent de celles induites par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### **1.2.2.4- Jonctions Gap myoendothéliales**

De nombreuses études utilisant des préparations de type "sandwich", construites à l'aide de tranches d'artères avec et sans endothélium posées l'une contre l'autre dans lesquelles l'endothélium et le muscle lisse sont électriquement découplés, ont

révélées une absence de relaxation de type EDHF en réponse à des agonistes tel que l'acétylcholine<sup>215-219</sup>. Ces résultats ont illustré la possibilité que le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium n'était peut-être pas un facteur diffusible mais plutôt un processus qui impliquerait un passage électronique passif de l'hyperpolarisation endothéliale vers le muscle lisse à travers les jonctions gap myoendothéliales. Au niveau du muscle lisse, la relaxation serait ensuite obtenue de la manière typique à tout EDHF, la fermeture des canaux calciques dépendants du voltage.



(Ellis et al., 2003)<sup>189</sup>

Figure 5. Action du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) sur les cellules musculaires lisses. Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) peut affecter l'activité des canaux potassiques des cellules musculaires lisses en activant les canaux potassiques activés par le calcium ( $K_{Ca}$ ) et ceux sensibles à l'ATP ( $K_{ATP}$ ) et en inhibant les canaux potassiques dépendant du voltage ( $K_V$ ). Le  $H_2O_2$  favorise la production d'acide arachidonique (AA) qui peut directement ouvrir les canaux  $K_{Ca}$ . L'inhibition de la pompe ATPase (SERCA) du réticulum endoplasmique élève la concentration de calcium cytosolique ( $Ca_i^{2+}$ ), ce qui ouvre les canaux  $K_{Ca}$  et ferme les canaux  $K_V$ . L'inhibition des enzymes impliquées dans la phosphorylation oxydative (TCA) diminue les concentrations intracellulaires d'ATP et augmente donc l'activité des canaux  $K_{ATP}$ . La stimulation de la guanylate cyclase soluble (sGC) augmente la production de GMPc, ce qui provoque la dilatation en activant les kinases dépendantes du GMPc et les canaux potassiques.

Les jonctions gap sont formées de deux canaux, appelés connexons, ancrés l'un à l'autre de cellule à cellule. Chaque canal est composé de 6 sous-unités protéiques, les connexines (Cx), qui traversent la membrane 4 fois tout en exposant deux domaines peptidiques du côté extracellulaire <sup>220</sup>. L'interaction des domaines extracellulaires de connexons voisins forment un pore central aqueux permettant la diffusion intercellulaire d'ions et de molécules de diverses cascades cellulaires de taille inférieure à 1 kDa et conférant donc une continuité électrique à basse résistance aux deux cellules couplées <sup>221</sup>. Les jonctions gap individuelles peuvent s'associer en plaques, composées de centaines de jonctions membranaires, observables par microscopie électronique <sup>151</sup>. Les principales sous-unités des connexines retrouvées dans le système vasculaire sont la Cx 37, la Cx 40, la Cx 43 et la Cx 45.

Il a été démontré que le nombre de jonctions gap myoendothéliales augmente avec la diminution de la taille de l'artère étudiée <sup>151</sup>, une observation qui s'accorde avec la présence accrue de relaxation dépendante d'EDHF dans les vaisseaux de petites tailles <sup>105;222</sup>. De nombreuses études semblent démontrer que les vasodilatations dépendantes d'EDHF sont sensibles aux bloqueurs des jonctions gap myoendothéliales. En effet, dans les artérioles de la muqueuse du petit intestin de cochon d'Inde, l'acétylcholine induit des courants potassiques sortant au niveau endothélial qui sont bloqués par la combinaison d'apamine et de charybdotoxine. Suivant l'administration d'un bloqueur des jonctions gap, l'acétylcholine induit encore des courants potassiques sortant au niveau endothélial mais ce n'est plus le cas au niveau des cellules musculaires lisses. Ceci suggère que les deux types cellulaires sont reliés électriquement et qu'ils forment un syncytium fonctionnel <sup>223-225</sup>. D'autres observations ont permis de démontrer que le couplage électrique direct des cellules endothéliales et musculaires lisses joue un rôle central dans les réponses vasculaires dépendantes d'EDHF. En effet, les peptides mimétiques des Cx, considérés actuellement comme les meilleurs inhibiteurs des jonctions gap, diminuent les hyperpolarisations et relaxations du muscle lisse induites par l'acétylcholine, la substance P, l'ATP et la bradykinine au niveau des grosses artères de lapin, de rat et de porc <sup>157;217;226-232</sup>.

Une des principales critiques voulant réfuter la possibilité qu'EDHF soit un transfert électrique de l'hyperpolarisation de l'endothélium vers le muscle lisse est basée sur la faible probabilité que cette hyperpolarisation endothéliale non régénérative transférée vers le muscle lisse puisse provoquer l'hyperpolarisation et la relaxation de toutes les cellules musculaires lisses sous-jacentes sans être dissipée passivement dans la masse relativement imposante de la média <sup>233</sup>. En réponse à cette critique, il a été démontré que l'hyperpolarisation provenant d'une seule cellule endothéliale pouvait provoquer, par transfert électrique, la relaxation d'un segment artériolaire entier <sup>234;235</sup>. Le transfert électrique de l'hyperpolarisation semble pouvoir être amélioré ou favorisé par des substances capables, en théorie, de traverser les jonctions gap. Il a été démontré que l'AMPC, par exemple, est en mesure d'augmenter le couplage de cellule à cellule par jonctions gap grâce à un mécanisme peu connu impliquant soit une phosphorylation des Cx par la protéine kinase A et/ou le recrutement rapide des Cx à la membrane cellulaire <sup>236-238</sup>. L'acétylcholine peut générer des augmentations endothéliales d'AMPC par un mécanisme indépendant de la formation de prostanoïde, ce qui révèle une voie potentiellement intéressante pour l'étude de la réponse dépendante d'EDHF <sup>239;240</sup>. Il a aussi été proposé que l'AMPC pourrait être transféré vers le muscle lisse par les jonctions gap et provoquer l'hyperpolarisation mais cette possibilité se heurte à deux solides critiques <sup>226</sup>. Premièrement, si l'hyperpolarisation du muscle lisse induite par EDHF était ainsi dépendante de l'action de l'AMPC, on devrait être en mesure de la bloquer en utilisant des inhibiteurs des canaux potassiques ciblés par l'AMPC tels que les canaux sensibles à l'ATP. Or, les relaxations atténuées par les bloqueurs des jonctions gap ne sont pas affectées par les inhibiteurs de ces canaux potassiques. Deuxièmement, si l'AMPC diffusait vers les cellules musculaires lisses par les jonctions gap, il devrait alors être activement synthétisé sans relâche pour compenser sa rapide dilution au niveau des couches cellulaires du muscle lisse. Il est donc plus réaliste d'envisager que l'AMPC est impliqué dans la régulation dynamique de la communication par les jonctions gap plutôt que d'être lui-même un EDHF. Les jonctions gap myoendothéliales semblent donc être en mesure d'agir en tant que transporteur d'un EDHF électrique au niveau de plusieurs types d'artères chez plusieurs espèces. Pourtant, d'autres études seront nécessaires afin de comprendre les mécanismes précis régulant ce transfert et afin d'élucider



l'apparente absence d'implication des jonctions gap myoendothéliales dans d'autres tissus les exprimant.

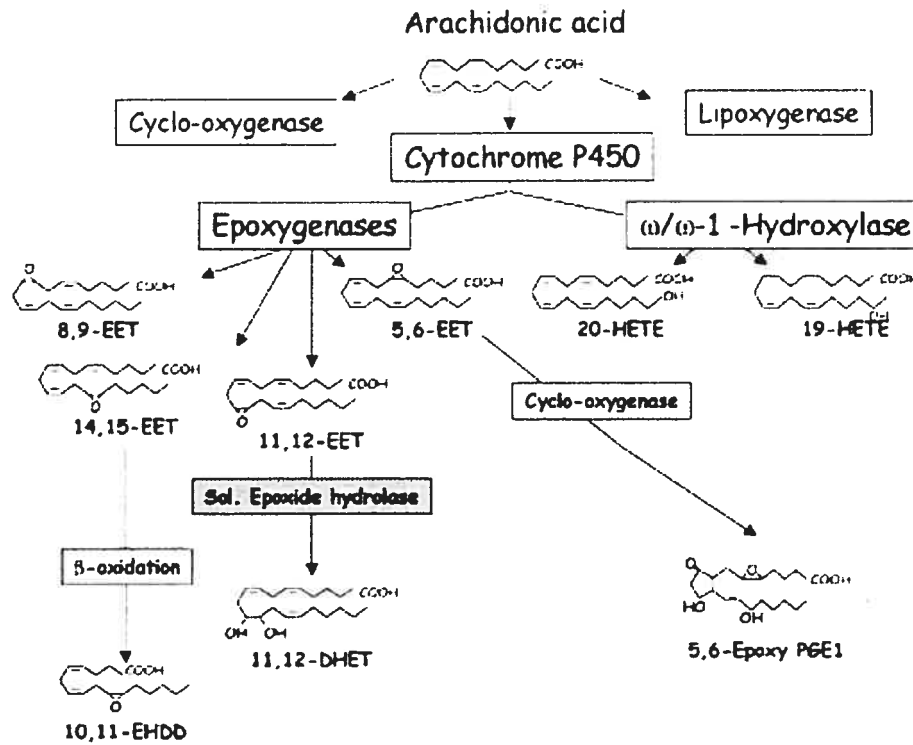
#### 1.2.2.5-Acides époxyéicosatriénoïques (EETs)

L'hypothèse d'une implication des produits dérivés de l'activité des cytochromes P450 (CYP 450) dans la régulation du tonus vasculaire a été émise suite à la démonstration que l'acide arachidonique, lorsqu'appliqué de manière exogène, induisait une relaxation de segments vasculaires isolés. En plus de leur multiples fonctions, les cytochrome P450 sont en mesure de métaboliser l'acide arachidonique en produits biologiquement actifs <sup>241</sup>. Dans plusieurs artères, les réponses dépendantes d'EDHF sont atténuées par des substances qui inhibent la phospholipase A<sub>2</sub>, l'enzyme responsable de la libération de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. Étant donné qu'il est clair que la PGI<sub>2</sub> n'est pas un EDHF, un produit de la lipooxygénase ou du cytochrome P450 devenait alors un candidat possible <sup>242;243</sup>. Les enzymes du cytochrome P450 sont liées à la membrane, possèdent un groupement hème et forment un système multi-enzymatique composé, en plus de l'enzyme CYP 450, d'une NADPH-CYP réductase contenant un FAD/FMN et du cytochrome b<sub>5</sub>. Plus de 400 isoformes différentes de cytochrome P450 ont été découvertes à ce jour. Les deux principaux produits du cytochrome P450 ayant des effets sur le tonus vasculaire sont les époxyéicosatriénoïques (EETs) et les acides hydroxyéicosatriénoïques (HETEs) (Figure 6). Ces derniers, synthétisés par les cytochromes P450 4A, ont des effets vasoconstricteurs <sup>244</sup>.

Les EETs, produits par le cytochrome P450, induisent des relaxations de type EDHF en réponse à l'Ach ou la bradykinine au niveau d'artères rénales <sup>246;247</sup>, d'artères pulmonaires <sup>248</sup>, d'artères coronaires <sup>183;249-252</sup>, d'artères de muscles squelettiques <sup>253</sup>, d'artères carotides <sup>254;255</sup>, d'artères de tissus sous-cutanés <sup>256</sup> et d'artères mésentériques <sup>257;258</sup>. De nombreux isoformes du cytochrome P450 sont en mesure de synthétiser des EETs comme les cytochromes P450 1A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2J et 4A <sup>259-264</sup>. Au niveau endothélial, les principaux cytochromes P450

responsables de la synthèse d'EETs sont les cytochromes 2B, 2C8, 2C9, 2C10, 2C11, 2C23, 2C34, 2J2 et 2J4. Les cytochromes 4A2 et 4A3 endothéliaux, bien que responsable de la formation de 20-HETE, semblent aussi être en mesure de synthétiser des EETs <sup>265</sup>.

L'expression endothéliale des cytochromes P450 2C augmente en réponse à l'étirement pulsatile de la paroi vasculaire et en réponse aux forces de cisaillement <sup>266</sup>. Les récepteurs à l'androstane et à l'acide rétinoïque, des récepteurs nucléaires apparentés à la superfamille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes, sont impliqués dans la régulation de la famille des CYP450 2. Les régions promotrices de plusieurs gènes de CYP450 2C possèdent des éléments de réponse à l'hypoxie qui favorisent l'expression des cytochromes 2C et la formation de EETs <sup>267</sup>. Les régions promotrices des gènes de CYP450 2C8 et 2C9 contiennent aussi des éléments de réponse aux glucocorticoïdes qui sont reconnus et activés par les récepteurs aux glucocorticoïdes humains <sup>268</sup>. Les glucocorticoïdes augmentent l'expression des cytochromes 2C8 et 2C9 et donc la production d'EETs <sup>268</sup>. De nombreuses drogues cardiovasculaires actuellement utilisées et métabolisées, du moins en partie, par les CYP450 2C semblent pouvoir affecter l'expression endothéliale de ces cytochromes. En effet la fluvastatine, un inhibiteur de la HMG-CoA réductase métabolisée par le CYP450 2C9 du foie <sup>269</sup>, semble augmenter l'expression endothéliale de ce cytochrome chez le porc <sup>270</sup>.



(Fleming, 2004)<sup>245</sup>

Figure 6. L'acide arachidonique et ses métabolites. L'acide arachidonique peut être métabolisé en plusieurs composés par l'action de la cyclooxygénase, de la lipoxygénase et des cytochromes P450. Les principaux produits de l'acide arachidonique générés par les cytochromes P450 sont les acides époxyéicosatriénoïques (EETs) et les acides hydroxyéicosatriénoïques (HETEs). Les EETs et le HETEs ont des effets prononcés sur le tonus vasculaire et les EETs ont souvent été proposés comme EDHF potentiels.

Le degré d'activité du cytochrome P450 semble être principalement déterminé par la disponibilité de son substrat, l'acide arachidonique. Étant donné que les inhibiteurs de la phospholipase A<sub>2</sub>, une enzyme dont l'activité est dépendante du calcium, atténuent les réponses vasculaires dépendantes d'EDHF, le mécanisme impliqué dans cette réponse semble donc être basé sur une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium induite par un stimulus. Ceci permet l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub> qui libère ensuite l'acide arachidonique des phospholipides membranaires. L'augmentation du substrat peut ensuite immédiatement activer les enzymes du cytochrome P450, lorsque celles-ci sont exprimées, et ainsi générer des EETs. Un autre mécanisme semble aussi être impliqué dans l'activation des cytochromes P450. En effet, les CYP450 peuvent

être phosphorylés et ceci semble pouvoir avoir un effet direct sur l'activité de l'enzyme <sup>271</sup>, sur sa localisation intracellulaire <sup>272</sup> et sur sa dégradation <sup>273</sup>.

Les niveaux d'EETs dépendent aussi directement des systèmes responsables de leur dégradation telles que la cyclooxygénase (pour le 5,6-EET et le 20-HETE), l'hydrolase époxyde soluble <sup>274</sup> et la  $\beta$ -oxydation <sup>275</sup>. Certains produits de dégradation d'EETs générés par ces enzymes, tels que la 5,6-EET PGE<sub>1</sub> synthétisée par la cyclooxygénase, produisent des effets biologiques qui sont souvent opposés aux effets engendrés par les EETs <sup>276</sup>.

Les EETs proposés comme EDHF sont les 5,6-, 11,12- et 14,15-EETs (Figure 6). Ils peuvent hyperpolariser les cellules musculaires lisses en augmentant la probabilité d'ouverture des canaux BK<sub>Ca</sub> <sup>249;251;277</sup> (Figure 7). Le mécanisme par lequel les EETs activent les canaux BK<sub>Ca</sub> demeure controversé. Des études électrophysiologiques ont démontré que les EETs pouvaient activer ces canaux sans y avoir accès du côté extracellulaire, ce qui suggère une activation indirecte par les EETs <sup>278</sup>. Cette activation pourrait être dépendante de la stimulation d'une protéine G<sub>Sa</sub> qui serait en mesure d'altérer la sensibilité des canaux BK<sub>Ca</sub> au calcium <sup>278;279</sup>. Des études démontrent aussi que les canaux BK<sub>Ca</sub> peuvent être activés par l'AMPc et par la protéine kinase A <sup>280;281</sup> et il a été observé que le 11,12-EET peut stimuler cette dernière <sup>282</sup>. Le fait que les EETs activent les canaux BK<sub>Ca</sub> a souvent servi à réfuter l'hypothèse voulant qu'ils soient des EDHFs. En effet, les réponses vasodilatatrices dépendantes d'EDHF sont en général inhibées par l'apamine et la charybdotoxine plutôt que par l'ibériotoxine, un bloqueur spécifique des canaux BK<sub>Ca</sub>. Il semblerait pourtant que les EETs soient aussi en mesure d'engendrer des réponses de type EDHF qui sont inhibées par l'apamine et la charybdotoxine et non par l'ibériotoxine <sup>132</sup>. Ainsi, il est donc possible que les EETs provoquent l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses par d'autres voies que les canaux BK<sub>Ca</sub>.

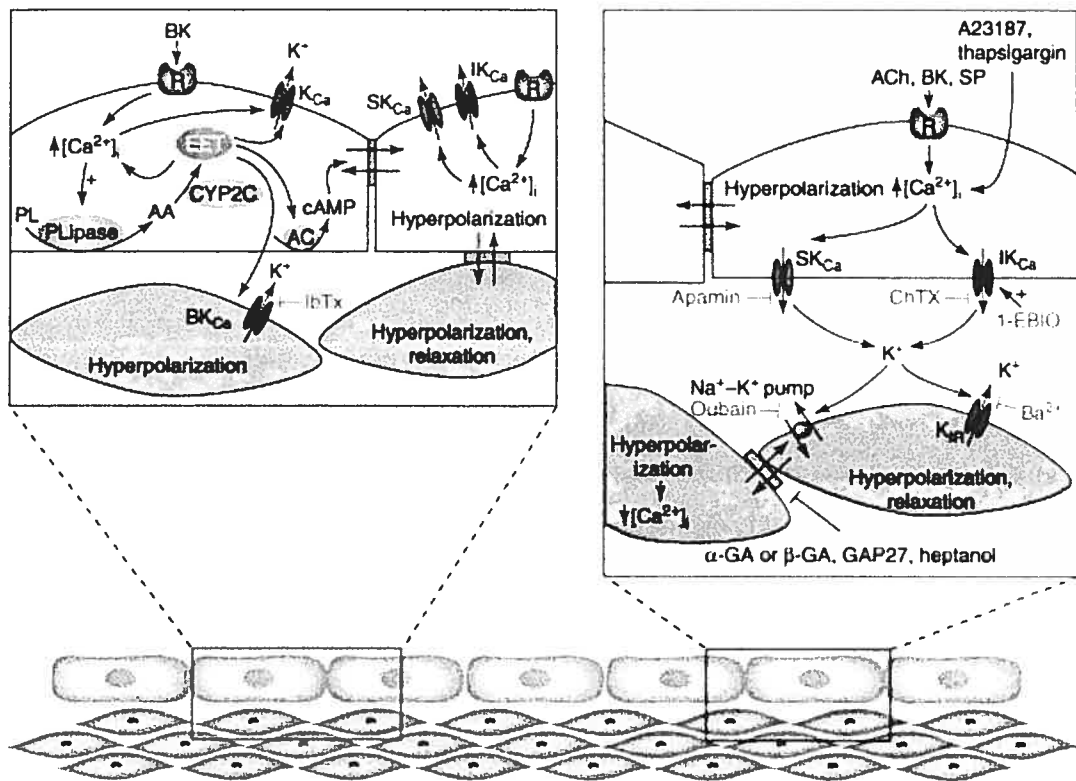
Les EETs semblent aussi jouer un rôle important dans la régulation de la concentration intracellulaire calcique des cellules endothéliales. En effet, les EETs semblent agir directement sur les canaux cationiques non-sélectifs formés de

protéines Trp en augmentant leur probabilité d'ouverture<sup>284</sup> (Figure 2). L'activation de ces canaux augmente l'entrée de calcium dans la cellule endothéliale et cela, couplé à l'activation des canaux SK<sub>Ca</sub> et IK<sub>Ca</sub>, suggère fortement la possibilité que les EETs soient en fait des seconds messagers intracellulaires régulant l'hyperpolarisation endothéliale plutôt que des EDHFs en soit (Figure 7).

En plus d'amplifier l'hyperpolarisation endothéliale, les EETs semblent aussi faciliter le transfert de cette hyperpolarisation des cellules endothéliales vers les cellules musculaires lisses. En effet, au niveau de cellules endothéliales en culture et au niveau du muscle *gracilis* de hamster, les EETs facilitent la communication par les jonctions gap par un mécanisme dépendant de la protéine kinase C<sup>285;286</sup> (Figure 7).

Les EETs peuvent être hydrolysés par l'hydrolase époxyde soluble en acides dihydroxyéicosatriénoïques (DHETs). Ces derniers peuvent être stockés dans les phospholipides tels que la phosphatidylcholine et les phosphatidylinositols<sup>287;288</sup>. Cette incorporation d'EETs dans les réserves endothéliales de phospholipides est catalysée par une acyl coenzyme A synthétase<sup>289</sup>. Ces réserves d'EETs semblent pouvoir être libérées par un mécanisme indépendant de l'activité des cytochromes P450<sup>289</sup>. L'existence de ces réserves relance donc le débat voulant que les EETs soient des EDHF puisque leur libération ne semble pas pouvoir être bloquée par les inhibiteurs conventionnels des CYP450. Ainsi, leur implication dans les hyperpolarisations musculaires lisses reliées à EDHF est donc très compliquée à étudier.

Alors que les EETs semblent pouvoir jouer un rôle dans les vasorelaxations dépendantes d'EDHF, il existe tout de même de nombreuses évidences qui démontrent qu'ils ne sont pas impliqués dans tous les types artériels. En effet, les inhibiteurs des époxygénases du cytochrome P450 n'ont aucun effet sur les réponses dépendantes d'EDHF au niveau des artères mésentériques et hépatiques du rat<sup>290;291</sup>, des artères carotides du cochon d'inde<sup>292</sup> et des artères coronaires de bovin<sup>293</sup>. De plus, au niveau des artères carotides du cochon d'inde, les EETs exogènes n'amplifient pas l'hyperpolarisation des cellules endothéliales, excluant



(Busse et al., 2002)<sup>283</sup>

**Figure 7. EETs et EDHF. Effets directs et indirects par le biais des jonctions gap myoendothéliales et le rôle des ions  $K^+$ .** a) Les EETs peuvent agir comme messagers intracellulaires et extracellulaires. Suite à une stimulation par la bradykinine (BK), la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) augmente et mène à l'activation d'une phospholipase (PLipase) qui libère l'acide arachidonique des phospholipides membranaires (PLs). L'activation subséquente d'une époxygénase du cytochrome P450 (CYP2C) résulte en la production d'EETs qui peuvent ensuite agir sur la sensibilité au  $Ca^{2+}$  des canaux potassiques dépendant du  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ), sur la formation de cAMP par l'adénylate cyclase (AC), ainsi que sur le couplage des jonctions gap entre les cellules endothéliales. Les EETs ou leurs métabolites peuvent aussi diffuser dans le muscle lisse et activer les canaux  $K_{Ca}$  à large conductance ( $BK_{Ca}$ ) sensibles à l'ibérottoxine (IbTX). b) La stimulation des cellules endothéliales par des substances telles que l'Ach, la BK et la substance P (SP) ou par des agonistes augmentant la concentration de  $Ca^{2+}$  tels que l'ionophore A23187 et la thapsigargin entraîne l'hyperpolarisation endothéliale en activant les canaux  $K_{Ca}$  à petite et intermédiaire conductances ( $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$ ) inhibés par l'apamine et la charybdotoxine (ChTX), respectivement. L'hyperpolarisation des cellules endothéliales mène à une accumulation d'ions  $K^+$  dans l'espace sous-endothélial en concentration suffisante pour activer les canaux potassiques à rectification entrante ( $K_{ir}$ ) bloqués par le  $Ba^{2+}$  et la pompe  $Na^+/K^+$  sensible à la ouabaine. L'hyperpolarisation des cellules endothéliales, suivant l'activation des canaux  $K_{Ca}$ , peut être transmise le long de la monocouche des cellules endothéliales ou vers les cellules musculaires lisses par les jonctions gap.

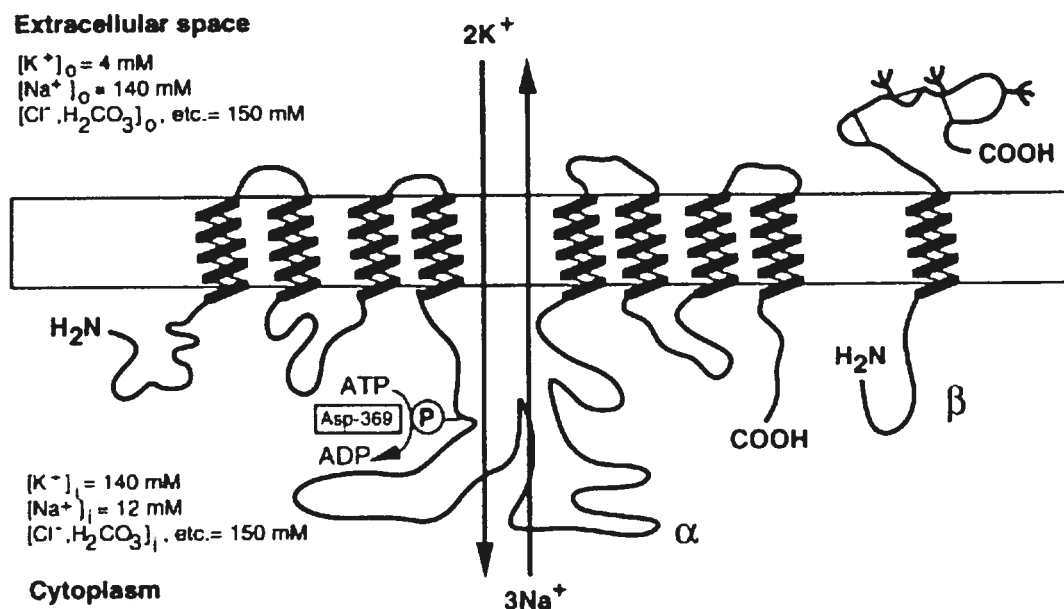
ainsi un effet autocrine des EETs <sup>292</sup>. Les métabolites de l'acide arachidonique, soient les EETs, ne semblent pas représenter l'EDHF universel mais chez certaines espèces et dans divers lits artériels, ils semblent être impliqués directement ou indirectement dans l'hyperpolarisation de l'endothélium et du muscle lisse dépendante d'EDHF.

Le polymorphisme important des cytochromes P450 permet aussi de croire que d'autres isoformes de ce complexe enzymatique pourraient être régulées de façons différentes et que les produits synthétisés par ces enzymes pourraient avoir des cibles différentes de celles énumérées ci-dessus. Il est donc possible que les métabolites de l'acide arachidonique puissent être impliqués de manière encore inconnue dans les vasorelaxations dépendantes d'EDHF.

#### 1.2.2.6-Ions potassiques ( $K^+$ )

C'est en 1980 qu'un rôle de la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase vasculaire a été reconnu dans la relaxation obtenue avec l'acétylcholine <sup>294</sup>. Il est ensuite rapidement devenu clair que l'activation de cette pompe peut mener à l'hyperpolarisation du muscle lisse <sup>295;296</sup>. La pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase est composée d'hélices  $\alpha$  transmembranaires et de feuilletts  $\beta$  <sup>297</sup>(Figure 8). Les hélices  $\alpha$  forment un canal dans la membrane et elles sont responsables de la plupart des fonctions physiologiques attribuables à la pompe. Elle possède un site intracellulaire d'hydrolyse d'ATP et un site extracellulaire de liaison aux glycosides de type digitalique <sup>297</sup>. Il existe au moins 3 isoformes de la sous-unité  $\alpha$  soient les isoformes  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  ainsi que  $\alpha_3$  et 2 isoformes de la sous-unité  $\beta$  soient  $\beta_1$  et  $\beta_2$  <sup>298</sup>. La pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase est électrogénique et fonctionne de manière cyclique en transportant 2 ions  $K^+$  vers l'intérieur de la cellule et 3 ions  $Na^+$  vers l'espace extracellulaire à chaque cycle. Ce transfert requiert l'énergie obtenue par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par cycle <sup>299</sup>. Ce ratio de 3 charges positives vers l'extérieur pour 2 vers l'intérieur explique le fait qu'une activation de la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase provoque une hyperpolarisation du muscle lisse. La pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase vasculaire est sensible à de légères augmentations de la concentration extracellulaire de  $K^+$ . En effet, une augmentation

de 5 à 15 mM active la pompe et peut provoquer une dilatation des vaisseaux sanguins.



(Marin et al., 1999)<sup>300</sup>

**Figure 8. Structure de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.** La sous-unité α traverse la membrane plasmique huit fois et les deux parties terminales NH<sub>2</sub>- et COOH- sont dans le cytoplasme. La phosphorylation de l'enzyme par l'ATP ou le phosphate inorganique a lieu sur l'acide aminé ASP-369. La sous-unité β traverse la membrane plasmique une seule fois et les parties terminales NH<sub>2</sub>- et COOH- se retrouvent respectivement dans le cytoplasme et dans l'espace extracellulaire.

Une telle augmentation de la concentration extracellulaire d'ions potassiques peut aussi activer les canaux potassiques à rectification entrante ( $K_{ir}$ )<sup>301</sup> en augmentant leur probabilité d'ouverture ( $P_o$ )<sup>302</sup>. Cette augmentation de la  $P_o$  des canaux  $K_{ir}$  est probablement obtenue en diminuant le bloc des canaux par les polyamines et par le magnésium ( $Mg^{2+}$ )<sup>303</sup>. Les canaux  $K_{ir}$  sont exprimés dans de nombreux types cellulaires et leur courbe de courant en fonction du voltage démontre une forte rectification entrante. Cette rectification s'explique par le fait que pour n'importe quel voltage, le flux interne d'ions potassiques est plus grand que le flux externe à voltage égal opposé. En condition physiologique, la rectification de ces canaux est telle que très peu de courant les traverse à des potentiels membranaires plus positifs que -40 millivolts<sup>304</sup>. Les ions  $Mg^{2+}$  intracellulaires sont responsables de cette rectification à des potentiels positifs et il a été démontré que de légères



augmentations de la concentration extracellulaire d'ions potassiques sont en mesure de déplacer les ions  $Mg^{2+}$  qui bloquent le canal<sup>305;306</sup>.

Une augmentation de 5 à 15 millimolaires d'ions  $K^+$  externes au niveau vasculaire peut donc engendrer une dilatation artérielle sensible au barium ( $Ba^{2+}$ ), un bloqueur sélectif des canaux  $K_{ir}$  lorsqu'appliqué à des concentrations inférieures à 50 micromolaires, et sensible à la ouabaine, un bloqueur de la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase<sup>89;307;308</sup>. L'hypothèse proposant les ions  $K^+$  comme étant un EDHF a été proposé en premier en 1998<sup>130</sup>. Cette hypothèse fût basée sur trois observations faites au niveau d'artères mésentériques et hépatiques de rat : i) Les réponses dépendantes d'EDHF induites par l'acétylcholine peuvent être atténuées par l'administration simultanée de  $Ba^{2+}$  et de ouabaine sans affecter l'hyperpolarisation endothéliale, ii) des augmentations de la concentration extracellulaire de  $K^+$  hyperpolarisent et dilatent des préparations artérielles ne possédant pas d'endothélium et cet effet peut être bloqué par le  $Ba^{2+}$  et la ouabaine et iii) des mesures avec une électrode sensible au  $K^+$  démontrent une augmentation de la concentration d'ions  $K^+$ , induite par l'acétylcholine, dans un espace myoendothélial putatif<sup>130</sup>.

Le mécanisme proposé par Edwards et ses collaborateurs est caractérisé par une libération, induite par un agoniste, d'ions potassiques par les canaux  $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$  endothéliaux. Cette libération a pour effet d'augmenter la concentration intercellulaire, soit entre l'endothélium et le muscle lisse, de  $K^+$  activant ainsi les canaux  $K_{ir}$  et les pompes  $Na^+/K^+$ -ATPases des cellules musculaires lisses. L'hyperpolarisation du muscle lisse qui s'en suit induit la fermeture des canaux calciques vasculaires de type L favorisant ainsi la dilatation artérielle<sup>130</sup> (Figure 2).

Des études fonctionnelles avec des vaisseaux de souris transgéniques ne possédant pas de gènes codant pour les canaux  $K_{ir}$  suggèrent que les réponses de type EDHF dépendantes des ions  $K^+$  pourraient impliquer des canaux  $K_{ir}$  du sous-type 2.1<sup>309</sup>. D'autre part, des études fonctionnelles à l'aide d'anticorps spécifiques suggèrent que la composante sensible à la ouabaine, impliquée dans les réponses aux ions  $K^+$  des artères mésentériques de rat, est la  $Na^+/K^+$ -ATPase constituée des sous-unités  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$  et sensible à des concentrations de ouabaine d'environ 500 nanomolaires<sup>310</sup>.

La relaxation artérielle induite par une légère augmentation de la concentration extracellulaire des ions  $K^+$  n'est pas mise en doute mais la possibilité que les ions  $K^+$  soient un EDHF est en revanche la cible de plusieurs critiques. En effet, le fait que les réponses de type EDHF soient souvent résistantes au  $Ba^{2+}$  et à la ouabaine, même si les artères étudiées se dilatent en réponse à l'application de  $K^+$  exogène, démontrent que les ions  $K^+$  ne sont pas l'EDHF universel<sup>126;225;230;256;311;312</sup>. Une critique qui revient souvent est basée sur le fait qu'une contraction artérielle obtenue à l'aide d'une concentration élevée d'agoniste provoque une dépolarisation qui favorise un efflux d'ions  $K^+$  par les canaux  $BK_{Ca}$  des cellules musculaires lisses. Cet efflux de  $K^+$  peut alors créer un nuage d'ions  $K^+$  qui serait en mesure de masquer l'activation des canaux  $K_{ir}$  et de la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase par des sources additionnelles de  $K^+$ <sup>313;314</sup>.

Une autre critique provient d'études démontrant que dans des artères munies d'un endothélium intact, les relaxations induites par le potassium sont bloquées par une combinaison de  $Ba^{2+}$  et de ouabaine alors que dans les artères sans endothélium, le  $Ba^{2+}$  n'a plus d'effet et seule la ouabaine bloque les relaxations<sup>230;311</sup>. Ces résultats semblent suggérer que les canaux  $K_{ir}$  seraient exprimés sur l'endothélium plutôt que sur le muscle lisse tel qu'originellement proposé. Ainsi, plutôt que de favoriser l'hyperpolarisation directement sur le muscle lisse, les canaux  $K_{ir}$  endothéliaux activés par le potassium pourraient maintenir, alimenter ou induire l'hyperpolarisation de l'endothélium et cette dernière pourrait être transmise au muscle lisse par l'intermédiaire des jonctions gap myoendothéliales<sup>313;315</sup>. En effet, il semblerait que l'hyperpolarisation endothéliale induite par le potassium puisse être transmise aux cellules musculaires lisses sous-jacentes par les jonctions gap puisque l'hyperpolarisation et la relaxation du muscle lisse dépendante de l'endothélium et des ions  $K^+$  sont atténuées par le Gap 27 et l'acide 18 $\alpha$ -glycyrrhétinique, deux bloqueurs des jonctions gap<sup>314;315</sup>.

L'implication potentielle des jonctions gap dans la réponse vasculaire de type EDHF dépendante du potassium n'explique pourtant pas le rôle de la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase. En effet, les concentrations de ouabaine utilisées pour inhiber la

pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase et donc les réponses vasorelaxantes induites par l'EDHF n'ont aucun effet sur le potentiel membranaire de repos ni sur la communication par les jonctions gap myoendothéliales <sup>316,317</sup>. L'hypothèse voulant que les ions  $\text{K}^+$  soient un EDHF est basée sur des études électrophysiologiques alors que les études la réfutant reposent sur des expériences mesurant le tonus vasculaire. Ces dernières sont, comparativement aux études électrophysiologiques, beaucoup plus difficiles à interpréter en raison de la présence obligatoire d'un agoniste vasoconstricteur. Ainsi, l'élévation du calcium intracellulaire des cellules musculaires lisses en réponse à cet agoniste pourrait résulter en la diffusion de  $\text{Ca}^{2+}$  vers l'endothélium par le biais des jonctions gap myoendothéliales, ce qui pourrait influencer les mécanismes calcium-dépendants de l'endothélium <sup>318</sup>. En effet, les études mesurant la tension et le potentiel membranaire simultanément démontrent que l'efficacité du  $\text{K}^+$  en tant qu'EDHF diminue avec l'augmentation de la stimulation obtenue avec un agoniste vasoconstricteur <sup>313</sup>. Ainsi, la présence d'un nuage potassique telle qu'avancée par Richards et ses collaborateurs en 2001 pourrait donc être due à une concentration élevée d'agoniste vasoconstricteur, une situation peu probable en condition physiologique. Il est intéressant de noter que chez l'homme sain, une infusion de  $\text{Ba}^{2+}$  et de ouabaine réduit le flot sanguin de l'artère brachiale et l'infusion de  $\text{K}^+$  produit une vasodilatation sensible à ces inhibiteurs, ce qui suggère la possibilité que le potassium, en tant qu'EDHF, ait un rôle physiologique réel <sup>319</sup>. L'implication des jonctions gap n'a aussi pu être démontrée que dans les études de vasoréactivité <sup>226</sup> alors qu'elles ne semblent jouer aucun rôle dans les études électrophysiologiques démontrant que le potassium agit comme un EDHF <sup>320</sup>.

Les ions  $\text{K}^+$  ne semblent pas, à la lumière de toutes les études sur le sujet, être l'EDHF universel mais ils semblent clairement être impliqués dans les hyperpolarisations et vasorelaxations dépendantes d'EDHF dans certaines artères et chez certaines espèces. L'importance du rôle occupé par le potassium dans les réponses vasculaires dépendantes d'EDHF et la possibilité que cet ion soit un EDHF demeurent incertaines surtout en raison des méthodes utilisées pour étudier ce phénomène.

### 1.2.2.7- EDHF : un consensus?

Depuis les 15 dernières années, il y a donc eu une multitude d'hypothèses quant à la nature du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium. En plus des endocanabinoïdes, des métabolites de l'acide arachidonique, du peroxyde d'hydrogène, du peptide C natriurétique, des ions potassiques et de l'hyperpolarisation transférée électriquement par les jonctions gap myoendothéliales, d'autres candidats au titre d'EDHF ont été proposés puis rapidement rejetés. Parmi ceux-ci se retrouvent la L-citrulline et l'adénosine. Il a été rapporté par Ruiz et Tejerina (1998)<sup>321</sup> que la L-citrulline pourrait relaxer l'aorte thoracique du lapin par un mécanisme impliquant la guanylate cyclase particulaire, le GMPc et les canaux SK<sub>Ca</sub>. Ainsi la L-citrulline, un produit secondaire de la formation de NO, devenait un candidat EDHF possible. Pourtant, un autre groupe a par la suite démontré, en utilisant le même protocole que Ruiz et Tejerina, que la L-citrulline était incapable de produire une vasorelaxation au niveau des aortes thoraciques de rat et de lapin<sup>322</sup>. Ces résultats contradictoires s'expliquent probablement par le fait que la L-citrulline peut, en présence de synthétase et de lyase d'arginosuccinate, être recyclée en L-arginine par les tissus. La L-citrulline pourrait donc relaxer les tissus indirectement par l'intermédiaire de la synthèse de NO à partir de la L-arginine recyclée<sup>323</sup>.

L'adénosine est un important vasodilatateur endogène des artères coronaires<sup>324</sup>. Le rôle de l'endothélium dans le mécanisme de la vasodilatation induite par l'adénosine n'est pas clair. Les cellules endothéliales semblent exprimer les récepteurs A<sub>2B</sub> à l'adénosine<sup>325</sup> mais des études démontrent que la relaxation, induite par l'adénosine, des artères coronaires humaines est indépendante de l'endothélium et implique l'activation des récepteurs A<sub>2B</sub> du muscle lisse liés aux canaux K<sub>Ca</sub><sup>326</sup>. Une autre étude suggère une relaxation, induite par l'adénosine, de type EDHF et donc dépendante de l'endothélium au niveau des artères carotides et mésentériques du rat mais de plus amples confirmations de ces résultats par d'autres groupes sont toujours attendues<sup>327</sup>.

Un consensus basé sur de nombreuses évidences suggère que les réponses vasculaires dépendantes d'EDHF sont initiées par une augmentation de la concentration calcique endothéliale favorisant l'activation des canaux  $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$  endothéliaux. Ces derniers, par l'extrusion de potassium, induisent l'hyperpolarisation des cellules endothéliales. Dans certains tissus, cette hyperpolarisation endothéliale peut être affectée par les EETs (Figure 7). L'hyperpolarisation endothéliale peut ensuite être véhiculée aux cellules musculaires lisses par la légère augmentation de la concentration extracellulaire de  $K^+$ , résultant de l'activation des canaux endothéliaux  $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$ , et qui active la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase et les canaux  $K_{ir}$  du muscle lisse (Figure 2). L'hyperpolarisation peut aussi être transférée au muscle lisse par une libération endothéliale d'endocannabinoïdes, de peptide C natriurétique et de peroxyde d'hydrogène. Ces substances agissent toutes sur le muscle lisse en activant des cibles telles que les canaux  $K_{ir}$ , la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase et les canaux  $BK_{Ca}$ . Les jonctions gap myoendothéliales peuvent aussi permettre un transfert direct et électrique de l'hyperpolarisation endothéliale vers le muscle lisse (Figure 2). Ces mécanismes ne sont pas nécessairement mutuellement exclusifs et il est donc possible que plusieurs de ceux-ci soient responsables des réponses vasodilatatrices dépendantes d'EDHF. De nombreux paramètres incluant l'état d'activation des cellules musculaires lisses, la densité des jonctions gap myoendothéliales, les niveaux d'expression des différents isoformes du cytochrome P450, les différents isoformes exprimées de la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase et des canaux  $K_{ir}$ , l'âge et l'état de santé des animaux étudiés ainsi que les protocoles utilisés pour les études peuvent donc avoir un effet sur la nature du ou des EDHFs présents dans un lit artériel particulier.

### **1.3- Dysfonction endothéliale**

La dysfonction endothéliale est présente dans de nombreuses maladies vasculaires. Elle est caractérisée par une détérioration de la fonction vasodilatatrice de l'endothélium et elle peut se manifester par une diminution de la sécrétion de vasodilatateurs, par leur inactivation, ou encore par une augmentation de la production de vasoconstricteurs. Chez les patients athérosclérotiques, les

contractions paradoxales des artères coronaires à l'Ach représentent le marqueur ultime de la dysfonction endothéliale <sup>112;328;329</sup>. Les lésions endothéliales et donc la progression de la dysfonction endothéliale peuvent être la conséquence d'un déséquilibre entre les facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs, entre les agents coagulants et anticoagulants ou encore entre les facteurs de croissance et les inhibiteurs de cette dernière. Des lésions endothéliales peuvent aussi être occasionnées par des facteurs chimiques, biochimiques ou mécaniques. Des sécrétions physiologiques et pathophysiologiques anormales induites par des stimulations exagérées de l'endothélium peuvent aussi favoriser le développement de lésions endothéliales et ainsi de la dysfonction endothéliale. Cette dernière peut être maintenue par plusieurs facteurs cellulaires tels que l'inflammation, l'oxydation des lipoprotéines ou encore d'autres formes de stress oxydant. On retrouve des dysfonctions endothéliales en condition d'endothélium régénéré <sup>330-333</sup>, en présence d'hypercholestérolémie <sup>334;335</sup>, d'athérosclérose <sup>336;337</sup>, d'hypertension <sup>338</sup>, dans l'insuffisance cardiaque <sup>339</sup>, l'insuffisance rénale <sup>340</sup>, et en présence de diabète <sup>341;342</sup>. Bien qu'il ne s'agisse pas d'une condition pathophysiologique, le vieillissement engendre une dysfonction endothéliale qui devient plus importante avec l'avancement en âge <sup>343</sup>.

### **1.3.1-Hypercholestérolémie**

L'hypercholestérolémie est, comme son nom l'indique, définie par une concentration supranormale de cholestérol dans le sang. Le cholestérol est très soluble dans les lipides mais très peu dans l'eau et il est capable de former des esters avec les acides gras. Environ 70% du cholestérol des lipoprotéines plasmatiques est présent sous la forme d'esters de cholestérol. En plus d'être ingéré dans la diète, le cholestérol peut être synthétisé par le foie et par les cellules en de moindres quantités. Le cholestérol est utilisé pour une panoplie de fonctions physiologiques mais, mise à part sa transformation en acides choliques, il est surtout utilisé comme composant des membranes cellulaires et dans les membranes des organelles cellulaires. Le ratio de cholestérol par rapport aux phospholipides dans les membranes est très important dans le maintien de la fluidité membranaire.

Le cholestérol plasmatique peut augmenter pour de nombreuses raisons soit par une ingestion excessive de cholestérol et de gras insaturés ou encore pour des raisons génétiques. Les lipoprotéines de faibles densités (LDLs) peuvent être facilement interceptées et absorbées dans l'endothélium vasculaire où elles peuvent être rapidement oxydées<sup>344</sup>. L'hypercholestérolémie a été la cible de nombreuses études vasculaires dans le but d'évaluer et d'élucider ses effets sur la fonction endothéliale des vaisseaux sanguins.

#### **1.3.1.1- Effets de l'hypercholestérolémie sur la fonction vasodilatatrice endothéliale indépendante d'EDHF**

L'hypercholestérolémie induite par des régimes riches en graisses et en cholestérol diminue les relaxations dépendantes de l'endothélium<sup>334;335</sup>. L'hypercholestérolémie génétique altère aussi de manière négative les vasodilatations dépendantes de l'endothélium<sup>345</sup>. Un dysfonctionnement endothélial induit par l'hypercholestérolémie est observable dans les artères périphériques<sup>346</sup>. Cependant, l'hypercholestérolémie n'est pas associée à une baisse des réponses du muscle lisse à la nitroglycérine, au nitroprussiate ou à l'adénosine. Les mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale observées en condition hypercholestérolémique ne sont donc pas très bien connus.

En effet, beaucoup d'études portent sur les effets vasculaires de l'athérosclérose plutôt que sur les effets de son principal précurseur, l'hypercholestérolémie. Chez le porc, la vasodilatation dépendante du NO est atténuée par l'hypercholestérolémie, un effet qui semble être dû à une réduction sélective des réponses endothéliales à certains agonistes<sup>347</sup>. Le même type de dysfonction endothéliale a pu être observé dans d'autres modèles d'animaux hypercholestérolémiques tels que le lapin au niveau de l'aorte par exemple<sup>347</sup>.

L'altération de la vasodilatation dépendante du NO chez le porc est limitée à la réponse à certains stimuli seulement. En effet, alors que les réponses à la substance P, à la bradykinine et aux forces de cisaillement ne semblent pas être affectées en

condition hypercholestérolémique, les réponses à la sérotonine et à la thrombine sont diminuées. Il semble donc que seuls les stimuli couplés à une protéine G de type  $G_{i-2}$  soient affectés <sup>347;348</sup>. Ces observations semblent démontrer que l'hypercholestérolémie n'affecte pas directement la production, la libération, la diffusion ou l'action du NO.

La dysfonction endothéliale semble plutôt résulter d'un défaut de couplage entre les récepteurs membranaires et la protéine  $G_{i-2}$  elle-même ou des cibles cellulaires de cette dernière telles que des canaux ioniques ou la guanylate cyclase. Il est peu probable que les récepteurs membranaires soient ciblés puisque la dysfonction semble affecter toutes les réponses associées à la protéine  $G_{i-2}$  indépendamment des sous-types de récepteurs impliqués. L'altération de l'activité de la protéine  $G_{i-2}$  semble être due à un effet inhibiteur de la lysophosphatidylcholine ou à une forme oxydée des LDLs <sup>349;350</sup>.

D'autres études expliquent la diminution des réponses vasodilatatrices dépendantes du NO par un mécanisme complètement différent. En effet, il semblerait que les niveaux d'un inhibiteur compétitif endogène de la NOS, la diméthylarginine asymétrique (ADMA), soient augmentés chez des sujets hypercholestérolémiques et athérosclérotiques. Cette augmentation favorise le déplacement de la L-arginine par l'ADMA dans la réaction catalysée par la NOS et donc diminue la quantité de NO produite. L'ADMA représente donc peut-être un nouveau facteur expliquant la dégradation des réponses vasorelaxantes dépendantes du NO en condition hypercholestérolémique, ce qui favorise le développement de l'athérosclérose <sup>351;352</sup>.

La dysfonction endothéliale est souvent associée à une hausse du stress oxydant résultant d'une augmentation de la production de ROS endogènes tels que l'anion superoxyde. Les cellules intimaes hypercholestérolémiques produisent des niveaux plus élevés d'anions superoxydes que les cellules normales <sup>353</sup>. Ces anions superoxydes réagissent avec le NO pour former du péroxynitrite et cette réaction qui consomme le NO est trois fois plus rapide que celle de la neutralisation de l'anion superoxyde par la superoxyde dismutase <sup>354</sup>. En condition



hypercholestérolémique, le métabolisme des LDLs par les cellules endothéliales et les macrophages de la paroi vasculaire épuise les défenses antioxydantes locales telles que l' $\alpha$ -tocophérol et la coenzyme Q <sup>355</sup>. Une fois que ces défenses antioxydantes sont épuisées, les LDLs subissent des oxydations et réduisent les niveaux de NO en diminuant l'expression de la eNOS par la déstabilisation de l'ARNm post-transcriptionnel <sup>356</sup>. Ainsi, cette action sur la eNOS en plus de la formation de peroxy-nitrite par les ROS, accentue la diminution de la réponse vasorelaxante dépendante du NO en condition hypercholestérolémique.

### **1.3.1.2- Effets de l'hypercholestérolémie sur la fonction vasodilatatrice endothéliale dépendante d'EDHF**

Bien peu d'études ont testé les effets de l'hypercholestérolémie sur la fonction EDHF. Comme pour le NO (via une action sur la protéine  $G_{i-2}$ ), la lysophosphatidylcholine semble inhiber les relaxations dépendantes d'EDHF <sup>357</sup>. Au niveau des artères gastroépiploïques humaines, l'hypercholestérolémie semble aussi réduire les relaxations EDHF <sup>122</sup>. D'un autre côté, la relaxation dépendante de l'endothélium est atténuée en condition hypercholestérolémique mais la composante dépendante d'EDHF de cette relaxation est augmentée au niveau de l'artère rénale de lapin <sup>358</sup>. Cette étude semble démontrer un rôle de soutien du facteur hyperpolarisant dans le maintien de la fonction vasculaire normale lorsque l'activité du NO fait défaut.

D'autres études ont démontré des effets de l'hypercholestérolémie sur des participants potentiels de la réponse à l'EDHF. Étant donné la nature multiple d'EDHF, il est possible que l'hypercholestérolémie affecte les vasodilatations dépendantes de ce facteur en affectant les mécanismes qu'il utilise. Les canaux  $BK_{Ca}$ , par exemple, pourraient être la cible d'un EDHF formé d'EETs ou du peptide C natriurétique et il semble que leur activité soit augmentée en condition hypercholestérolémique <sup>359</sup>. Cette augmentation de l'activité des canaux  $BK_{Ca}$  semble être d'avantage liée à la réponse dépendante du NO qu'à celle dépendante

d'EDHF au niveau de l'artère carotide du lapin hypercholestérolémique mais cette observation ouvre la voie à de nouvelles investigations sur l'apport de ces canaux dans la réponse induite par EDHF dans le cadre d'une hypercholestérolémie.

Il a aussi été démontré que l'hypercholestérolémie augmente l'expression du cytochrome P450 et la production d'EETs au niveau de l'aorte de lapin <sup>360</sup>. Il est aussi probable que l'augmentation du stress oxydant en condition hypercholestérolémique provoque, comme cela semble être le cas pour la réponse dépendante du NO, des altérations de la réponse vasodilatatrice impliquant EDHF. Les canaux  $IK_{Ca}$  endothéliaux, des participants majeurs dans la génération de l'hyperpolarisation endothéliale propre à EDHF, voient leur activité réduite par une diminution de leur conductance unitaire au niveau de l'aorte bovine en condition hypercholestérolémique <sup>361</sup>. Il a aussi été observé que l'activité des canaux  $K_{ir}$  des cellules ventriculaires du cochon d'inde semble être atténuée par l'hypercholestérolémie <sup>362</sup>. Ces canaux sont souvent impliqués dans la réponse à EDHF que ce soit au niveau endothélial ou musculaire. Ainsi, une baisse de leur activité pourrait engendrer une baisse de l'efficacité d'EDHF.

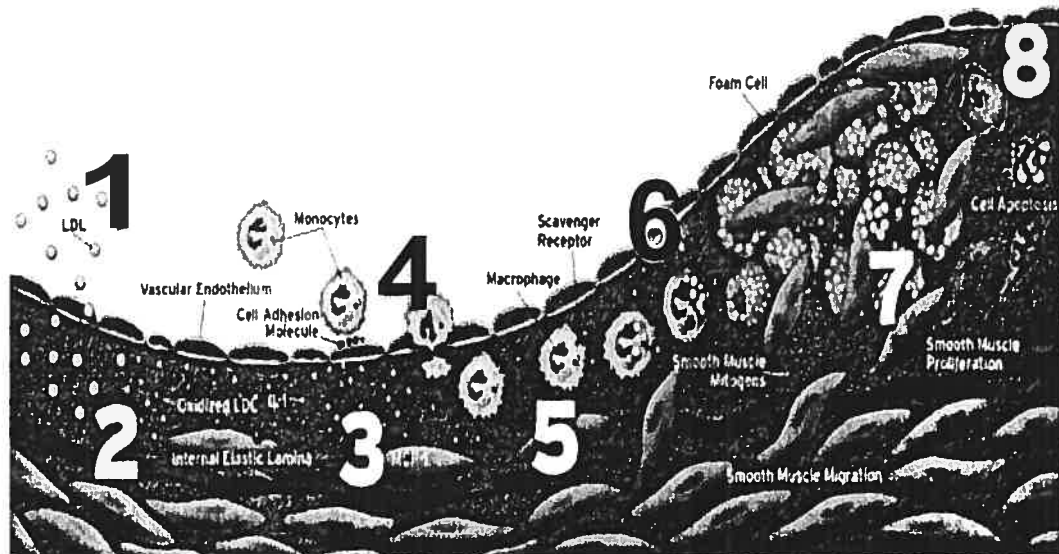
La pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase est inhibée par les ROS et cet effet peut être inversé par l'utilisation d'antioxydants <sup>363;364</sup>. Comme les canaux  $K_{ir}$ , la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase semble être une cible vasculaire pour EDHF dans certaines artères. Une inhibition de cette pompe lors de conditions pathophysiologiques telles que l'hypercholestérolémie peut, par l'augmentation du stress oxydant, mener à une atténuation des réponses vasorelaxantes indépendantes du NO et de la  $PGI_2$ . Ainsi, différents participants des mécanismes possiblement impliqués dans les réponses vasorelaxantes reliées à EDHF semblent pouvoir être affectés par l'hypercholestérolémie, mais des études supplémentaires seront nécessaires afin de faire le lien entre ces observations et une réelle altération de la réponse dépendante d'EDHF.

### 1.3.2-Athérosclérose

L'hypercholestérolémie est un facteur de risque de l'athérosclérose. Les cellules endothéliales et les LDLs sont deux participants majeurs dans l'établissement de cette pathologie. L'athérosclérose est une maladie insidieuse et chronique qui peut prendre des décennies avant de se manifester cliniquement. La première étape menant à la formation de plaques athérosclérotiques consiste en la pénétration de LDLs dans la paroi artérielle où ils subissent des modifications telles que des oxydations (Figure 9, points 1 et 2). Cette étape est probablement présente dès l'apparition de la condition hypercholestérolémique. Les LDLs oxydés peuvent initier une cascade de réponses cellulaires telles que la production de médiateurs de l'inflammation comme les cytokines. L'étape qui suit et qui est primordiale dans le processus athérosclérotique est l'induction de molécules d'adhésion endothéliales (Figure 9, point 3). Par la suite, les leukocytes, attirés par les cytokines chémoattractives, s'attachent à ces molécules d'adhésion et pénètrent dans la paroi vasculaire (Figure 9, point 4). Les monocytes qui sont ainsi entrés dans la paroi deviennent des macrophages ingérant les LDLs oxydés. Un excès de LDL oxydés recapté par les macrophages est toxique pour ces cellules qui deviennent résidentes et se différencient en cellules spumeuses chargées en lipides (Figure 9, points 5, 6 et 7). En réponse à cela et à d'autres stimuli, des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire migrent de la média vers l'intima où elles prolifèrent et forment une matrice extracellulaire qui contribue à la formation des lésions athérosclérotiques et des capsules fibreuses observées dans les derniers stades de l'athérosclérose <sup>365</sup>.

Les plaques athérosclérotiques sont caractérisées par un noyau nécrotique de lipides hautement thrombogéniques, une capsule fibreuse et une augmentation du nombre de macrophages et de lymphocytes T aux embranchements artériels, soit les endroits où les ruptures de plaques ont habituellement lieu <sup>367</sup>. L'intégrité des capsules fibreuses dépend probablement d'une balance des forces entre la synthèse et la dégradation des matériaux matriciels, deux facteurs influencés par l'inflammation. Des évidences suggèrent que les métalloprotéinases matricielles

contribuent à la déstabilisation des plaques en dégradant la matrice présente dans la capsule fibreuse <sup>368</sup>.



(Plutzky, 2003)<sup>366</sup>

**Figure 9. Progression de l'athérosclérose dans le temps.** 1) Entrée des LDL dans la paroi artérielle. 2) Induction des cascades cellulaires. 3) Expression des molécules d'adhésion par l'endothélium. 4) Les leukocytes, attirés par les chémokines, entrent dans la paroi artérielle grâce aux molécules d'adhésion. 5) Induction de la différenciation des lipoprotéines oxydées en cellules spumeuses par les monocytes de la paroi artérielle. 6) et 7) Migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima où elles prolifèrent et élaborent la matrice extracellulaire. 8) Développement ultérieur de plaques athérosclérotiques plus complexes.

Lorsqu'une plaque athérosclérotique se rompt, le système circulatoire et les composants de sa cascade de coagulation sont exposés au noyau de lipides thrombogéniques et la thrombose résultante peut provoquer, selon l'ampleur de l'occlusion artérielle coronarienne, un infarctus du myocarde ou une angine pectorale instable <sup>369</sup>. Les artères de résistance ne forment pas de plaques athérosclérotiques en raison de l'absence d'espace sous-endothélial qui les caractérise et aussi parce qu'elles ne sont pas soumises aux stress occasionnés par les variations de débit sanguin que l'on retrouve dans les grosses artères. Ainsi, en

condition hypercholestérolémique, l'endothélium des artères de résistances absorbe les LDLs et les oxyde mais ces artères ne développent pas de plaques athérosclérotiques. Les plaques propres à l'athérosclérose sont donc surtout observables au niveau des artères de conductance où les dysfonctions endothéliales induites par les facteurs de risque favorisent leur développement.

Malgré cela, des dysfonctions endothéliales ont été observées au niveau d'artères de résistance de la circulation périphérique <sup>370</sup>. Les dysfonctions endothéliales coronaires les plus importantes induites lors de l'athérosclérose se retrouvent surtout au niveau des embranchements artériels, soit au niveau des sites plus sujets aux variations de flux sanguin <sup>371</sup>. La diminution de la production et de la sécrétion de NO observable en condition hypercholestérolémique augmente les risques de développement de l'athérosclérose étant donné la perte des fonctions antithrombogéniques attribuables au NO <sup>347</sup>.

La diminution de l'activité de la protéine  $G_{i-2}$  observée en condition hypercholestérolémique peut également favoriser le développement de l'athérosclérose. En effet, la protéine  $G_{i-2}$  inhibe l'adénylate cyclase, diminuant donc les niveaux d'AMPc. Inversement, une inhibition de cette protéine G cause une augmentation d'AMPc dans l'endothélium <sup>347</sup>. Cette élévation des niveaux d'AMPc semble favoriser la transformation ou la modulation de l'endothélium sain protectif à un endothélium favorisant le développement de lésions athérosclérotiques entre autres par une augmentation de la liaison des monocytes à l'endothélium <sup>372</sup>.

Les effets de l'hypercholestérolémie sur la fonction endothéliale semblent être amplifiés en condition athérosclérotique. Il a été démontré que la formation de  $PGI_2$  est diminuée dans les cellules endothéliales des segments de vaisseaux atteints d'athérosclérose <sup>373</sup>. Les mécanismes impliqués dans cette diminution sont inconnus. L'explication pourrait se trouver dans le fait que les peroxydes lipidiques tels que l'acide 15-hydroperoxyéicosatétranoïque (15-HPETE) et l'acide 13-hydroperoxyoctadéca-diénoïque (13-HPODE) ainsi que les LDLs oxydés ont un effet inhibiteur puissant sur la  $PGI_2$  synthétase <sup>374</sup>. De plus, les anions superoxydes,

dont les niveaux augmentent en conditions hypercholestérolémique et athérosclérotique, inhibent la production endothéliale de PGI<sub>2</sub><sup>23</sup>.

Il semblerait qu'un effet sur EDHF pourrait également être en partie responsable de l'altération des réponses vasodilatatrices observables lors de l'athérosclérose<sup>375</sup>. Il a été observé que les degrés de dysfonctions endothéliales corrélaient en général avec les degrés d'athérosclérose<sup>376</sup>. Les dysfonctions endothéliales observées en condition hypercholestérolémique semblent donc toutes être amplifiées lorsque l'athérosclérose se développe. Cet effet semble être observable non seulement au niveau des artères de conductance sujettes au développement de plaques athérosclérotiques, mais aussi au niveau des artères de résistance.

#### **1.4-Vieillessement**

Le vieillissement est un processus normal caractérisé par de nombreux changements physiologiques. En vieillissant, les organismes vivants deviennent plus sujets au développement de diverses maladies et les capacités régénératrices et protectrices du corps perdent de leur efficacité. Sans être pathologique, le vieillissement est souvent accompagné de conditions potentiellement néfastes qui peuvent favoriser une accélération de son développement et donc favoriser l'apparition de diverses maladies.

##### **1.4.1- Effets du vieillissement sur le système vasculaire**

Le vieillissement est associé à de nombreuses altérations du système vasculaire. Par exemple, avec l'âge, l'endothélium vasculaire devient plus perméable aux macromolécules<sup>377</sup>. L'inclusion de macromolécules tels que les LDLs dans la média des artères peut contribuer au développement éventuel de l'athérosclérose<sup>378</sup>. Avec l'âge, les grosses artères sont plus allongées, présentent une lumière plus large et un épaississement de la paroi, surtout au niveau de l'intima et de la média<sup>379</sup>. Les cellules endothéliales de ces artères sont parfois dotées de formes irrégulières et les cellules musculaires lisses prolifèrent et infiltrent parfois l'espace sous-endothélial.

Ces artères présentent aussi souvent des dépôts de collagène, d'élastine et de protéoglycans exagérées ainsi qu'une abondance anormale de leucocytes et de macrophages.

De nombreuses autres substances impliquées dans l'inflammation ou dans le développement athérosclérotique sont aussi plus abondantes dans l'intima des vieilles artères <sup>380;381</sup>. L'un des principaux changements affectant le système vasculaire lors du vieillissement est caractérisé par une perte de l'élasticité artérielle <sup>382</sup>. Cet effet semble être plus important au niveau des artères de conductance qu'au niveau des artères de résistance <sup>383</sup>. La plupart des altérations vasculaires observées lors du vieillissement peut aussi être retrouvée lors de l'athérosclérose. Ainsi, le vieillissement a souvent été vu comme étant une étape précoce du développement athérosclérotique et d'un autre côté, l'athérosclérose est perçue comme une forme d'accélération du vieillissement artériel, un fait probablement amplifié par des stimuli toxiques tels que l'hypertension ou l'hypercholestérolémie. Il est pourtant important de noter que malgré les voies biochimiques semblables qui caractérisent le vieillissement et l'athérosclérose, les altérations artérielles présentes chez des patients âgés sains n'évoluent pratiquement jamais jusqu'au développement de l'athérosclérose.

Les réponses contractiles dépendantes de l'endothélium peuvent aussi être affectées par le vieillissement même si elles demeurent inchangées dans bien des cas. Par exemple, le muscle lisse de certaines artères devient moins sensible à l'endothéline avec le vieillissement. Ceci semble être dû à une diminution de l'expression des récepteurs à l'endothéline <sup>384</sup>. Chez le rat âgé, les artères coronaires sont plus sensibles et se contractent plus fortement à la sérotonine <sup>385</sup>. Dans ce cas-ci, le mécanisme responsable semblerait être une augmentation de l'affinité des récepteurs 5-HT<sub>2</sub> sensible à la sérotonine. Une telle augmentation des réponses à la sérotonine est également caractéristique de l'hypertension artérielle <sup>386</sup>, un facteur de risque des maladies cardiovasculaires au même titre que l'hypercholestérolémie. Cette effet de l'âge sur les réponses induites par la sérotonine peut aussi être dû à la présence d'endothélium de seconde génération qui ne répond plus de façon adéquate à cet agoniste <sup>387</sup>. La réponse contractile dépendante de l'endothélium en

réponse à la stimulation des récepteurs cholinergiques muscariniques est augmentée avec l'âge, un effet qui résulte probablement de la formation de métabolites vasoconstricteurs par la cyclooxygénase <sup>388;389</sup>. L'hypertension induit des changements identiques chez le rat jeune <sup>390</sup>.

Le vieillissement a aussi des effets sur la régulation du calcium intracellulaire. En effet, l'âge augmente la sensibilité au calcium des artères mésentériques du rat <sup>391</sup>. Il semblerait que le vieillissement puisse induire des changements au niveau du potentiel membranaire et des canaux calciques dépendants du voltage <sup>392</sup>. Dans certaines artères, le potentiel membranaire de repos semble devenir plus négatif avec l'âge <sup>392</sup>. La pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase semble aussi être affectée par le vieillissement. Une réduction de l'activité de la pompe a été démontré au niveau du cœur âgé et des aortes de rats <sup>393;394</sup>. L'activité de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ne semble pas être affectée par le vieillissement au niveau des artères mésentériques et cérébrales du chien alors qu'elle semble être activée au niveau des artères basilaires du lapin <sup>395;396</sup>.

#### **1.4.2-Endothélium régénéré**

L'endothélium vasculaire humain a une ½ vie d'environ 30 ans, au-delà de laquelle, le nombre de cellules régénérées devient significatif. Après cette durée, les cellules endothéliales commencent à être remplacées par de nouvelles cellules endothéliales formant ainsi un endothélium régénéré. Peu de cas de maladies cardiovasculaires sont observés chez l'homme durant les 30 premières années de sa vie, ce qui porte à croire que le rôle protecteur de l'endothélium régénéré n'est pas aussi efficace que celui de l'endothélium original.

Cette hypothèse a en premier lieu été supportée par une étude utilisant un cathéter en forme de ballon pour enlever délicatement l'endothélium des artères coronaires de porc <sup>330</sup>. Malgré une accumulation initiale rapide de plaquettes aux sites dénudés d'endothélium, les animaux ont survécu et, un mois plus tard, un nouvel endothélium était formé. Il semblerait même que le nouvel endothélium était deux



fois plus dense que l'ancien. Malgré sa densité, ce nouvel endothélium n'était plus aussi anti-thrombogénique que l'ancien endothélium tel que le démontrait la présence de vasospasmes lors d'application de plaquettes sanguines directement au site étudié, une réaction habituellement observée seulement en absence d'endothélium <sup>330</sup>.

Comme c'est le cas dans l'hypercholestérolémie, l'expression ou l'efficacité de certaines protéines G<sub>i</sub> semble être altérée dans l'endothélium régénéré <sup>397</sup>. Avec des cellules endothéliales de porc en culture, il a été démontré que la réponse induite par la sérotonine est diminuée et que cet effet semble être dû à des changements des niveaux d'expression des protéines G<sub>i</sub> <sup>397;398</sup>. Ainsi, il semblerait que lorsque les cellules endothéliales se régénèrent dans des conditions considérées anormales, elles cessent d'exprimer des éléments clés nécessaires aux réponses impliquées dans la sécrétion de sérotonine et de facteurs relaxants dérivés de l'endothélium. D'autres études ont appuyé cette hypothèse. Par exemple, la fonction endothéliale était défectueuse au niveau de segments d'artères coronaires de chien après 30 minutes d'occlusions puis une période de reperfusion <sup>399</sup>. Trois mois après l'évènement, des accumulations de cellules blanches et de plaquettes pouvaient être clairement observées aux endroits ayant subi des lésions <sup>399</sup>. Il est intéressant de noter qu'aucune observation n'a permis, lors de cette étude, de démontrer qu'il y avait eu perte et régénération de cellules endothéliales, donc ceci semble indiquer que même des perturbations mineures de l'endothélium peuvent résulter en une dysfonction endothéliale.

Des études récentes du groupe de Vanhoutte et Félétou ont démontré que l'EDHF était affecté après régénération de l'endothélium. Toute les études animales ont clairement démontré un déclin de la fonction de l'endothélium régénéré. En présence de facteurs de risque tels que l'hypercholestérolémie, un endothélium régénéré pourrait ne pas être suffisamment protecteur et accélérer les effets néfastes de ces facteurs de risque.

### 1.4.3- Effets du vieillissement sur la fonction vasodilatatrice endothéliale indépendante d'EDHF

Le vieillissement est associé à une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium.<sup>400</sup> Cette réduction pourrait être attribuable à une diminution de la synthèse de NO et de GMPc ou encore à l'épaississement de la paroi artérielle observable lors du vieillissement, ce qui rend plus difficile l'accès au muscle lisse par le NO<sup>400</sup>. L'influence du vieillissement sur les vasorelaxations dépendantes de l'endothélium varie selon l'espèce, l'agoniste vasodilatateur et le lit vasculaire. La réponse vasodilatatrice induite par l'acétylcholine est atténuée au niveau de plusieurs lits artériels<sup>401;402</sup>.

L'histamine induit aussi des vasodilatations en stimulant une libération de NO par les cellules endothéliales. L'âge diminue l'ampleur de ces réponses à l'histamine au niveau des artères mésentériques du rat et des artères cérébrales du chien<sup>400</sup>. Une partie de la réponse vasorelaxante dépendante de l'histamine est induite par une libération de PGI<sub>2</sub> et, au niveau des artères mésentériques de chien, cette libération est, paradoxalement plus importante chez les sujets plus âgés<sup>403</sup>. Ainsi, ces résultats semblent suggérer que la diminution de la réponse relaxante induite par l'histamine observée lors du vieillissement serait due à une baisse de l'efficacité des autres composantes de cette réponse. D'un autre côté, Woodman et ses collaborateurs ont démontré que le vieillissement diminue les réponses vasodilatatrices induites par le NO et par la PGI<sub>2</sub> chez le rat<sup>404</sup>. Il est important cependant de noter que la dégradation du NO est accélérée chez les rats âgés malgré une augmentation de la production de ce dernier<sup>405</sup>. La PGI<sub>2</sub> ayant une ½ vie très courte ( 10 sec), une même augmentation compensatoire de la production de PGI<sub>2</sub> avec l'âge pourrait se produire.

Les réponses vasodilatatrices peuvent être altérées par une ou des modifications des mécanismes intracellulaires reliés à la formation et à la libération du NO. Chez le porc, la vasorelaxation dépendante de l'endothélium induite par la noradrénaline (NA) dépendante des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques est atténuée avec l'âge<sup>406</sup>, alors

que les dilatations induites par la substance P ou la bradykinine ne sont pas affectées. Il en est de même avec les vasodilatations induites par l'ATP qui ne semblent pas être modifiées par le vieillissement <sup>389</sup>. Le mécanisme responsable de la libération de NO causée par l'activation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques et muscariniques implique des protéines G spécifiques qui ne sont pas stimulées par les récepteurs à la bradykinine, à l'ATP et à la substance P. Il est donc possible que les protéines G de ce type spécifique, telles que les protéines  $G_i$ , perdent de leur efficacité lors du vieillissement. Il est aussi possible que la perte de fluidité membranaire associée au vieillissement altère la fonction des protéines G <sup>407</sup>.

Il est aussi très probable que les vasodilatations dépendantes du NO soient affectées par la génération d'un excédent de ROS lors du vieillissement. Il est maintenant clair que les mécanismes impliqués dans la synthèse et la libération du NO ainsi que le NO lui-même sont très sensibles au stress oxydant <sup>405</sup>. Les produits de peroxydations lipidiques augmentent avec l'âge et ils pourraient jouer un rôle dans le développement de maladies vasculaires et dans les altérations observées lors du vieillissement. Il a été démontré que les niveaux de glutathione plasmatique, un important co-facteur des enzymes antipéroxydantes qui protègent la paroi, diminuent avec le vieillissement chez l'humain <sup>408</sup>. Cette diminution peut représenter un facteur de risque dans le développement des dysfonctions endothéliales associées au vieillissement. Il a aussi été démontré que les niveaux plasmatiques de malondialdéhyde (MDA), un produit des peroxydation lipidiques qui réduit les vasodilatations dépendantes de l'endothélium dans l'artère de la queue du rat, augmentent avec l'âge <sup>402</sup>. Le stress oxydant semble donc, comme c'est le cas pour diverses maladies vasculaires, avoir un rôle à jouer dans les dysfonctions endothéliales induites lors du vieillissement et ce, malgré des tentatives d'augmentation de mécanismes antioxydants comme la  $\beta$ -carotène <sup>409</sup>.

#### **1.4.4- Effets du vieillissement sur la fonction vasodilatatrice endothéliale dépendante d'EDHF**

Très peu d'études ont examiné les effets du vieillissement sur la fonction vasodilatatrice dépendante d'EDHF. Il y a lieu de croire que ces réponses

vasorelaxantes puissent être affectées comme le sont celles impliquant le NO, puisque des altérations des réponses dépendantes de l'endothélium induites par le vieillissement ont été observées au niveau des artères de conductance et de résistance. Cette hypothèse a originellement été basée sur le fait que la contribution d'EDHF est majoritaire dans les réponses vasodilatatrices dépendantes de l'endothélium au niveau des artères de résistance.

Au niveau de l'artère mésentérique supérieure du rat, il a été démontré que l'hyperpolarisation et la relaxation induites par l'acétylcholine, toutes deux dépendantes d'EDHF, sont atténuées avec l'avancement en âge <sup>410</sup>. Il en est de même pour les artères gastroépiploïques distales humaines, des vaisseaux où les vasorelaxations à l'acétylcholine sont surtout véhiculées par EDHF <sup>122</sup>. En effet, dans ces artères, le vieillissement réduit les vasodilatations dépendantes d'EDHF <sup>122</sup>. Contrairement aux résultats obtenus par Fujii et ses collaborateurs, Alvarez de Sotomayor et ses collègues ont démontré que les relaxations, dépendantes de la formation et libération d'EDHF, des artères mésentériques de rat de deuxième et de troisième branche ne semblent pas affectées par le vieillissement <sup>411</sup>. Les vasorelaxations EDHF dépendantes des artérioles du muscle gastrocnémus de rat semblent aussi être insensibles au vieillissement <sup>412</sup>. Il est intéressant de noter que le vieillissement peut affecter la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase musculaire en diminuant ou en activant celle-ci <sup>393-396</sup>. Il est donc légitime de penser que le vieillissement pourrait avoir un effet sur la fonction EDHF dans les artères où les ions  $\text{K}^+$  semblent être à l'origine des réponses vasodilatatrices dépendantes d'EDHF.

Il semble que le vieillissement affecte aussi l'EDHF au niveau de certains lits vasculaires et chez certaines espèces. Certains voient l'EDHF comme un facteur insensible au vieillissement, et un mécanisme de compensation lors de la perte de la réponse dépendante du NO, alors que d'autres perçoivent l'EDHF comme le facteur majeur responsable des réponses vasodilatatrices dépendantes de l'endothélium au niveau des artères de résistance lequel, au même titre que le NO, est donc sensible au vieillissement.

## 2.0- Démarche scientifique

L'intérêt scientifique pour le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium est devenu de plus en plus important au courant des 15 dernières années. Pourtant, aucun EDHF universel n'a pu être identifié à ce jour même si quelques candidats semblent plus réalistes que d'autres. La nature et le mécanisme d'action de ce facteur hyperpolarisant dépendent de l'espèce et du type d'artère étudiés. La grande majorité des études portant sur l'EDHF a été conduite sur des artères de jeunes animaux. Peu d'études ont observé les effets du vieillissement sur le facteur EDHF.

De plus, peu de choses sont connues quant aux effets de diverses conditions pathologiques telles que l'hypercholestérolémie sur la fonction EDHF.

La présente thèse comporte trois objectifs :

- 1) Le premier objectif consiste en l'étude de la nature et du mécanisme d'action du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium au niveau d'une artère de petit calibre, l'artère *gracilis* de la souris. C'est en effet dans les artères de résistance que l'EDHF est prédominant. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle, dans l'artères *gracilis* de la souris de souche C57Bl6 âgée de 3 mois, comme c'est le cas dans de nombreux autres lits artériels, l'EDHF est composé d'ions  $K^+$  libérés par les canaux  $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$  endothéliaux qui hyperpolarisent et dilatent le muscle lisse en y activant les pompes  $Na^+/K^+$ -ATPase et les canaux  $K_{ir}$ .

Nous avons utilisé la technique de l'artère pressurisée à une pression proche de la situation *in vivo* permettant l'enregistrement de dilatations en réponse à des applications d'Ach. Afin d'isoler les dilatations dépendantes d'EDHF, nous avons utilisé le L-NNA et l'indométhacine pour éliminer pharmacologiquement l'implication du NO et de la  $PGI_2$ . Afin de s'assurer que les dilatations produites après l'inhibition de la formation du NO et de la  $PGI_2$  étaient seulement dûes à l'EDHF, des expériences ont été faites en présence de L-NNA, d'indométhacine et d'une solution riche en potassium. Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons

commencé par étudier l'implication des canaux  $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$  dans les dilatations à l'Ach de type EDHF, en présence de bloqueurs spécifiques de ces canaux. L'augmentation de la concentration extracellulaire de  $K^+$  obtenue par l'ouverture des canaux  $K_{Ca}$  endothéliaux hyperpolarise les cellules musculaires lisses en y activant les pompes  $Na^+/K^+$ -ATPase et les canaux  $K_{ir}$ <sup>130</sup>. L'implication de ces deux cibles musculaires lisses a été vérifiée lors de protocoles standards de dilatation à l'Ach en présence de bloqueurs spécifiques.

2) Le peu de connaissance quant aux effets du vieillissement sur la fonction EDHF ont justifié le deuxième objectif de cette thèse qui consiste en l'étude des effets du vieillissement sur la nature, l'efficacité et le mécanisme d'action d'EDHF au niveau de l'artère *gracilis* de la souris. Nous avons vérifié l'hypothèse selon laquelle l'efficacité de la fonction EDHF est réduite par le vieillissement sur des artères *gracilis* de souris témoin de lignée C57Bl6 âgées de 3, 12 et 18 mois.

Nous avons étudié les effets du vieillissement sur la fonction EDHF au niveau de l'artère *gracilis* pressurisée. Les mêmes protocoles ont été répétés chez les souris de 3, 12 et 18 mois. La nature du facteur EDHF a été vérifiée aux divers âges en présence des bloqueurs des canaux  $K_{Ca}$ , de la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase et des canaux  $K_{ir}$ . Afin de vérifier si les ions  $K^+$  étaient les seuls responsables des dilatations de type EDHF, des bloqueurs des cytochromes P450, des canaux  $BK_{Ca}$ , des canaux  $K_{ATP}$  ainsi que plusieurs autres composés visant divers cibles potentielles ont été utilisés lors de protocoles standards de dilatation à l'Ach.

Les effets délétères du vieillissement sur l'efficacité des dilatations dépendantes du facteur EDHF ont été étudiés à l'aide de protocoles vérifiant l'implication possible d'une augmentation du stress oxydant. Ces protocoles incorporaient l'utilisation d'un produit antioxydant afin de vérifier la possibilité de renverser la perte de la fonction EDHF observée lors du vieillissement.

3) Les effets de l'hypercholestérolémie sur la fonction EDHF sont, comme pour le vieillissement, peu connus. Ainsi, le troisième objectif consiste en l'étude des effets de l'hypercholestérolémie, associée au vieillissement, sur la nature, l'efficacité et le

mécanisme d'action d'EDHF au niveau de l'artère *gracilis* de la souris. Nous avons vérifié l'hypothèse selon laquelle l'efficacité de la fonction EDHF est réduite par l'hypercholestérolémie associée au vieillissement, et ce de manière accélérée par rapport au vieillissement seulement, sur des artères *gracilis* de souris hypercholestérolémiques exprimant le gène codant pour l'apolipoprotéine B-100 humaine, âgées de 3, 12 et 20 mois.

Les mêmes protocoles de dilatations à l'Ach ont aussi été utilisés sur l'artère *gracilis* des souris hypercholestérolémiques. Comme nous l'avons expliqué précédemment, ces protocoles incorporaient différents bloqueurs afin de dévoiler la nature du facteur EDHF et ses cibles cellulaires dans notre préparation. Tous les protocoles utilisées chez les groupes témoins ont été répétés chez les groupes hypercholestérolémiques. Dans certains cas, de nouveaux protocoles devaient être utilisés ou les protocoles utilisés chez les groupes témoins devaient être légèrement modifiés pour les groupes hypercholestérolémiques. Par exemple, le produit antioxydant utilisé n'a pas eu d'effet au niveau des groupes témoins mais un effet marqué a pu être observé chez les groupes hypercholestérolémiques. La dilatation dépendante d'EDHF ayant été récupérée en condition hypercholestérolémique grâce au produit antioxydant, nous avons voulu identifier la composante EDHF responsable de cette récupération. Nous avons donc refait les protocoles standards avec les différents bloqueurs en présence du produit antioxydant, ce qui nous a permis d'identifier la nature du facteur EDHF sensible au stress oxydant. Chez les groupes témoins, étant donné que le stress oxydant ne semblait pas avoir d'effet ou avait des effets irréversibles, nous n'avions donc aucune raison de faire les mêmes expériences.

### **3.0- Méthodes expérimentales**

#### **3.1- Modèle animal**

Afin de vérifier nos hypothèses et d'atteindre nos objectifs, nous avons utilisé deux types de souris, témoin et hypercholestérolémique. Le groupe témoin était composé

de souris mâles C57Bl6 âgées de 3, 12 et 18 mois dont les souches provenaient de “*Charles River Laboratories, St-Constant, Quebec, Canada*”. Ces souris pesaient en moyenne  $27 \pm 1$ ,  $45 \pm 1$  et  $53 \pm 4$  grammes à 3, 12 et 18 mois respectivement. Le groupe hypercholestérolémique était composé de souris mâles transgéniques exprimant le gène codant pour l’apolipoprotéine B-100 humaine âgées de 3, 12 et 20 mois (hApoB<sup>+/+</sup>)<sup>413</sup>. Ces souris nous ont été gracieusement données par le Dr Helen Hobbs (“*University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, U.S.A.*”) Ces souris ont un profil génétique de souche C57Bl6 à 75% et de souche SJI à 25%. Les souris hypercholestérolémiques pesaient  $31 \pm 1$ ,  $43 \pm 2$  et  $41 \pm 3$  grammes à 3, 12 et 20 mois respectivement. Les souris hypercholestérolémiques de cette souche développaient rapidement des niveaux de cholestérols et de triglycérides de 4.6 et 3.0 millimolaires, respectivement, soit des niveaux significativement plus élevés que chez les souris témoins.

Plusieurs autres modèles hypercholestérolémiques de souris existent, tels que les souris ne possédant pas le gène codant pour le récepteurs aux lipoprotéines de faibles densités (LDLR<sup>-/-</sup>), les souris ne possédant pas le gène codant pour le récepteurs aux lipoprotéines de faibles densités et exprimant le gène codant pour l’apolipoprotéine B-100 humaine (LDLR<sup>-/-</sup>;hApoB<sup>+/+</sup>), les souris ne possédant pas le gène codant pour le récepteurs aux lipoprotéines de faibles densités et exprimant le gène codant pour l’apolipoprotéine a humaine (LDLR<sup>-/-</sup>;hApoa<sup>+/-</sup>) et les souris ne possédant pas le gène codant pour l’apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>). Nous avons choisi d’utiliser le modèle hApoB<sup>+/+</sup> pour les raisons suivantes :

- Les animaux hApoB<sup>+/+</sup>, contrairement aux animaux LDLR<sup>-/-</sup>;hApoB<sup>+/+</sup> et LDLR<sup>-/-</sup>; hApoB<sup>+/+</sup><sup>413</sup>, développent une hypercholestérolémie moins drastique et probablement plus représentative de ce qui est observable chez l’humain.
- Le modèle ApoE<sup>-/-</sup> développe de l’hypercholestérolémie mais l’augmentation de cholestérol est surtout présente dans les lipoprotéines à densité intermédiaire (IDL) et très faible (VLDL), alors que chez l’humain, l’hypercholestérolémie se distingue plutôt par une augmentation des lipoprotéines à faible densité (LDL). L’augmentation du cholestérol chez le modèle hApoB<sup>+/+</sup> s’observe surtout au niveau des LDLs<sup>416</sup>.



### 3.2- Artère pressurisée

Toutes les procédures et protocoles sont en accord avec les règlements institutionnels et le guide Canadien pour l'entretien et l'utilisation d'animaux de laboratoire. Les expériences étaient conduites sur des artères *gracilis* de 175 à 210  $\mu\text{m}$ . L'artère *gracilis* gauche ou droite était retirée et placée dans une solution saline physiologique (PSS) froide à pH 7.4 aérée avec 12% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> / 83% N<sub>2</sub> et composée de (en mmol/L): NaCl 130, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, MgSO<sub>4</sub> 1.17, NaHCO<sub>3</sub> 14.9, CaCl<sub>2</sub> 1.6, EDTA 0.023, glucose 10. Des segments artériels de 2 à 3 mm étaient isolés et transférés dans la chambre de l'artériographe. Cette chambre contenait une paire de micropipettes de verre remplies de PSS à température de la pièce. La micropipette de débit entrant (proximale) était connectée à un système de servo-pompe à pression par un tube de silicone (Living Systems, Burlington, VT, USA). La micropipette de débit sortant (distale) était équipée d'un robinet à trois voies. Le PSS présent dans la chambre de l'artère (10 ml) était aéré et remplacé tous les 20 minutes. Une fois que l'artère était installée sur la pipette proximale et attachée à l'aide d'une suture, une pression de perfusion de 10 mmHg était appliquée afin d'expulser les traces de sang restant dans la lumière de l'artère. L'autre bout de l'artère était ensuite monté et attaché sur la pipette distale. Afin de rincer les micropipettes et l'artère, le système était perfusé pendant plusieurs minutes puis le robinet de la micropipette distale était bloqué. La pression était ensuite lentement (1 min) augmentée jusqu'à 80 mmHg. Le système de servo-pompe était ensuite placé dans le mode manuel (donc pas de maintien automatique de la pression de perfusion) afin de s'assurer de l'absence de fuite dans le système. Si aucune fuite n'était détectée (donc la pression de perfusion est demeurée constante), le contrôle de la servo-pompe était placé en mode automatique. La température était gardée à 37°C (Living systems, model TC-01) et l'artère demeurait en équilibration pendant 45 min. Pour tous les protocoles, les changements de diamètre étaient enregistrés sur ordinateur avec le programme d'acquisition Ionoptix.

Chaque protocole suivait la procédure suivante : les drogues utilisées étaient insérées dans la chambre de l'artère 30 minutes avant la fin de la période

d'équilibration. L'artère était ensuite précontractée avec de la phényléphrine (1 à 30  $\mu\text{mol/L}$ ). Cette précontraction représentait la contraction maximale atteinte pour chaque artère. Une courbe de concentration-réponse cumulative (1  $\text{nmol/L}$  à 30  $\mu\text{mol/L}$ ) à l'acétylcholine était ensuite faite. À la fin de l'expérience, la solution de PSS était remplacé par une solution de PSS ne contenant pas de calcium et avec du SNP (10  $\mu\text{mol/L}$ ) et de l'EGTA (1  $\text{mmol/L}$ ) ( $0 \text{ Ca}^{2+}$ ) afin d'obtenir la valeur maximale de dilatation. Une seule courbe de concentration-réponse était faite par artère.

Après la période d'incubation de 45 minutes, le tonus myogénique (MT) était calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{MT} = 100 \times [(0 \text{ Ca}^{2+} - \text{diamètre initial}) / (0 \text{ Ca}^{2+} - \text{diamètre de précontraction})]$$

Les réponses dilatatrices étaient exprimées en différences (en pourcentage) de diamètre, normalisées par rapport aux diamètres minimum et maximum et calculées

à l'aide de la formule suivante : Dilatation induite par l'acétylcholine =

$$[100 \times (\text{diamètre-diamètre de précontraction}) / (0 \text{ Ca}^{2+} - \text{diamètre de précontraction})]$$

Afin d'étudier les dilatations dépendantes d'EDHF, le  $\text{N}^{\omega}$ -nitro-L-arginine (L-NNA, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) et l'indométhacine (indo, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) étaient présents dans la chambre de l'artère afin de bloquer les productions de NO et de prostanoïdes respectivement. Les dilatations dépendantes de NO/ $\text{PGI}_2$  étaient étudiées en présence d'une solution de PSS contenant 40  $\text{mmol/L}$  de KCl. Cette solution était préparée en remplaçant 40  $\text{mmol/L}$  de NaCl par 40  $\text{mmol/L}$  de KCl. Selon le canal, l'enzyme, ou la pompe étudiée, l'apamine (Apa, 1  $\mu\text{mol/L}$ ), la charybdotoxine (Chtx, 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ), l'ibériotoxine (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ), l'acide 17-octadécynoïque (17-ODYA, 10  $\mu\text{mol/L}$ ), le barium ( $\text{Ba}^{2+}$ , 30  $\mu\text{mol/L}$ ) ou la ouabaïne (1  $\text{mmol/L}$ ) était appliqué dans la chambre de l'artère 30 minutes avant le début de l'expérience (Figure 10).

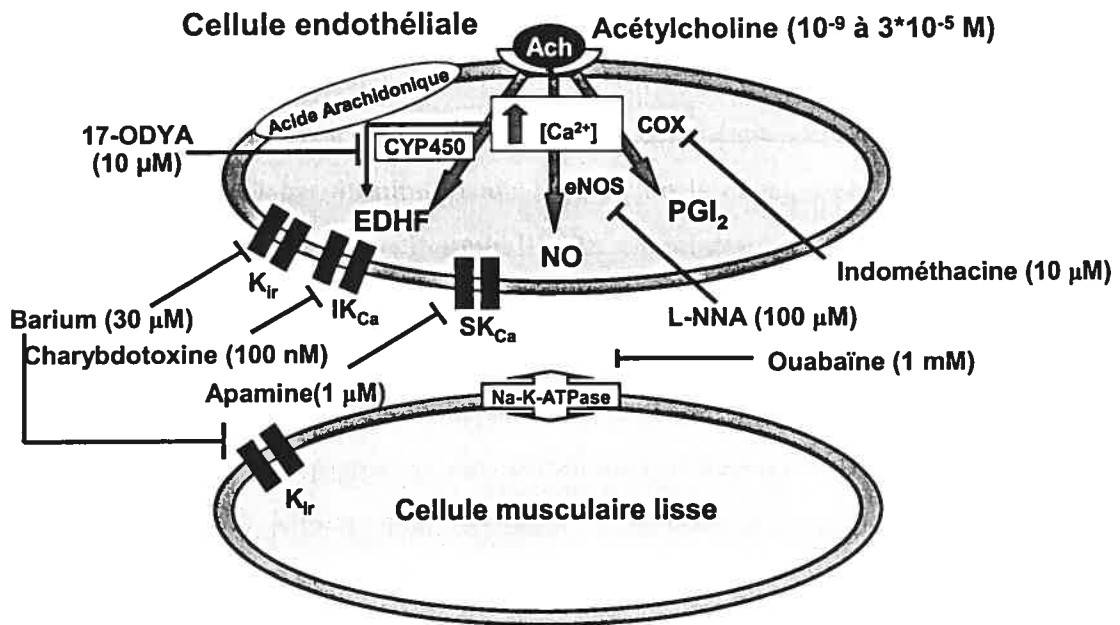


Figure 10. Canaux, pompes et enzymes et leurs inhibiteurs. Inhibiteurs des principaux mécanismes impliqués dans la formation de NO et de PGI<sub>2</sub> ainsi que dans les mécanismes vasodilatateurs de type EDHF au niveau de l'artère *gracilis* de la souris.



## **Summary**

1. A universal endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF – non-NO / non-PGI<sub>2</sub>) has not been identified. EDHF, however, is essential for the physiological control of resistance artery tone. The impact of dyslipidemia (DL), a risk factor for cardiovascular diseases, on the nature and the efficacy of EDHF has not been evaluated yet.
2. Pressurized (80 mm Hg) *gracilis* arterial segments isolated from 3 m/o mice expressing the human apoB-100 and C57Bl/6 wild type (WT) mice were used. EDHF-dependent dilatations to acetylcholine (ACh) were measured in the presence of L-NNA (100 μM, NOS inhibitor) and indomethacin (10 μM, COX inhibitor). Data are expressed as mean ± SEM.
3. Maximal EDHF-induced dilatations were increased in DL when compared to WT (95±2% *versus* 86±4% in WT; P<0.05). Combination of apamin and charybdotoxin strongly reduced (P<0.05) ACh-induced dilatation in WT (22±4%) and DL (25±5%).
4. Combined addition of Ba<sup>2+</sup> and ouabain abolished EDHF-induced dilatations in WT arteries (13±3%; P<0.05). In vessels isolated from DL mice, however, only the addition of 14,15-EEZE (a 14,15-EET antagonist) to Ba<sup>2+</sup> and ouabain prevented EDHF-induced dilatations (5±3% compared to 54±11% in the presence of combined Ba<sup>2+</sup> and ouabain; P<0.05).
5. Our data suggest that EDHF-mediated dilatation depends on the opening of endothelial SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> channels. This is associated with the opening of K<sub>ir</sub> channels and activation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump on smooth muscle cells leading to dilatation. In arteries from DL mice, a cytochrome P450 metabolite likely to be 14,15-EET equally contributes to the dilatory action of ACh. The early increased efficacy of EDHF in arteries isolated from DL mice may originate from the duplication of the EDHF pathways.

**Key words:** Endothelium; *gracilis* artery; EDHF; hypercholesterolemia; triglycerides; mouse.

**Abbreviations:** ACh, acetylcholine; Apa, apamin; Ba<sup>2+</sup>: barium; K<sub>Ca</sub>, Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel; Chtx, charybdotoxin; EDHF, endothelium derived hyperpolarising factor; EETs, epoxyecosatrienoic acids; EEZE, 14,15-epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid; E<sub>max</sub>, maximal dilatation; DL: hypercholesterolemia; indo, indomethacin; K<sub>ir</sub> : inward rectifier potassium channels; L-NNA, N $\omega$ -nitro-L-arginine; MT, myogenic tone; NO, nitric oxide; Oub: ouabain; PE: phenylephrine; PGI<sub>2</sub>, prostacyclin; PSS, physiological salt solution; SNP, sodium nitroprusside; WT: wild type; 17-ODYA: 17-octadecynoic acid; 18 $\alpha$ -glycyrrhetic acid: 18 $\alpha$ -GA.

## Introduction

Three factors have been identified as being endothelium-derived relaxing factors (EDRFs). Of these three EDRFs, only nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) pathways are well characterised, while the endothelium-derived hyperpolarising factor (EDHF) is still the subject of debates as to its nature and its mechanisms of action. Studies have identified EDHF, a non-NO / non-PGI<sub>2</sub> factor, as being an augmentation of the extra-cellular concentration of potassium ions ([K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>) between smooth muscle and endothelial cells (Edwards *et al.*, 1998). The apamin-sensitive small conductance calcium-dependent potassium channel (SK<sub>Ca</sub>) (Adeagbo & Triggle, 1993; Parsons *et al.*, 1996; Véquaud & Thorin, 2001), the charybdotoxin-sensitive intermediate conductance calcium-dependent potassium channel (IK<sub>Ca</sub>) (Cowan *et al.*, 1993; Lischke *et al.*, 1995), or a combination of both channels have been shown to account for the accumulation of K<sup>+</sup> ions in the extra-cellular space (Zygmunt & Hogestatt, 1996; Edwards *et al.*, 1998). The hyperpolarising action on the smooth muscle cells of this augmentation of the [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> has been shown to be driven by the activation of barium-sensitive smooth muscle inward-rectifier potassium (K<sub>ir</sub>) channels (Knot *et al.*, 1996, Edwards *et al.* 1998) and/or of the ouabain-sensitive smooth muscle sodium-potassium pump (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase) (Félétou & Vanhoutte, 1988, Edwards *et al.*, 1998). Amongst the many other potential EDHFs, cytochrome P-450 metabolites of arachidonic acid such as the epoxyeicosatrienoic acids (EETs), have also been postulated in some cases as being responsible for the non-NO and non-PGI<sub>2</sub> smooth muscle hyperpolarisation induced by acetylcholine (ACh) or bradykinine (Campbell *et al.*, 1996; Fisslthaler *et al.*, 1999; Gauthier *et al.*, 2002). In addition, gap junctions have been involved in the dilatation of resistance arteries (Brandes *et al.*, 2000; Dora *et al.*, 2003).

The vascular endothelial function is sensitive to pathological conditions often resulting in its degradation. Hypercholesterolemia (HC) has been shown to have deleterious effects on the NO-dependent relaxation (Cohen, 1995). As of today, however, little is known on the effect of HC and more generally DL on EDHF-dependent dilatation. The present experiments were designed to characterise the nature of EDHF in the wild type (WT) mouse *gracilis* resistance artery and to study the effects of clinically relevant DL on EDHF dilatation in mice expressing the human apolipoprotein B100 (hApoB<sup>+/+</sup>; Sanan *et al.*, 1998). Our results suggest

that the nature and mechanisms of action of EDHF differ between vessels isolated from WT and DL mice. EDHF-dependent dilatation was augmented in arteries isolated from DL mice when compared to vessels isolated from WT mice. In WT mice arteries, Ach-induced opening of endothelial SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> channels accounts for the EDHF-dependent dilatation. This dilatation is prevented by smooth muscle combined inhibition of K<sub>ir</sub> channels and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump. In DL conditions, EETs, which are cytochrome P450 metabolites of the arachidonic acid, also contribute to the endothelium-dependent dilatation induced by Ach in the presence of L-NNA and indomethacin.



## Material and Methods

### Vascular Preparation

The procedures and protocols were in accordance with our institutional guidelines and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* of Canada. Experiments were conducted on isolated *gracilis* arteries of 3 month-old C57BL/6 (WT) mice (27±1g) (Charles River Laboratories, St-Constant, Quebec, Canada) and DL mice expressing the human apolipoprotein B-100 (31±1g, P<0.05) (Sanan *et al.*, 1998) using a method previously described (Nguyen *et al.*, 1999). DL mice were kindly provided by Dr. Helen Hobbs (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, U.S.A.). The plasma concentration of cholesterol was 3.2±0.3 mM in WT and 4.6±0.3 mM in DL mice (P<0.05). Triglyceride was increased (P<0.05) from 1.3±0.3 mM in WT to 3.0±0.3 mM in DL mice. Mice were killed by CO<sub>2</sub> inhalation. The right or left *gracilis* artery was dissected and placed in ice-cold physiological salt solution (PSS) of the following composition (mM): NaCl 130, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, MgSO<sub>4</sub> 1.17, NaHCO<sub>3</sub> 14.9, CaCl<sub>2</sub> 1.6, EDTA 0.023 and glucose 10, aerated with 12% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> / 83% N<sub>2</sub> (37°C, pH 7.4). Segments of the *gracilis* artery were cleaned up of surrounding tissue and fat. A 2 to 3 mm length arterial segment was isolated, cannulated at both ends and pressurized at 80 mm Hg in no-flow condition in a pressure myograph as previously described (Véquaud & Thorin, 2001). Internal pressure was maintained constant and real time diameter changes were monitored using a pressure servo-control and a video dimension analyzer, respectively (Living System, Burlington, Vermont, USA). All experiments were conducted on segments with an internal diameter of 175 to 210 µm when pressurised at 80 mm Hg. An equilibration time of 45 min was allowed before starting the experiment.

### Experimental Protocols

Single cumulative concentration-response curve to acetylcholine (ACh, 1 nM to 30 µM) was obtained in vessels pre-contracted with phenylephrine (PE, 1 to 30 µM). Following pre-contraction, average diameters of arteries isolated from WT and DL mice were 53±1 and 52±3 µm, respectively. The pre-treatment with some of the pharmacological tools used in this study constricted the vessels (reduction in

resting diameter, see Table 2); in these conditions, the concentration of PE was reduced to 1  $\mu\text{M}$  to reach a similar level of pre-contraction in all experimental conditions. In one experimental condition using  $\text{Ba}^{2+}$  and ouabain, the reduction in diameter of arterial segments isolated from DL mice was maximal (Table 2) and PE was not added.

To study EDHF like-dependent dilatation to ACh,  $\text{N}^{\text{O}}$ -nitro-L-arginine (L-NNA, 100  $\mu\text{M}$ ) and indomethacin (indo, 10  $\mu\text{M}$ ) were present in the bath chamber to prevent NO and prostanoid formation, respectively. In one series of experiments, combined NO- and  $\text{PGI}_2$ -dependent dilatations to ACh were obtained in the presence of 40 mM KCl PSS. Depending on the channel, enzyme, or pump targeted, apamin (Apa, 1  $\mu\text{M}$ ), charybdotoxin (Chtx, 0.1  $\mu\text{M}$ ), 14,15-epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid (EEZE, 1  $\mu\text{M}$ ), iberiotoxin (0.1  $\mu\text{M}$ ), 17-octadecynoic acid (17-ODYA, 10  $\mu\text{M}$ ), barium ( $\text{Ba}^{2+}$ , 30  $\mu\text{M}$ ), 18 $\alpha$ -glycyrrhetic acid (18 $\alpha$ -GA, 50  $\mu\text{M}$ ) or ouabain (1 mM) were added to the bath 30 minutes before the start of the protocol. At the end of the protocol, the maximal diameter ( $D_{\text{max}}$ ) was determined by changing the PSS to a  $\text{Ca}^{2+}$ -free PSS containing sodium nitroprusside (SNP, 10  $\mu\text{M}$ ) and ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA, 1 mM).

### Statistical Analysis

In every case,  $n$  refers to the number of animals used in each protocol. Half-maximum effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) of ACh was measured from each individual concentration-response curve using a logistic curve-fitting program (Microcal<sup>TM</sup>Origin<sup>TM</sup> version 5.0). The  $pD_2$  value, the negative log of the  $\text{EC}_{50}$ , was obtained. Continuous variables are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). For each protocol, basal diameter in no-flow condition was determined at the end of the 45 minutes equilibration period. Myogenic tone, which is a reduction in diameter induced by an increase in luminal pressure, was measured and expressed as percentage of the  $D_{\text{max}}$ . ACh-induced dilatation is expressed as a percentage of the  $D_{\text{max}}$ . ANOVA were performed to compare concentration-response curves. Differences were considered to be statistically significant when the  $P$  value was  $<0.05$  (Scheffe's  $F$  test).

## Drugs

Acetylcholine, apamin, indomethacin, L-NNA, phenylephrine, charybdotoxin, ouabain, 17-octadecynoic acid and 18 $\alpha$ -glycyrrhetic acid were purchased from Sigma. Barium was purchased from Mallinckrodt. All drugs were prepared daily and diluted in water except for indomethacin, EEZE and 17-octadecynoic acid which were prepared as stock solutions and diluted in ethanol and 18 $\alpha$ -glycyrrhetic which was dissolved in DMSO. All drugs were then directly added to the bath chamber (extraluminally) and the final concentration of ethanol and DMSO never exceeded 0.1 %. Equimolar amounts of NaCl were replaced with KCl to prepare the 40 mM K<sup>+</sup>-PSS.

## Results

### *EDHF, NO and PGI<sub>2</sub> dilatations*

In the presence of indomethacin and L-NNA, ACh-induced EDHF-dependent dilatations were increased ( $P < 0.05$ ) in the *gracilis* artery isolated from DL mice compared to WT mice (Fig. 1, Table 1). In contrast, no differences were observed in ACh-induced NO- and PGI<sub>2</sub>-dependent dilatation, measured in the presence of high external K<sup>+</sup> (Table 1). Compared to EDHF-mediated dilatation, however, the NO- and PGI<sub>2</sub>-dependent dilatation induced by ACh was significantly lower. Vascular sensitivity to ACh was not different between groups. All subsequent experiments were performed in the presence of L-NNA (100  $\mu$ M) and indomethacin (10  $\mu$ M) to study the EDHF pathways.

### *Contribution of small (SK<sub>Ca</sub>) and intermediate (IK<sub>Ca</sub>) conductance calcium-dependent potassium channels in EDHF-dependent dilatation to ACh*

Inhibition of SK<sub>Ca</sub> channels by apamin (100 nM) reduced by 10% ( $P < 0.05$ ) ACh-induced maximal dilatation of arteries isolated from WT mice (Table 1). This effect, however, was more pronounced ( $P < 0.05$ ) in arteries isolated from DL mice, in which apamin reduced maximal dilatation to ACh by 40% (Table 1). Inhibition of IK<sub>Ca</sub> channels with charybdotoxin reduced ( $P < 0.05$ ) ACh-dependent maximal dilatation from 86 to 54% as well as potency in arteries isolated from WT mice (Table 1), whereas in DL mice, charybdotoxin had no significant effects (Table 1).

Combination of apamin and charybdotoxin, however, blunted ACh-induced dilatation in both groups of arteries (Table 1, Fig. 1).

Since charybdotoxin has been reported to have inhibitory effects on big ( $BK_{Ca}$ ) conductance calcium-dependent potassium channels, these experiments were repeated in the presence of iberiotoxin alone, a  $BK_{Ca}$  specific blocker. Iberiotoxin (0.1  $\mu$ M) failed to affect EDHF-dependent dilatations. In segments isolated from DL mice (n=3), the maximal dilatation obtained in the presence of iberiotoxin was  $95\pm 2\%$  with a  $pD_2$  value for ACh of  $7.32\pm 0.35$ . These values are similar to those obtained in the presence of L-NNA + Indo (Table 1).

*Involvement of the inward rectifier potassium channels ( $K_{ir}$ ) and the  $Na^+/K^+$ -ATPase pump in EDHF-dependent dilatation to ACh*

In the presence of L-NNA and indomethacin,  $K_{ir}$  channels play a role in the dilatation induced by ACh in both groups of vessels.  $Ba^{2+}$  (30  $\mu$ M) diminished the maximal dilatation to  $72 \pm 4\%$  and  $73 \pm 9\%$  without affecting potency in arteries isolated from WT and DL mice, respectively (Table 1). In contrast, ouabain (1 mM) blunted ( $P<0.05$ ) ACh-induced dilatation in arteries isolated from WT mice, but had no significant effect in arteries isolated from DL mice (Table 1). In WT mice, a concentration of ouabain of 500 nM (n=3) also reduced ACh-induced maximal dilatation ( $26\pm 4\%$ ). This lower concentration, however, neither reduced the vascular sensitivity to ACh ( $pD_2$  value of  $7.23\pm 0.02$ ) nor increased significantly myogenic tone ( $24\pm 10\%$ ).

In the presence of a combined blockade of  $K_{ir}$  channels and the  $Na^+/K^+$ -ATPase pump, ACh-induced EDHF-dependent dilatation of arteries isolated from WT mice was prevented; this inhibition, however, did not differ from the inhibition obtained in the presence of ouabain alone (Table 1, Fig. 2). In contrast, combination of  $Ba^{2+}$  and ouabain, when compared to either drugs alone, resulted in a reduced ( $P<0.05$ ) maximal dilatation without preventing EDHF-mediated dilatation in vessels isolated from DL mice (Table 1, Fig. 2).

*Cytochrome P450 and gap junction involvement in EDHF-dependent dilatation to ACh*

In arterial segments isolated from WT mice, 17-ODYA (10  $\mu\text{M}$ ) did not impair the dilatation induced by ACh (Table 1). In contrast, 17-ODYA reduced ( $P < 0.05$ ) by half the maximal dilatation induced by ACh in vessels isolated from DL mice (Table 1). When 17-ODYA (10  $\mu\text{M}$ ) was applied in combination with  $\text{Ba}^{2+}$  (30  $\mu\text{M}$ ) and ouabain (1 mM), EDHF-dependent dilatation induced by ACh was abolished in arteries isolated from DL mice (Table 1).

EEZE (1  $\mu\text{M}$ ) reduced ( $P < 0.05$ ) by half the maximal dilatation induced by ACh in vessels isolated from DL mice (Table 1, Fig. 3). When EEZE was applied in combination with  $\text{Ba}^{2+}$  (30  $\mu\text{M}$ ) and ouabain (1 mM), EDHF-dependent dilatation induced by ACh was abolished in arteries isolated from DL mice (Table 1, Fig. 3). In arterial segments isolated from WT mice, EEZE did not impair the dilatation induced by ACh (Table 1, Fig. 3).

In additional experiments, the effects of more specific cytochrome P450 inhibitors were tested in arterial segments isolated from DL mice. Sulfaphenazole (10  $\mu\text{M}$ , 2C8 and 2C9 inhibitor), ketoconazole (10  $\mu\text{M}$ , 3A4 inhibitor) and 2-(2-propynyloxy)benzenehexanoic acid (PPOH, 20  $\mu\text{M}$ , 4A2 and 4A3 inhibitor) did not affect the dilatation induced by ACh (data not shown).

EETs may act by increasing conduction of gap junction. In the presence of 18 $\alpha$ -glycyrrhetic acid (18 $\alpha$ -GA, 50  $\mu\text{M}$ ), ACh-induced dilatation in the presence of Indo + L-NNA was affected neither in vessels isolated from WT nor in vessels isolated from DL mice (Table 1).

## Discussion

The present study had two objectives: the first was to characterise the mechanisms involved in the dilatation resistant to L-NNA and indomethacin of wild type mouse *gracilis* resistance arteries induced by ACh and attributed to EDHF. The second objective was to investigate the impact of DL on this pathway. The results suggest that the nature and the mechanisms of action of EDHF differ greatly between WT and DL *gracilis* arteries. In both WT and DL arteries, activation of endothelial SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> channels mediate the effects of EDHF. In WT mice, activation of these channels fully dilates smooth muscle cells by activating the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump, with a small contribution of K<sub>ir</sub> channels. In *gracilis* arteries isolated from DL mice, this pathway contributes to half of the dilatatory response to ACh. EETs, derived from the activity of a cytochrome P450, represent a secondary pathway contributing to the dilatation induced by ACh. Hence, DL leads to the duplication of the mechanisms responsible for EDHF-induced dilatation.

In this study, we used hApoB<sup>+/+</sup> mice. At 3 months of age, although the mice are dyslipidemic, vessels are free of atherosclerotic lesions. In addition, NO- and PGI<sub>2</sub>-dependent dilatation of isolated and pressurised *gracilis* arteries is similar in both groups, which demonstrate that endothelial function is not affected by DL at this age. The genetic background of the DL mice is 75% C57Bl6 and 25% SJI. As a control WT group, we used C57Bl6 mice. In preliminary control experiments (n=3), *gracilis* arteries isolated from SJI mice had an identical sensitivity to 1 mM ouabain (16±1%) and were insensitive to 17-ODYA (E<sub>max</sub>, 74±11%; pD<sub>2</sub>, 7.5±0.1) as vessels isolated from C57Bl6 mice. It is therefore the DL phenotype that is responsible for the changes in vascular function observed in this study.

In the presence of L-NNA and indomethacin, the dilatation induced by ACh is attributed to EDHF (Adeagbo & Triggle, 1993; Brandes *et al.*, 2000; Véquaud & Thorin, 2001). Our experimental conditions are favourable to reveal EDHF mechanisms since pressurised arteries are depolarised (40 to 45 mV) and develop myogenic tone, as previously reported (Potocnik *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2003). In arteries isolated from DL mice, the EDHF-dependent dilatation is significantly increased. This is in agreement with previous studies, which reported that DL augmented the EDHF-dependent relaxation of rabbit renal (Brandes *et al.*, 1997) and carotid (Najibi *et al.*, 1993) arteries. There are no clear reasons as why the

efficacy of EDHF increases in the early stages of DL. Our data, however, demonstrate that in DL, EDHF is a multifaceted factor, whereas in arteries isolated from WT mice, only the activation of SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> accounts for EDHF. Hence, in the early stage of DL, several factors insensitive to NOS and COX inhibition may contribute more efficiently than endothelial SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> alone to the dilatation induced by ACh.

As others have demonstrated (Beny & Schaad, 2000; Edwards *et al.*, 1998), a combination of apamin and charybdotoxin was required to prevent EDHF-dependent dilatation of arteries isolated from WT mice. Charybdotoxin also inhibits Kv1.2 and Kv1.3 (Garcia *et al.*, 1995) but it is unlikely that these channels form the endothelial cell target for the toxin in vessels as clearly discussed by Edwards and co-workers (1999). It has been proposed that endothelial SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> are responsible for the rise in [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> in the intercellular space (Edwards *et al.*, 1998). This increases the activity of the smooth muscle Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump leading to hyperpolarisation and dilatation. Our data are in agreement with this concept since ouabain prevented ACh-induced dilatation of arterial segments isolated from WT mice. In addition, and as previously reported by Edwards and collaborators (1999), a lower concentration of ouabain (500 nM) also prevented the dilatation to ACh. This further confirms the concept first described by Edwards and co-workers in 1998.

In arteries isolated from DL mice, apamin combined with charybdotoxin reduced EDHF-dependent dilatation to ACh, as in vessels isolated from WT mice. Ouabain, however, no longer prevented dilatation, suggesting a reduced contribution of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. The origin of this loss of efficacy is unknown. It is possible that the basal activity of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump is increased in DL, and thus not further activable following endothelial SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> opening. Depolarisation of arteries isolated from DL mice could increase the activity of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump. K<sub>ir</sub> activity, sensitive to Ba<sup>2+</sup> ions, appears to be increased in arteries isolated from DL mice. The activity of this channel is linked to the resting membrane potential (Hirst & Edwards, 1989). The apparent increased activity of K<sub>ir</sub> in vessels from DL mice may therefore be a consequence of a depolarised state, which would also contribute to an increased activation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump. K<sub>ir</sub> channel activity, however, may not be a target of any EDHF but rather a

reflection of smooth muscle membrane potential. This hypothesis needs to be assessed by direct membrane potential recording in pressurised arteries. In addition,  $K_{ir}$  channel activity has been reported to be essential for the conduction of the hyperpolarisation wave along resistance arteries, but not for the initiation of the hyperpolarisation (Rivers *et al.*, 2001).

This change in smooth muscle responsiveness led to an adaptive response from the endothelium. The reduced dilatory efficacy of endothelial  $SK_{Ca}$  and  $IK_{Ca}$  led to a compensatory endothelial release of an additional dilatory factor. This change in EDHF efficacy was not compensated by an up-regulation of NO production and/or effect. In contrast, an arachidonic acid metabolite of cytochrome P450 activity, sensitive to both 17-ODYA and EEZE, accounted for the compensatory EDHF-dependent dilatation to ACh in arteries isolated from DL mice. Such factor, most likely an EET, has been proposed to be the EDHF in several species including human arteries (Fisslthaler *et al.*, 1999; Brandes *et al.*, 2000; Archer *et al.*, 2003). As a consequence, a combination of ouabain,  $Ba^{2+}$  and 17-ODYA or EEZE were required to prevent EDHF-mediated dilatation induced by ACh in arteries isolated from DL mice, whereas ouabain alone is sufficient to prevent the dilatation of vessels isolated from WT mice.

The endothelial intracellular signal leading to EDHF production involves both  $SK_{Ca}$  and  $IK_{Ca}$ , as revealed by the inhibitory effects of a combination of apamin and charybdotoxin in arteries isolated from both type of mice. As proposed previously (Véquaud & Thorin, 2001), activation of endothelial muscarinic receptors may directly activate these channels. The resultant endothelial hyperpolarisation leads to a rise in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration (Beny & Schaad, 2000; Edwards *et al.*, 1998), which could promote cytochrome P450 activation and EET release in arteries isolated from DL mice. This suggests, however, that DL *per se* may be responsible for cytochrome expression. Cytochrome expression is known to be up-regulated by numerous factors (Roman, 2002), and HC has been reported as one of these factors in the aorta of HC rabbit leading to augmented production of EETs (Pfister *et al.*, 1991), which is in support of our current finding.

Although EETs account for EDHF in bovine coronary vessels, they usually hyperpolarise smooth muscle cells by activating  $BK_{Ca}$  (Baron *et al.*, 1997). In our hands, however, iberiotoxin did not prevent ACh-induced dilatation (data not



shown). EETs, however, have been shown to have other vascular effects such as an augmentation of gap junctional communication by a protein kinase C-dependent mechanism (Popp *et al.*, 2002) and an augmentation of the open probability of endothelial calcium channels (Watanabe *et al.*, 2003). These findings suggest that EETs could be implicated in the EDHF-dependent dilatation by acting as intracellular second messengers.

As mentioned above, EETs increase gap junction conductance (Popp *et al.*, 2002). In our hands, the gap junction blocker 18 $\alpha$ -glycyrrhetic acid did not reduce the dilatation induced by ACh in either group of vessels. It is clear however, that gap junction are involved in the conduction of the hyperpolarization (Dora *et al.*, 2003; Brandes *et al.*, 2000), but this is apparently not the case in the *gracilis* artery of the mouse. However, the rise in myogenic tone induced by 18 $\alpha$ -GA, significant in vessels isolated from DL mice, suggest that gap junctions are involved in the maintenance of the basal vascular tone.

Finally, apamin had a stronger inhibitory effect on EDHF-dependent dilatation in arteries isolated from DL mice than WT mice. In contrast, charybdotoxin reduced more dilatation in arteries from WT than from DL mice. This suggests that DL modifies the activated state of K<sub>Ca</sub> channels. This hypothesis is strengthened by the impact of these toxins on myogenic tone. Used individually, apamin and charybdotoxin, increased myogenic tone suggesting a lack of compensation of one conductance by the other, in contrast to what is observed in WT arteries. In combination, apamin and charybdotoxin increased myogenic tone to a similar level in both groups. Hence, the "cross-talk" of SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> channels observed in the WT is lacking in the DL mouse *gracilis* artery.

In conclusion, our results demonstrate that the nature and the mechanisms of action of EDHF differ between WT and DL mouse *gracilis* arteries. In both WT and DL arteries, activation of endothelial SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> channels is essential to induce dilatation. In the *gracilis* artery isolated from the DL mouse, this is no longer sufficient to induce a complete dilatation to ACh. A cytochrome P450 metabolite of the arachidonic acid, most likely EETs, contributes to the dilatatory action of ACh. This early compensation takes place whereas the NO-dependent function is intact. It

remains to demonstrate that EETs is essential for the maintenance of a normal endothelial function in DL mice.

### **Acknowledgements**

This work has been supported in part by the Foundation of the Montreal Heart Institute (ET), the Heart and Stroke Foundation of Quebec (ET) and the Canadian Institute for Health Research (ET), the NIH (GM31278, JRF) and the Robert A. Welch Foundation (JRF). E. Thorin is a scholar of the Heart and Stroke Foundation of Canada.

## References

- ADEAGBO, A.S.O. & TRIGGLE, C.R. (1993). Varying extracellular  $[K^+]$ : a functional approach to separating EDHF- and EDNO related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **21**, 423-429.
- ARCHER, S.L., GRAGASIN, F.S., WU, X., WANG, S., McMURTRY, S., KIM, D.H., PLATONOV, M., KOSHAL, A., HASHIMOTO, K., CAMPBELL, W.B., FALCK, J.R. & MICHELAKIS, E.D. (2003). Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK(Ca) channels. *Circulation*, **107**, 769-776.
- BARON, A., FRIEDEN, M. & BENY, J.L. (1997). Epoxyeicosatrienoic acids activate a high-conductance,  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channel on pig coronary artery endothelial cells. *J. Physiol.*, **504**, 537-543.
- BAUERSACHS, J., POPP, R., HECKER, M., SAUER, E., FLEMING, I. & BUSSE, R. (1996). Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation*, **94**, 3341-3347.
- BENY, J.L. & SCHAAD, O. (2000). An evaluation of potassium ions as endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.*, **131**, 965-973.
- BRANDES, R.P., BEHRA, A., LEBHERZ, C., BOGER, R.H., BODE-BOGER, S.M., PHIVTHONG-NGAM, L. & MUGGE, A. (1997). N(G)-nitro-L-arginine- and indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the rabbit renal artery: effect of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **135**, 49-55.
- BRANDES, R.P., SCHMITZ-WINNENTHAL, F.H., FELETOU, M., GODECKE, A., HUANG, P.L., VANHOUTTE, P.M., FLEMING, I. & BUSSE, R. (2000). An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 9747-9752.
- CAMPBELL, W.B., GEBREMEDHIN, D., PRATT, P.F. & HARDER, D.R. (1996). Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ. Res.*, **78**, 415-423.

- COHEN, R.A. (1995). The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **38**, 105-128.
- COWAN, C.L., PALACINO, J.J., NAJIBI, S. & COHEN, R.A. (1993). Potassium channel-mediated relaxation to acetylcholine in rabbit arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **266**, 1482-1489.
- DORA, K.A., SANDOW, S.L., GALLAGHER, N.T., TAKANO, H., RUMMERY, N.M., HILL, C.E. & GARLAND, C.J. (2003). Myoendothelial gap junctions may provide the pathway for EDHF in mouse mesenteric artery. *J. Vasc. Res.*, **40**, 480-490.
- EDWARDS, G., DORA, K.A., GARDENER, M.J., GARLAND, C.J. & WESTON, A.H. (1998).  $K^+$  is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*, **396**, 269-272.
- EDWARDS, G., GARDENER, M.J., FÉLÉTOU, M., BRADY, G., VANHOUTTE, P.M. & WESTON, A.H. (1999). Further investigation of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in rat hepatic artery: studies using 1-EBIO and ouabain. *Br. J. Pharmacol.*, **128**, 1064-1070.
- FÉLÉTOU, M. & VANHOUTTE, P.M. (1988). Endothelium-derived hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **93**, 515-524.
- FISLTHALER, B., POPP, R., KISS, L., POTENTE, M., HARDER, D.R., FLEMING, I. & BUSSE, R. (1999). Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*, **401**, 493-497.
- GARCIA, M.L., KNAUS, H.G., MUNUJOS, P., SLAUGHTER, R.S. & KACZOROWSKI, G.J. (1995). Charybdotoxin and its effects on potassium channels. *Am. J. Physiol.*, **269**, C1-C10.
- GAUTHIER, G.H., DEETER, C., KRISHNA, U.M., REDDY, Y.K., BONDLELA, M., FALCK, J.R. & CAMPBELL, W.B. (2002). 14,15-epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid, a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries. *Circ. Res.*, **90**, 1028-1036.
- HIRST, G.D.S. & EDWARDS, F.R. (1989). Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol. Rev.*, **69**, 546-604.

- KNOT, H.J., ZIMMERMANN, P.A. & NELSON, M.T. (1996). Extracellular K<sup>+</sup>-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier channels. *J. Physiol.*, **492**, 419-430.
- LISCHKE, V., BUSSE, R. & HECKER, M. (1995). Selective inhibition by barbiturates of the synthesis of endothelium-derived relaxing factor in the rabbit carotid artery. *Br. J. Pharmacol.*, **115**, 969-974.
- NAJIBI, S., COWAN, C.L., PALACINO, J.J. & COHEN, R.A. (1994). Enhanced role of potassium channels in relaxations to acetylcholine in hypercholesterolemic rabbit carotid artery. *Am. J. Physiol.*, **266**, H2061-H2067.
- NGUYEN, T.D., VEQUAUD, P. & THORIN, E. (1999). Effects of endothelin receptor antagonists and nitric oxide on myogenic tone and alpha-adrenergic-dependent contractions of rabbit resistance arteries. *Cardiovasc. Res.*, **43**, 755-761.
- PARSONS, S.J.W., SUMNER, M. & GARLAND, C.J. (1996). Apamin-sensitive responses to acetylcholine in rabbit isolated mesenteric arteries. *Br. J. Pharmacol. Proc. Supp.*, **117**, 278P.
- PFISTER, S.L., FALCK, J.R. & CAMPBELL, W.B. (1991). Enhanced synthesis of epoxyeicosatrienoic acids by cholesterol-fed rabbit aorta. *Am. J. Physiol.*, **261**, H843-H852.
- POPP, R., BRANDES, R.P., OTT, G., BUSSE, R. & FLEMING, I. (2002). Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Circ. Res.*, **90**, 800-806.
- POTOCNIK, S.J., MURPHY, T.V., KOTECHA, N. & HILL, M.A. (2000). Effects of mibefradil and nifedipine on arteriolar myogenic responsiveness and intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Br. J. Pharmacol.*, **131**, 1065-1072.
- RIVERS, R.J., HEIN, T.W., ZHANG, C. & KUO, L. (2001). Activation of barium-sensitive inward rectifier potassium channels mediates remote dilation of coronary arterioles. *Circulation*, **104**, 1749-1753.
- ROMAN R.J. (2002). P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol. Rev.*, **82**, 131-185.
- SANAN, D.A., NEWLAND, D.L., TAO, R., MARCOVINA, S., WANG, J., MOOSER, V., HAMMER, R.E. & HOBBS, H.H. (1998). Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100

- develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 4544-4549.
- TAYLOR, M.S., BONEV, A.D., GROSS, T.P., ECKMAN, D.M., BRAYDEN, J.E., BOND, C.T., ADELMAN, J.P. & NELSON, M.T. (2003). Altered expression of small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure. *Circ. Res.*, **93**, 124-131.
- THORIN, E., HUANG, P., FISHMAN, M.C. & BEVAN, J.A. (1998). Nitric oxide inhibits  $\alpha_2$ -adrenoceptor-mediated endothelium-dependent vasodilatation. *Circ. Res.*, **82**, 1323-1329.
- VÉQUAUD, P. & THORIN, E. (2001). Endothelial G protein beta-subunits trigger nitric oxide-but not endothelium-derived hyperpolarizing factor-dependent dilation in rabbit resistance arteries. *Circ. Res.*, **89**, 716-722.
- WATANABE, H., VRIENS, J., PRENEN, J., DROOGMANS, G., VOETS, T. & NILIUS, B. (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels 434. *Nature*, **424**, 434-438.
- ZYGMUNT, P.M. & HOGESTATT, E.D. (1996). Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation resistant to nitroarginine in the rat hepatic artery. *Br. J. Pharmacol.*, **117**, 1600-1606.

**Table 1.** Efficacy ( $E_{max}$ ) and sensitivity ( $pD_2$ ) to ACh of the *gracilis* artery isolated from wild type and dyslipidemic ( $hApoB^{+/+}$ ) mice.

Experimental conditions	<i>Wild type</i>			<i>hApoB<sup>+/+</sup></i>		
	$E_{max}$	$pD_2$	$n$	$E_{max}$	$pD_2$	$n$
High external $K^+$	48 ± 4*	7.7 ± 0.1	6	46 ± 4*	7.6 ± 0.3	6
L-NNA + Indo	86 ± 4	7.4 ± 0.2	7	95 ± 2†	7.4 ± 0.1	7
+ Apamin	73 ± 4*	7.2 ± 0.2	6	55 ± 12*	7.3 ± 0.4	6
+ Chtx	54 ± 4 *	6.7 ± 0.2*	7	74 ± 10†	7.0 ± 0.2	7
+ Apamin + Chtx	22 ± 4*	6.8 ± 0.2	7	25 ± 5*	6.0 ± 0.4*	5
+ $Ba^{2+}$	72 ± 4 *	7.2 ± 0.1	6	73 ± 9*	7.4 ± 0.2	6
+ Ouabain	19 ± 7 *	6.2 ± 0.6*	4	75 ± 10†	6.9 ± 0.2	7
+ $Ba^{2+}$ + Ouabain	13 ± 3 *	6.2 ± 0.5*	4	54 ± 11*†	7.0 ± 0.2	6
+ 17-ODYA	89 ± 5	7.6 ± 0.4	4	42 ± 11*†	7.2 ± 0.3	6
17-ODYA + $Ba^{2+}$ + Ouabain	8 ± 1*	Not measurable	3	5 ± 3*	Not measurable	3
+ EEZE	82 ± 2	7.2 ± 0.2	3	32 ± 4*†	6.4 ± 0.2*†	5
+ EEZE + $Ba^{2+}$ + Ouabain	Not tested	Not tested		6 ± 1*	Not measurable	3
+ 18 $\alpha$ -GA	83 ± 1%	7.6 ± 0.24	3	92 ± 1%	7.7 ± 0.2	3

Data are expressed as mean ± SEM. All solutions contained indomethacin (Indo, 10  $\mu$ M) and L-NNA (100  $\mu$ M), except in High external  $K^+$  (vessels were pre-contracted with 40 mM KCl-PSS in this condition only). \*:  $P < 0.05$  compared to L-NNA + Indo. †:  $P < 0.05$  compared to WT.



**Table 2.** Myogenic tone of the *gracilis* artery isolated from wild type and dyslipidemic (hApoB<sup>+/+</sup>) mice.

Experimental conditions	<i>Wild type</i>		<i>hApoB<sup>+/+</sup></i>	
	Tone (%)	<i>n</i>	Tone (%)	<i>n</i>
Control PSS	± 6	6	± 3	6
L-NNA + Indo	± 1	7	± 2	7
+ Apamin	± 1	6	± 7*†	6
+ Chtx	± 4	7	± 14*†	7
+ Apamin + Chtx	± 7*	7	± 12*	5
+ Ba <sup>2+</sup>	± 1*	6	± 14*†	6
+ Ouabain	± 14*	4	± 9*	7
+ Ba <sup>2+</sup> + Ouabain	± 7*	4	0 ± 1*†	6
+ 17-ODYA	± 9	4	± 10	6
+ EEZE	± 15	3	± 11*	5
+ 18α-GA	± 17	3	± 11*	3

Data are expressed as mean±SEM. All solutions contained indomethacin (Indo, 10 μM) and L-NNA (100 μM), except in Control PSS. \*: P<0.05 compared to L-NNA + Indo. †: P<0.05 compared to WT.

**Figure 1.**

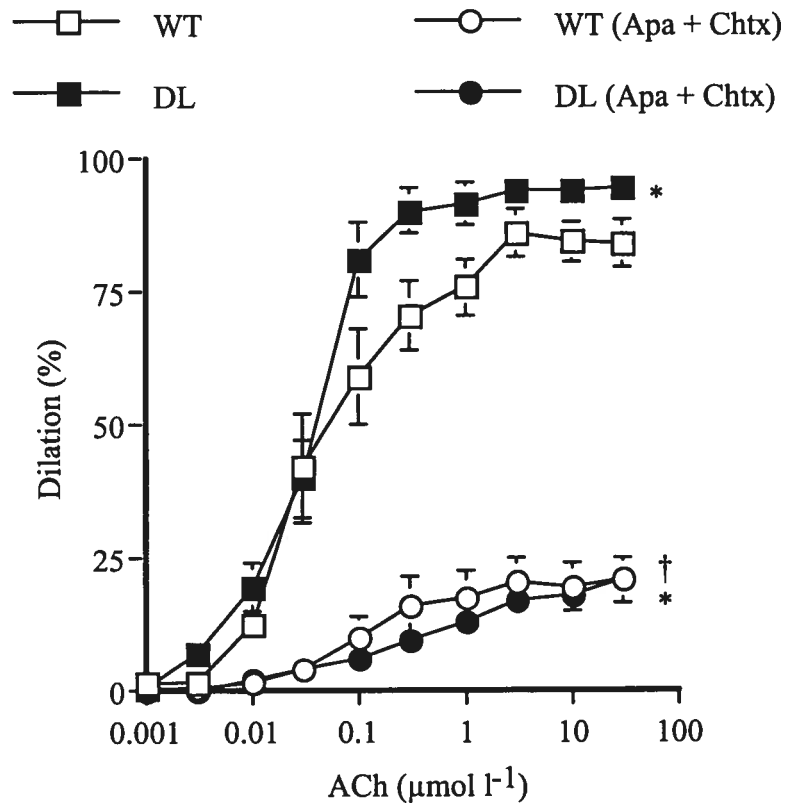


Figure 2.

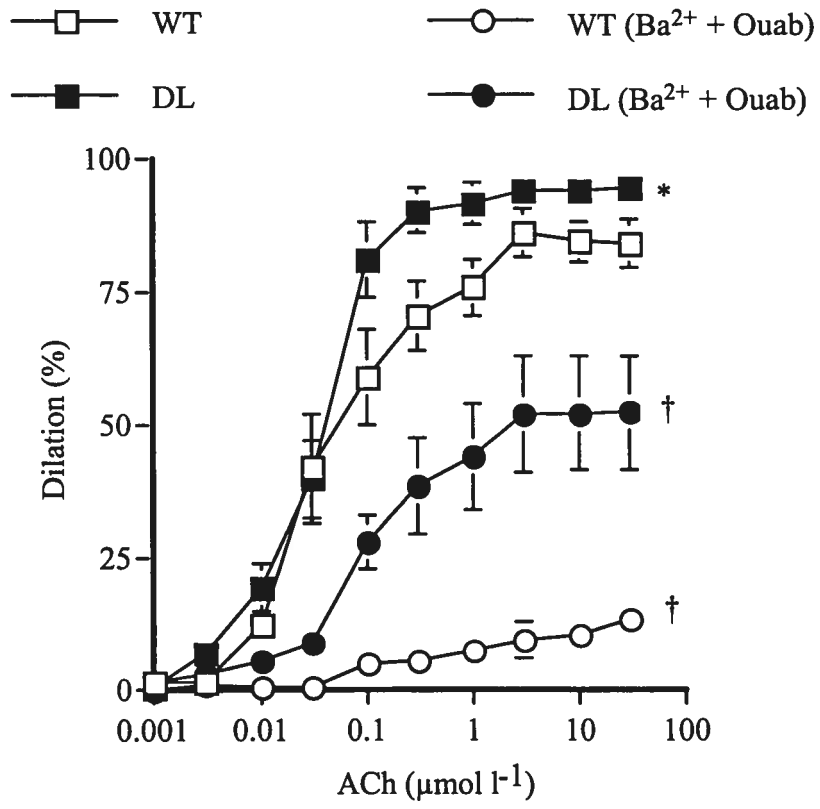
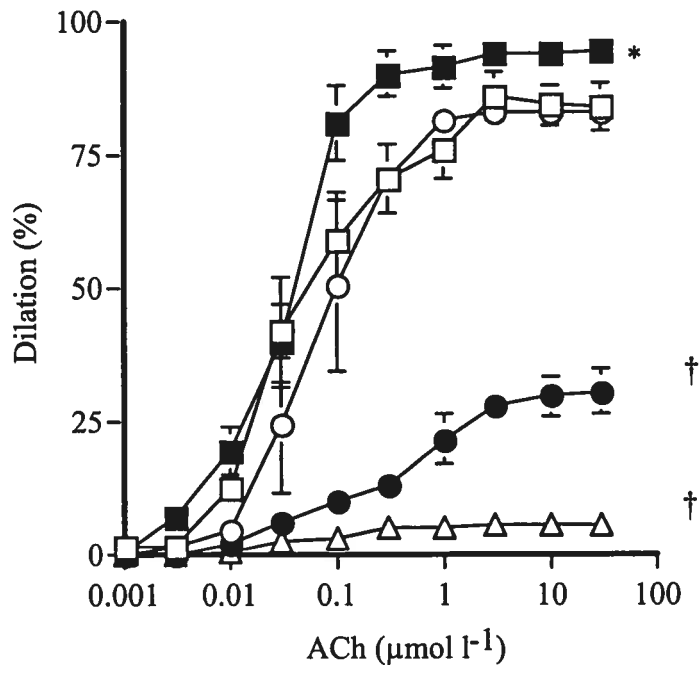
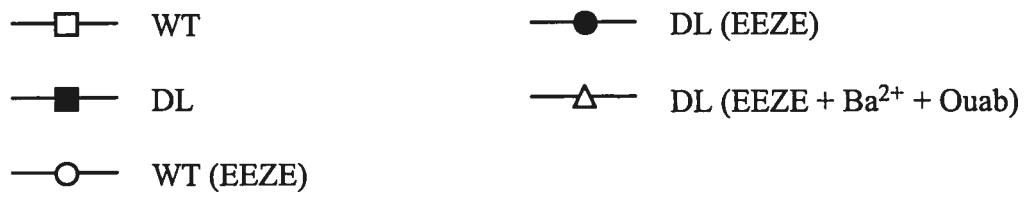


Figure 3.



**Figure 1.** Effect of combined addition of apamin (Apa; 1  $\mu$ M) and charybdotoxin (Chtx, 100 nM) on Ach-induced dilatation of *gracilis* arteries isolated from hApoB<sup>+/+</sup> (DL, n = 5) and WT (n = 7) mice. L-NNA (100  $\mu$ M) and indomethacin (10  $\mu$ M) were present in the bath. \*: P<0.05 compared to WT without Apamin and Chtx. †: P<0.05 compared to DL without Apamin and Chtx.

**Figure 2.** Effect of combined addition of Ba<sup>2+</sup> (30  $\mu$ M) and ouabain (Ouab, 1 mM) on Ach-induced dilatation of *gracilis* arteries isolated from hApoB<sup>+/+</sup> (DL, n = 6) and WT (n = 4) mice. L-NNA (100  $\mu$ M) and indomethacin (10  $\mu$ M) were present in the bath. \*: P<0.05 compared to WT without Ba<sup>2+</sup> and ouabain. †: P<0.05 compared to DL without Ba<sup>2+</sup> and ouabain.

**Figure 3.** Effect of EEZE (1  $\mu$ M) alone or with (n = 3) the combination of Ba<sup>2+</sup> (30  $\mu$ M) and ouabain (Ouab, 1 mM) on Ach-induced dilatation of *gracilis* arteries isolated from hApoB<sup>+/+</sup> (DL, n=6) and WT (n=4) mice. L-NNA (100  $\mu$ M) and indomethacin (10  $\mu$ M) were present in the bath. \*: P<0.05 compared to WT without EEZE. †: P<0.05 compared to DL without EEZE.

**4.2- Article #2: Age-associated decline in EDHF-dependent dilation of the *gracilis* artery is magnified by dyslipidemia in mice**

**Age-associated decline in EDHF-dependent dilation of the *gracilis* artery is magnified by dyslipidemia in mice**

Stéphane Krummen & Eric Thorin\*

Département de chirurgie et Groupe de Recherche sur le Système Nerveux  
Autonome, Université de Montréal, Institut de Cardiologie de Montréal, Montréal,  
Québec, Canada.

\* To whom correspondence should be addressed:

Institut de Cardiologie de Montréal, centre de recherche, 5000 rue Bélanger,  
Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada.

Tel.: (514) 376-3330;

fax.: (514) 376-1355;



Running title: EDHF in aging associated with dyslipidemia  
**Summary.**

1. The effects of dyslipidemia (DL) through maturation and old age on endothelium-derived hyperpolarising factor (EDHF) have not been studied. We isolated and pressurised (80 mm Hg) *gracilis* arterial segments isolated from 3, 12 and 20 month-old (m/o) DL mice expressing the human apolipoprotein B-100 and wild-type (WT) C57Bl6 mice. EDHF-dependent dilations to acetylcholine (ACh) were measured in the presence of L-NNA (100  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , NOS inhibitor) and indomethacin (INDO, 10  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , COX inhibitor). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.
3. Age-associated decline in EDHF-mediated maximal dilation in WT (from 86 $\pm$ 3% in 3, to 66 $\pm$ 8% in 12, and 48 $\pm$ 4% in 20 m/o,  $P < 0.05$ ) was magnified by DL, characterised by an early increased efficacy (95 $\pm$ 2%,  $P < 0.05$  compared to WT) and a worsening of the dysfunction at 20 m/o (26 $\pm$ 2%,  $P < 0.05$  compared to WT).
4. 17-octadecynoic acid (17-ODYA) reduced ( $P < 0.05$ ) to 42 $\pm$ 11% ACh-induced EDHF-dependent dilation in arteries isolated from 3 m/o DL mice only, an effect which disappeared in older DL mice. 17-ODYA, however, reduced ( $P < 0.05$ ) ACh-induced EDHF-dependent dilation in 12 (43 $\pm$ 6%) and 20 m/o (33 $\pm$ 2%) WT mice.
5. N-acetyl-L-cystein (NAC) had no impact on the dilation in WT arteries. In contrast, NAC restored EDHF responses in arteries isolated from 12 m/o DL mice (84 $\pm$ 3% from 57 $\pm$ 8%;  $P < 0.05$ ); 17-ODYA blocked this dilatory response revealed by NAC. NAC had no effect in arteries isolated from 20 m/o DL mice.
6. Our data demonstrate that the decline in EDHF-dependent dilation is hastened by DL despite an early compensation involving a 17-ODYA-sensitive pathway. Free radicals contribute to endothelial dysfunction in the presence of DL only, by abrogating this latter pathway, which appears in 12 m/o WT mice and remains active at 20 m/o. Hence, DL-associated free radical production induces an early irreversible damage to the endothelium.

**Key words:** Endothelium; *gracilis* artery; EDHF; aging; hypercholesterolemia; triglycerides; mouse.

**Abbreviations:** ACh, acetylcholine; Apa, apamin; Ba<sup>2+</sup>: barium; K<sub>Ca</sub>, Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel; Chtx, charybdotoxin; DL, dyslipidemia; EDHF, endothelium derived hyperpolarising factor; EETs, epoxyecosatrienoic acids; E<sub>max</sub>, maximal dilation; INDO, indomethacin; K<sub>IR</sub> : inward rectifier potassium channels; L-NNA, N $\omega$ -nitro-L-arginine; MT, myogenic tone; NAC, N-acetyl-l-cysteine; NO, nitric oxide; Ouab: ouabain; PE: phenylephrine; PGI<sub>2</sub>, prostacyclin; PSS, physiological salt solution; SNP, sodium nitroprusside; 17-ODYA: 17-octadecynoic acid.



## Introduction

The endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) cannot be defined as a single factor. Different candidates have been proposed as potential EDHFs and over the years,  $K^+$  ions, epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and direct electrical transfer through gap junctions have emerged as the most likely candidates (Edwards *et al.*, 1998; Brandes *et al.*, 2000). In the C57Bl6 mouse *gracilis* artery, EDHF-dependent dilations depend on the activation of endothelial small and intermediate conductance calcium-dependent potassium channels ( $SK_{Ca}$  and  $IK_{Ca}$ ), leading to the activation of the smooth muscle *via*  $Na^+/K^+$ -ATPase pump and, to a lesser extent,  $Ba^{2+}$ -sensitive potassium channels ( $K_{ir}$ ) activation (Krummen *et al.*, *submitted*).

While the multi-nature of EDHF is accepted, their mechanisms of action and sensitivity to the aging process and pathological conditions are still unknown. EDHF is the major contributor to endothelium-dependent dilations induced by agonists such as acetylcholine (ACh) and bradykinin in small arteries (Nagao *et al.*, 1992; Véquaud & Thorin, 2001). The dilatatory function of the endothelium is known to decline with age (Marin, 1995; Marin *et al.*, 1995; Gerhard *et al.*, 1996; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1998; Csiszar *et al.*, 2002). In most cases, this diminished endothelium-dependent dilation has been attributed to a diminished release, formation and/or increased degradation of NO or  $PGI_2$  (Mayhan *et al.*, 1990; van der Loo *et al.*, 2000; Woodman *et al.*, 2003), while it was reported that EDHF-dependent dilation declines in some arteries (Fujii *et al.*, 1993; Urakami-Harasawa *et al.*, 1997) but not others (Muller *et al.*, 2002). Previous studies on diabetes, hypertension, atherosclerosis and hypercholesterolemia likewise examined possible alterations in NO and  $PGI_2$  responses (Vanhoutte & Scott-Burden, 1994; Kolodgie *et al.*, 1990; Creager *et al.*, 1990; Flavahan, 1992; Najibi *et al.*, 1994; Brandes *et al.*, 1997). We recently reported that both the nature and the mechanisms of EDHF-induced dilations were modified in young DL compared to wild type (WT) C57Bl6 mouse *gracilis* arteries (Krummen *et al.*, *submitted*).

The objective of the present study was therefore to examine the effects of age on EDHF-induced dilations of DL mouse *gracilis* arteries. Our results suggest that a clinically relevant DL leads to a selective and faster reduction in EDHF-mediated dilation compared to the normal situation in WT despite the early

expression of an EDHF alternative pathway sensitive to 17-octadecynoic acid (17-ODYA). Oxidative stress appears to be central to this process in DL.

## Material and Methods.

### Vascular Preparation

The procedures and protocols were in accordance with our institutional guidelines and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* of Canada. Experiments were conducted on isolated *gracilis* arteries isolated from 3, 12 and 20 m/o DL mice expressing the human apolipoprotein B-100 (31±1g, 43±2g and 41±3g respectively; Sanan *et al.*, 1998) and their WT C57Bl6 control mice (27±1g, 45±1g and 53±4g, respectively) using a method previously described (Nguyen *et al.*, 1999). Total cholesterol (mg/dl) and triglyceride (mg/dl) was significantly ( $P<0.05$ ) elevated in DL (183±9 and 228±24, respectively; n=24) compared to WT mice (118±7 and 104±12, respectively; n=19). Mice were killed by CO<sub>2</sub> inhalation. The right or left *gracilis* artery was dissected and placed in ice-cold physiological salt solution (PSS) containing the following composition (mmol l<sup>-1</sup>): NaCl 130, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, MgSO<sub>4</sub> 1.17, NaHCO<sub>3</sub> 1.17, CaCl<sub>2</sub> 1.6, EDTA 0.023 and glucose 10, aerated with 12% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> / 83% N<sub>2</sub> (37°C, pH 7.4). All experiments were conducted on segments of 2 to 3 mm in length with an average internal diameter of 207±2 µm (WT) and 210±2 µm (DL) when pressurised at 80 mm Hg. An equilibration time of 45 min was allowed before every experiment.

### Experimental Protocols

Dilations to ACh (1 nmol l<sup>-1</sup> to 30 µmol l<sup>-1</sup>) were measured in vessels pre-contracted with phenylephrine (PE, 1 to 10 µmol l<sup>-1</sup>). Following pre-contraction, vessels isolated from 3, 12 and 20 m/o WT mice had average diameters of 54±3, 53±1 and 52±1 µm, respectively, and 52±3, 48±1 and 47±2 µm, respectively, for those isolated from DL mice. In the presence of certain pharmacological tools, vessels were constricted (reduction in resting diameter, see Table 2). In these conditions, the concentration of PE was reduced to 1 µmol l<sup>-1</sup> to reach a similar level of pre-contraction in all experimental conditions. In two conditions using Ba<sup>2+</sup> and ouabain, the myogenic tone was maximal (Table 2) and PE was not added.

When EDHF was studied, N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA, 100 µmol l<sup>-1</sup>) and indomethacin (INDO, 10 µmol l<sup>-1</sup>) were present in the bath chamber to prevent NO and prostanoid formation, respectively. Combined NO/PGI<sub>2</sub>-dependent dilations to

ACh were obtained in the presence of 40 mmol l<sup>-1</sup> KCl PSS and without addition of INDO and L-NNA. Depending on the channel, enzyme, or pump targeted, apamin (Apa, 1 μmol l<sup>-1</sup>), charybdotoxin (Chtx, 0.1 μmol l<sup>-1</sup>), iberiotoxin (0.1 μmol l<sup>-1</sup>), 17-octadecynoic acid (17-ODYA, 10 μmol l<sup>-1</sup>), barium (Ba<sup>2+</sup>, 30 μmol l<sup>-1</sup>), ouabain (1 mmol l<sup>-1</sup>) or N-acetyl-L-cysteine (NAC, 1 μmol l<sup>-1</sup>) were added to the bath 30 minutes before the start of the protocol.

### Statistical Analysis

In every case, *n* refers to the number of animals used in each protocol. Half-maximum effective concentration (EC<sub>50</sub>) of ACh was measured from each individual concentration-response curve using a logistic curve-fitting program (Microcal<sup>TM</sup>Origin<sup>TM</sup> version 5.0). The *p*D<sub>2</sub> value, the negative log of the EC<sub>50</sub>, was obtained. Continuous variables are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). For each protocol, basal diameter in no-flow condition was determined at the end of the 45 minutes equilibration period. Myogenic tone, which is a reduction in diameter induced by an increase in luminal pressure, was measured and expressed as percentage of the D<sub>max</sub>. ACh-induced dilation is expressed as a percentage of the pre-constriction. ANOVA were performed to compare concentration-response curves. Differences were considered to be statistically significant when the *P* value was <0.05 (Scheffe's *F* test).

### Drugs

Acetylcholine, apamin, INDO, L-NNA, phenylephrine, N-acetyl-L-cysteine, charybdotoxin, ouabain and 17-octadecynoic acid were purchased from Sigma. Barium was purchased from Mallinckrodt. All drugs were prepared daily and diluted in water except for INDO and 17-octadecynoic acid, which were prepared as stock solutions and diluted in ethanol. All drugs were then directly inserted in the bath chamber and the final concentration of ethanol never exceeded 0.1 %. Equimolar amounts of NaCl were replaced with KCl to prepare the 40 mmol l<sup>-1</sup> K<sup>+</sup>-PSS.

## Results

### EDHF in aging dyslipidemic mouse *gracilis* arteries

Non-NO / non-PGI<sub>2</sub>-induced dilations to ACh gradually decreased with increasing age (Fig. 1A, Table 1). This dysfunction was also evidenced in DL mouse *gracilis* arteries but with differences compared to WT (Fig. 1B, Table 1). First, in vessels isolated from 3 m/o DL mice, the efficacy of ACh was greater ( $P<0.05$ ) when compared to that measured in arteries isolated from WT mice. Second, the decrease in EDHF-dependent dilation was more pronounced ( $P<0.05$ ) at 20 m/o in arteries isolated from DL compared to WT mice.

### *Effect of aging and DL on the contribution of small (SK<sub>Ca</sub>) and intermediate (IK<sub>Ca</sub>) conductance calcium-dependant potassium channels in EDHF-dependent dilation to ACh*

Apamin (1  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ), a small conductance K<sub>Ca</sub> channel inhibitor, and charybdotoxin (0.1  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ), an intermediate conductance K<sub>Ca</sub> channel inhibitor, reduced by 75% the dilation induced by ACh in arteries isolated from 3 m/o WT and DL mice (Table 1). At 12 m/o, however, apamin and charybdotoxin reduced the dilation by 30% only in vessels from WT mice whereas at 20 months of age, the dilation was prevented by 75%. In DL mice, the combination of the two toxins prevented EDHF-dependent dilation induced by ACh at 12 and 20 m/o (Table 1).

### *Effect of aging and DL on the involvement of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump and K<sub>ir</sub> channels in EDHF-dependent dilation to ACh*

Ouabain alone (1  $\text{mmol l}^{-1}$ ), a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump inhibitor, strongly reduced ( $P<0.05$ ) ACh-induced dilation in arteries isolated from WT mice at all ages (Fig 1C, Table 1). Addition of Ba<sup>2+</sup> (30  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ), a K<sub>ir</sub> channel inhibitor, to ouabain, had no effects in arteries isolated from WT mice (data not shown).

In contrast, EDHF-induced dilation of *gracilis* arterial segments isolated from 3 month-old DL mice was insensitive to ouabain (Fig. 1D, Table 1); At 12 and 20 months of age, however, ouabain strongly reduced ( $P<0.05$ ) ACh-induced EDHF-dependent dilation ( $26 \pm 6\%$  and  $2 \pm 1\%$ , respectively) (Fig. 1D, Table 1). Addition of Ba<sup>2+</sup> (30  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) to ouabain reduced ( $P<0.05$ ) EDHF-dependent

maximal dilation from  $95 \pm 2\%$  to  $54 \pm 11\%$  in arteries from 3 month-old DL mice but did not further reduce dilations induced by EDHF in arteries from 12 month-old mice ( $26 \pm 9\%$ ).  $Ba^{2+}$  / ouabain experiments were not conducted in arteries from 20 month-old mice since ouabain alone completely prevented ACh-induced EDHF-dependent dilations (Fig. 1D, Table 1).

#### Effect of aging and DL on cytochrome P450 involvement in EDHF-dependent dilation to ACh

In arteries isolated from 3 month-old WT mice, 17-ODYA, a cytochrome P450/epoxygenase enzyme inhibitor, had no impact on the dilation triggered by ACh (Fig 1E, Table 1). In vessels isolated from 12 and 20 month-old WT mice, however, 17-ODYA reduced ( $P < 0.05$ ) ACh-induced EDHF-dependent dilation (Fig 1E, Table 1).

17-ODYA ( $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) reduced ( $P < 0.05$ ) EDHF-dependent maximal dilations to  $42 \pm 11\%$  in arteries isolated from 3 month-old DL mice (Fig. 1F, Table 1). The inhibitory effect of 17-ODYA was lost in arteries isolated from 12 and 20 month-old DL mice (Fig. 1F, Table 1).

#### Effect of NAC on EDHF-dependent dilation to ACh in aging and DL

N-acetyl-L-cystein (NAC;  $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), a free radical scavenger, did not affect EDHF-induced dilations of vessels isolated from WT mice. Similarly, NAC did not affect the dilation to ACh of arterial segments isolated from 3 month-old DL mice. At 12 m/o however, NAC restored ( $P < 0.05$ ) ACh-induced EDHF-dependent dilation of the DL mouse *gracilis* artery ( $84 \pm 3\%$ ; Fig. 2, Table 1). No effect of NAC could be observed at 20 months of age (Table 1).

In arteries isolated from 12 m/o DL mice, the combination of 17-ODYA ( $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) and NAC abolished ( $P < 0.05$ ) the reversal beneficial effect of NAC alone on EDHF-dependent dilations (Fig. 2, Table 1). NAC, 17-ODYA and ouabain, added together, completely abolished ( $P < 0.05$ ) EDHF-dependent dilations of arteries isolated from 12 month-old DL mice.

### *NO and PGI<sub>2</sub> dilations*

NO/PGI<sub>2</sub>-induced dilations to ACh, revealed on a pre-constriction induced by a 40 mmol l<sup>-1</sup> KCl-PSS, were 50% less potent than EDHF-induced dilations (Table 1). NO/PGI<sub>2</sub>-induced dilations were also less affected by aging and DL than EDHF-dependent dilations. NO/PGI<sub>2</sub>-induced maximal dilations were reduced ( $P < 0.05$ ) to  $30 \pm 5\%$  at 12 months of age but were then maintained in arteries of 20 month-old mice (Table 1). The vascular sensitivity to ACh-induced NO/PGI<sub>2</sub>-dependent dilation was not affected by age in DL mice (Table 1).

## Discussion.

This paper is the second part of a two-fold study on the effects of DL alone (Krummen *et al.*, *submitted*) or associated with the aging process (this work) on the nature, efficacy and mechanisms of EDHF-dependent dilation to ACh of the mouse *gracilis* artery. EDHF-dependent dilatory responses were observed in the presence of NOS and COX inhibitors such as L-NNA and INDO as previously reported (Adeagbo & Triggle, 1993; Brandes *et al.*, 2000; Véquaud & Thorin, 2001). In small resistance arteries such as the *gracilis* artery, the EDHF component was highly sensitive to DL-associated oxidative stress, which was incremental with age. At 3 months, however, ACh-induced dilation is magnified by DL due to an early overcompensation of the EDHF pathway. This is in agreement with previously published data in hypercholesterolemic rabbits (Najibi *et al.*, 1994).

The results of this study suggest that aging associated with DL impaired EDHF-induced dilations to ACh. This loss of efficacy of EDHF-induced dilation with advancing age was more pronounced in DL mouse *gracilis* arteries than in WT mice. Aging by itself has been reported to reduce EDHF-dependent dilation (Fujii *et al.*, 1993; Urakami-Harasawa *et al.*, 1997; Froese *et al.*, 1999). The results of the present study suggest that DL accelerates the age-dependent impairment of EDHF-dependent dilations. As we previously demonstrated, the nature and pathways of EDHF are modified by DL in 3 m/o mouse *gracilis* arteries (Krummen *et al.*, *submitted*). In *gracilis* arteries isolated from young WT mice, EDHF is dependent on endothelial SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> channels activation; this activates the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pumps. In young DL mouse *gracilis* arteries, this mechanism is still functional, but an arachidonic acid metabolite formed by a cytochrome P450/epoxygenase enzyme sensitive to 17-ODYA also significantly contributes to EDHF-dependent dilation.

One important finding of this study is that in arteries isolated from 12 and 20 m/o mice, the inhibitory effect of 17-ODYA was lost. NAC however, restored the 17-ODYA-sensitive component of ACh-induced EDHF-dependent dilation at 12 but no longer at 20 months of age. Thus, the damages induced by DL-associated free radical production were reversible at 12 months of age, to become permanent at 20 months. These damages can be attributed to DL since in WT mice, the endothelial dysfunction that developed with age was 1) less dramatic and 2)



insensitive to NAC. Therefore, the EDHF component of the endothelium-dependent dilation induced by ACh is sensitive to oxidative stress.

Acetylcholine-induced NO/PGI<sub>2</sub>-dependent dilations were also reduced with age in DL mouse *gracilis* arteries. This effect, however, was not different from the reduction induced by age alone in WT mice. This suggests that in aging mice, DL does not target the NO/PGI<sub>2</sub> pathways in *gracilis* artery.

In all groups, a combination of apamin and charybdotoxin, inhibitors of SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> channels, respectively, reduced EDHF-induced dilations. This is in agreement with our own previous data (Krummen *et al.*, *submitted*; Gendron *et al.*, 2004) and other studies (Beny & Schaad 2000; Edwards *et al.* 1998; Eichler *et al.*, 2003). Our experimental conditions are favourable to reveal EDHF mechanisms since pressurised arteries are depolarised ( -40 to -45 mV) and develop myogenic tone (Potocnik *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2003). This myogenic tone is sensitive to Ca<sup>2+</sup> channel blockers, strengthening the importance of membrane potential in the regulation of the tone of pressurised arteries (Brayden & Nelson, 1992; Taylor *et al.*, 2003). It has been reported that SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> channels were responsible for the augmentation of [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> in the myo-endothelial space (Edwards *et al.*, 1998). Such an increase in [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> is suggested to have two effects: first, it activates the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump, hyperpolarising the smooth muscle cells. This is supported by the inhibitory effects of ouabain, an inhibitor of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, which reduced EDHF-induced dilations in 12 and 20 m/o mice *gracilis* arteries. Ouabain, however failed to have an effect in arteries isolated from 3 m/o DL mice although it did increase myogenic tone. The addition of Ba<sup>2+</sup>, an inhibitor of K<sub>r</sub> channels, to ouabain reduced EDHF-induced dilations by half in 3 m/o arteries but had no effect in 12 m/o arteries. The lack of effect of ouabain in 3 m/o arteries of DL mice suggests that activation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump is not sufficient to induce smooth muscle hyperpolarisation (Krummen *et al.*, *submitted*).

This leads to the second consequence of an increased SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> channel activity — also revealed in baseline conditions by the rise in myogenic tone induced by the treatment with apamin and charybdotoxin — and thus of the endothelial hyperpolarisation, which is a likely to rise intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in the endothelium (Beny & Schaad, 2000; Edwards *et al.*, 1998). This led us to hypothesise that a secondary pathway, sensitive to Ca<sup>2+</sup>, could be involved. 17-

ODYA, a cytochrome P450/epoxygenase inhibitor, reduced by more than half ACh-induced EDHF-dependent dilation of arteries isolated from in 3 m/o DL mice, whereas 17-ODYA failed to have any effects in vessels isolated from 3 m/o WT mice. These results suggest therefore that an arachidonic acid metabolite of cytochrome P450/epoxygenase activity is an EDHF in 3 m/o DL mice *gracilis* artery. We previously reported that EETs accounted for this dilatory activity (Krummen *et al.*, *submitted*). EETs account for EDHF in different species (Campbell *et al.*, 1996; Baron *et al.*, 1997; Fisslthaler *et al.*, 1999; Brandes *et al.*, 2000; Archer *et al.*, 2003). EETs have been shown to hyperpolarise smooth muscle cells by activating BK<sub>Ca</sub> channels (Campbell *et al.*, 1996; Baron *et al.*, 1997). In our hands, however, iberiotoxin, a specific BK<sub>Ca</sub> channel inhibitor, failed to mimic the effects of 17-ODYA and to prevent EDHF-induced dilation to ACh. EETs have been shown to have other vascular effects such as an augmentation of gap junctional communications by a protein kinase C-dependent mechanism (Popp *et al.*, 2002) and an augmentation of the open probability of endothelial calcium channels (Watanabe *et al.*, 2003). The mechanism of action of the arachidonic metabolite produced by cytochrome P450/epoxygenase enzymes in the *gracilis* artery remains, therefore, to be found.

At 12 months of age in DL mice, 17-ODYA failed to reduce EDHF-induced dilation to ACh. This led us to envisage that the loss of this mechanism could originate from an increased oxidative stress. Indeed, acute exposure to NAC (free radical scavenger) restored the dilatory response mediated by EDHF in 12 m/o arteries. In addition, the recovered response was sensitive to 17-ODYA confirming that the arachidonic acid pathway present at 3 m/o was 1) still present at 12 m/o, and 2) was highly sensitive to oxidative stress. In the presence of NAC, ACh-induced EDHF-dependent dilation of arteries isolated from 12 m/o mice was blocked by a combination of 17-ODYA and ouabain, thus revealing the importance of both Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and cytochrome P450 metabolites. Oxidative stress is also augmented in hypercholesterolemia (Ohara *et al.*, 1997). It has also been shown that oxidized low-density lipoproteins (LDLs) exhaust the natural antioxidant protections favouring the formation of reactive oxygen species (Adams *et al.*, 2000). In *gracilis* arteries isolated from 20 m/o DL mice, NAC failed to restore the

dilation induced by ACh, suggesting the development of an irreversible endothelial dysfunction.

It is interesting that although the pathways do not seem to be exactly the same in DL and healthy conditions, aging similarly altered the mechanism of action of EDHF in both DL and WT mice. The cytochrome P450 pathway was up-regulated at 3 months of age in DL mice, whereas it was up-regulated at 12 months of age in the WT mouse *gracilis* artery. This pathway, however, also contributed to the EDHF-dependent dilation in vessels isolated from 20 month-old WT mice. Thus, the cytochrome P450 pathway is highly sensitive to oxidative stress as recently reported (Miura & Guttermann, 2004). The demonstration that 1) this pathway is up-regulated early in DL and impaired at 20 months of age due to excess oxidative stress, and 2) that it is up-regulated only 6 months later in WT mice and remains active at 20 months whereas NAC has no effects in WT mice, suggest that this pathway is compensatory and demonstrate the pre-eminence of oxidative stress in the presence of DL. Hence, DL, a risk factor for cardiovascular diseases, accelerated the functional aging of the endothelium leading to an early endothelial dysfunction by targeting the EDHF pathways.

Indeed, aging affected NO/PGI<sub>2</sub>-dependent dilation similarly whether arteries were isolated from WT or DL mice. Although this age-dependent endothelial dysfunction is well established (Gerhard *et al.*, 1996; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1998; Woodman *et al.*, 2003), we could not reveal an acute effect of NAC. This is different from a previous study in which the impaired dysfunction could be restored by acute exposure to a SOD mimetic (Csiszar *et al.*, 2002). In this latter study, flow-mediated dilations were impaired. The difference in stimulus is likely to explain this discrepancy since NO is the sole responsible of flow-mediated responses. Yet, there is no doubt that oxidative stress increases with age (van der Loo *et al.*, 2000; Csiszar *et al.*, 2002) but not acutely functionally detectable in our model.

In conclusion, a 17-ODYA-sensitive metabolite of the cytochrome P450/epoxygenase pathway and K<sub>Ca</sub> channels are responsible for ACh-induced EDHF-dependent dilation of the DL mouse *gracilis* artery. At 12 m/o, DL targets the 17-ODYA-sensitive component of the dilation mediated by ACh, as revealed by the rescue of this dilation by NAC, whereas this 17-ODYA-sensitive mechanism

appears in 12 m/o WT mice. Free radical production was therefore responsible for this early — but reversible — endothelial dysfunction in DL mice. At 20 months of age, NAC no longer rescued the dilation suggestive of an irreversible damage to the endothelium. Hence, the 17-ODYA-dependent dilation is a secondary endothelium-dependent dilatory mechanism recruited early in the presence of a risk factor for cardiovascular diseases such as DL and latter in life during the normal aging process. This time-dependent evolution of the endothelial function suggests that there is a therapeutic window for the prevention of the endothelial dysfunction associated with DL. Because of the sensitivity of EDHF to oxidative stress, anti-oxidant therapeutic agents may be of use in the early phases of DL and later in life to prevent the deterioration of the endothelial dysfunction, although the impact of oxidative stress to age-associated endothelial dysfunction needs further exploration.

### **Acknowledgements**

This work has been supported in part by the Foundation of the Montreal Heart Institute, the Heart and Stroke Foundation of Quebec and the Canadian Institute for Health Research (MOP14496). E. Thorin is a scholar of the Heart and Stroke Foundation of Canada.

## References

- ADAMS M.R., KINLAY S., BLAKE G.J., ORFORD J.L., GANZ P., SELWYN A.P. (2000). Atherogenic lipids and endothelial dysfunction: mechanisms in the genesis of ischemic syndromes. *Annu. Rev. Med.*, **51**, 149-167.
- ADEAGBO, A.S.O. & TRIGGLE, C.R. (1993). Varying extracellular  $[K^+]$ : a functional approach to separating EDHF- and EDNO related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **21**, 423-429.
- ARCHER, S.L., GRAGASIN, F.S., WU, X., WANG, S., McMURTRY, S., KIM, D.H., PLATONOV, M., KOSHAL, A., HASHIMOTO, K., CAMPBELL, W.B., FALCK, J.R. & MICHELAKIS, E.D. (2003). Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK(Ca) channels. *Circulation*, **107**, 769-776.
- BARON, A., FRIEDEN, M. & BENY, J.L. (1997). Epoxyeicosatrienoic acids activate a high-conductance,  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channel on pig coronary artery endothelial cells. *J. Physiol.*, **504**, 537-543.
- BENY, J.L. & SCHAAD, O. (2000). An evaluation of potassium ions as endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.*, **131**, 965-973.
- BRANDES, R.P., BEHRA, A., LEBHERZ, C., BOGER, R.H., BODE-BOGER, S.M., PHIVTHONG-NGAM, L. & MUGGE, A. (1997). N(G)-nitro-L-arginine- and indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the rabbit renal artery: effect of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **135**, 49-55.
- BRANDES, R.P., SCHMITZ-WINNENTHAL, F.H., FELETOU, M., GODECKE, A., HUANG, P.L., VANHOUTTE, P.M., FLEMING, I. & BUSSE, R. (2000). An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 9747-9752.
- BRAYDEN, J.E. & NELSON, M.T. (1992). Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science*, **256**, 532-535.

- CAMPBELL, W.B., GEBREMEDHIN, D., PRATT, P.F. & HARDER, D.R. (1996). Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ. Res.*, **78**, 415-423.
- CREAGER M.A., COOKE J.P., MENDELSON M.E. (1990). Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J. Clin. Invest.*, **86**, 228-234.
- CSISZAR, A., UNGVARI, Z., EDWARDS, J.G., KAMINSKI, P., WOLIN, M.S., KOLLER, A., & KALEY, G. (2002). Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ. Res.*, **90**, 1159-1166.
- EDWARDS, G., DORA, K.A., GARDENER, M.J., GARLAND, C.J. & WESTON, A.H. (1998).  $K^+$  is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*, **396**, 269-272.
- EICHLER I., WIBAWA J., GRGIC I., KNORR A., BRAKEMEIER S., PRIES A.R., HOYER J. KOHLER R. (2003) Selective blockade of endothelial  $Ca^{2+}$ -activated small- and intermediate-conductance  $K^+$ -channels suppresses EDHF-mediated vasodilation. *Br. J. Pharmacol.*, **138**, 594-601.
- FISLTHALER, B., POPP, R., KISS, L., POTENTE, M., HARDER, D.R., FLEMING, I. & BUSSE, R. (1999). Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*, **401**, 493-497.
- FROESE D.E., MCMASTER J., MAN R.Y., CHOY P.C., KROEGER E.A. (1999). Inhibition of endothelium-dependent vascular relaxation by lysophosphatidylcholine: impact of lysophosphatidylcholine on mechanisms involving endothelium-derived nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Mol. Cell. Biochem.*, **197**, 1-6.
- FUJII K., OHMORI S., TOMINAGA M., ABE I., TAKATA Y., OHYA Y., KOBAYASHI K., FUJISHIMA M. (1993) Age-related changes in endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery. *Am. J. Physiol.*, **265**, 509-516.
- FLAVAHAN N.A. (1992). Atherosclerosis of lipoprotein-induced endothelial dysfunction: potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation*, **85**, 1927-1938.
- GENDRON, ME, THORIN, E. & PERRAULT, L.P. (2004). Loss of endothelial  $K_{ATP}$  channel-dependent, NO-mediated dilation of endocardial resistance

- coronary arteries in pigs with left ventricular hypertrophy. *Br. J. Pharmacol.*, **143**, 285-291.
- GERHARD, M., RODDY, M-A., CREAGER, S.J. & CREAGER, M.A. (1996). Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of human. *Hypertension*, **27**, 849-853.
- KOLOUDGIE F.D., VIRMANI R., RICE H.E. (1990). Vascular reactivity during the pro-gresssion of atherosclerotic plaque. A study of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circ. Res.*, **66**, 1112-1126.
- KRUMMEN, S. & THORIN, E. Two pathways account for EDHF-dependent dilation in the *gracilis* artery of hypercholesterolemic hApoB<sup>+/+</sup> mice. *Br. J. Pharmacol.*, submitted.
- MIURA, H. & GUTTERMAN, D.D. (2004). Interaction of two distinct endothelium-derived hyperpolarizing factors in the human coronary circulation. *Circulation*, **110(17)**, III-181 (abstract #861).
- NAGAO T., ILLIANO S.C., VANHOUTTE P.M. (1992) Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the arterial tree of the rat. *Am. J. Physiol.*, **263**, 1090-1094.
- NAJIBI, S., COWAN, C.L., PALACINO, J.J. & COHEN, R.A. (1994). Enhanced role of potassium channels in relaxations to acetylcholine in hypercholesterolemic rabbit carotid artery. *Am. J. Physiol.*, **266**, H2061-H2067.
- OHARA Y., PETERSON T.E., HARRISON D.G. (1993). Hypercholesterolemic increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.*, **92**, 2546-2551.
- POPP, R., BRANDES, R.P., OTT, G., BUSSE, R. & FLEMING, I. (2002). Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Circ. Res.*, **90**, 800-806.
- POTOCNIK, S.J., MURPHY, T.V., KOTECHA, N. & HILL, M.A. (2000). Effects of mibefradil and nifedipine on arteriolar myogenic responsiveness and intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Br. J. Pharmacol.*, **131**, 1065-1072.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, M.A., ALONSO, M.J., REDONDO, J., SALAICES, M. & MARIN, J. (1998). Role of lipid peroxidation and the glutathione-dependent antioxydant system in the impairment of endothelium-dependent vasodilations with age. *Br. J. Pharmacol.*, **123**, 113-121.



- SAMIEC, P.S., DREWS-BOTSCH, C., FLAGG, E.W., KURTZ, J.C., STERNBERG, P., REED, R.L. & JONES, D.P. (1998). Glutathione in human plasma: Decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 699-704.
- SANAN, D.A., NEWLAND, D.L., TAO, R., MARCOVINA, S., WANG, J., MOOSER, V., HAMMER, R.E. & HOBBS, H.H. (1998). Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 4544-4549.
- TAYLOR, M.S., BONEV, A.D., GROSS, T.P., ECKMAN, D.M., BRAYDEN, J.E., BOND, C.T., ADELMAN, J.P. & NELSON, M.T. (2003). Altered expression of small-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure. *Circ. Res.*, **93**, 124-131.
- URAKAMI-HARASAWA L., SHIMOKAWA H., NAKASHIMA M., EGASHIRA K., TAKESHITA A. (1997) Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J. Clin. Invest.*, **100**, 2793-2799.
- VAN DER LOO, B., LABUGGER, R., SKEPPER, J.N., BACHSCHMID, M., KILO, J., POWELL, J.M., PALACIOS-CALLENDER, M., ERUSALIMSKY, J.D., QUASCHNING, T., MALINSKI, T., GYGI, D., ULLRICH, V. & LUSCHER, T.F. (2000). Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J. Exp. Med.*, **192**, 1731-1744.
- VANHOUTTE P.M., SCOTT-BURDEN T. (1994). The endothelium in health and disease. *Texas. Heart. Inst. J.*, **21**, 62-67.
- VÉQUAUD, P. & THORIN, E. (2001). Endothelial G protein beta-subunits trigger nitric oxide-but not endothelium-derived hyperpolarizing factor-dependent dilation in rabbit resistance arteries. *Circ. Res.*, **89**, 716-722.
- WATANABE, H., VRIENS, J., PRENEN, J., DROOGMANS, G., VOETS, T. & NILIUS, B. (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels 434. *Nature*, **424**, 434-438.
- WOODMAN, C.R., PRICE, E.M. & LAUGHLIN, M.H. (2003). Selected contribution: Aging impairs nitric oxide and prostacyclin mediation of endothelium-dependent dilation in soleus feed arteries. *J. Appl. Physiol.*, **95**, 2164-2170.

**Table 1.** Efficacy ( $E_{\max}$ ) and sensibility ( $pD_2$ ) to acetylcholine of the *gracilis* artery isolated from 3, 12 and 20 m/o WT and DL mice.

Condi-tions	Age											
	3 m/o WT		12 m/o WT		20 m/o WT		3 m/o DL		12 m/o DL		20 m/o DL	
	$pD_2$	$E_{\max}$	$pD_2$	$E_{\max}$	$pD_2$	$E_{\max}$	$pD_2$	$E_{\max}$	$pD_2$	$E_{\max}$	$pD_2$	$E_{\max}$
40mmol l <sup>-1</sup>	7.7±0.1	48±4* (6)	7.9±0.2*	30±5*† (6)	5.2±0.1*††	26±2*† (5)	7.6±0.3	46±4* (6)	7.8±0.1*	30±5† (8)	6.9±0.5	24±5* (4)
KCL-PSS												
INDO + L-NNA	7.4±0.2	86±3 (7)	6.9±0.2	66±8† (6)	5.7±0.1††	48±4†† (5)	7.4±0.1†	95±2¶ (7)	6.3±0.1†	57±8† (8)	6.3±0.1†	26±2††¶ (5)
+ Apamin + Chtx	6.8±0.2	22±4* (7)	7.2±0.1	46±2*† (6)	ND	12±3*† (3)	6.0±0.4*	25±5* (5)	ND	8±2*† (4)	ND	2±1*††¶ (5)
+ 17-ODYA	7.6±0.4	89±5 (4)	7.2±0.2	43±6*† (7)	5.4±0.2††	33±2*†† (3)	7.2±0.3	42±11* (6)	5.7±0.2*†	57±9 (6)	5.4±0.5††	23±3†† (5)
+ Ouabain	6.2±0.6*	19±7* (4)	7.2±0.2	22±5* (6)	6.3±0.3†	10±1*†† (3)	6.9±0.2	75±10 (7)	5.9±1.0	26±6*† (4)	ND	2±1*††¶ (7)

Data are expressed as mean±SEM. All solutions contained INDO (10 μmol l<sup>-1</sup>) and L-NNA (100 μmol l<sup>-1</sup>) and vessels were pre-constricted with PE except in the presence of 40 mmol l<sup>-1</sup> KCl-PSS (no INDO+L-NNA and no PE). \*: P<0.05 compared to 3 m/o. †: P<0.05 compared to 12 m/o. ††: P<0.05 compared to 20 m/o. ¶: P<0.05 compared to 3 m/o. ‡: P<0.05 compared to 12 m/o. §: P<0.05 compared to WT. ND : not determined.

**Table 2.** Myogenic tone of the *gracilis* artery isolated from 3, 12 and 20 m/o WT and DL mice.

Conditions	WT			DL		
	3 m/o	12 m/o	20 m/o	3 m/o	12 m/o	20 m/o
Control conditions	14±6 (6)	32±6† (6)	22±7 (5)	6±3 (6)	27±8 (8)	30±11† (5)
INDO + L-NNA	7±1 (7)	29±6† (6)	19±6 (5)	6±2 (7)	28±8† (6)	31±10† (5)
+ Apamin + Chtx	26±7* (7)	57±6*† (6)	36±16 (3)	30±12* (5)	74±10*† (4)	77±6*† (4)
+ 17-ODYA	23±9 (4)	28±6 (7)	33±16 (3)	15±10 (6)	45±11 (6)	55±8† (5)
+ Ouabain	55±14* (4)	55±11* (6)	36±28 (3)	72±9* (7)	70±5* (6)	63±3* (4)

Data are expressed as mean±SEM. All solutions contained INDO (10 µmol l<sup>-1</sup>) and L-NNA (100 µmol l<sup>-1</sup>) except in control conditions. \*: P<0.05 compared to INDO + L-NNA. †: P<0.05 compared to 3 m/o.

**Figure 1.**

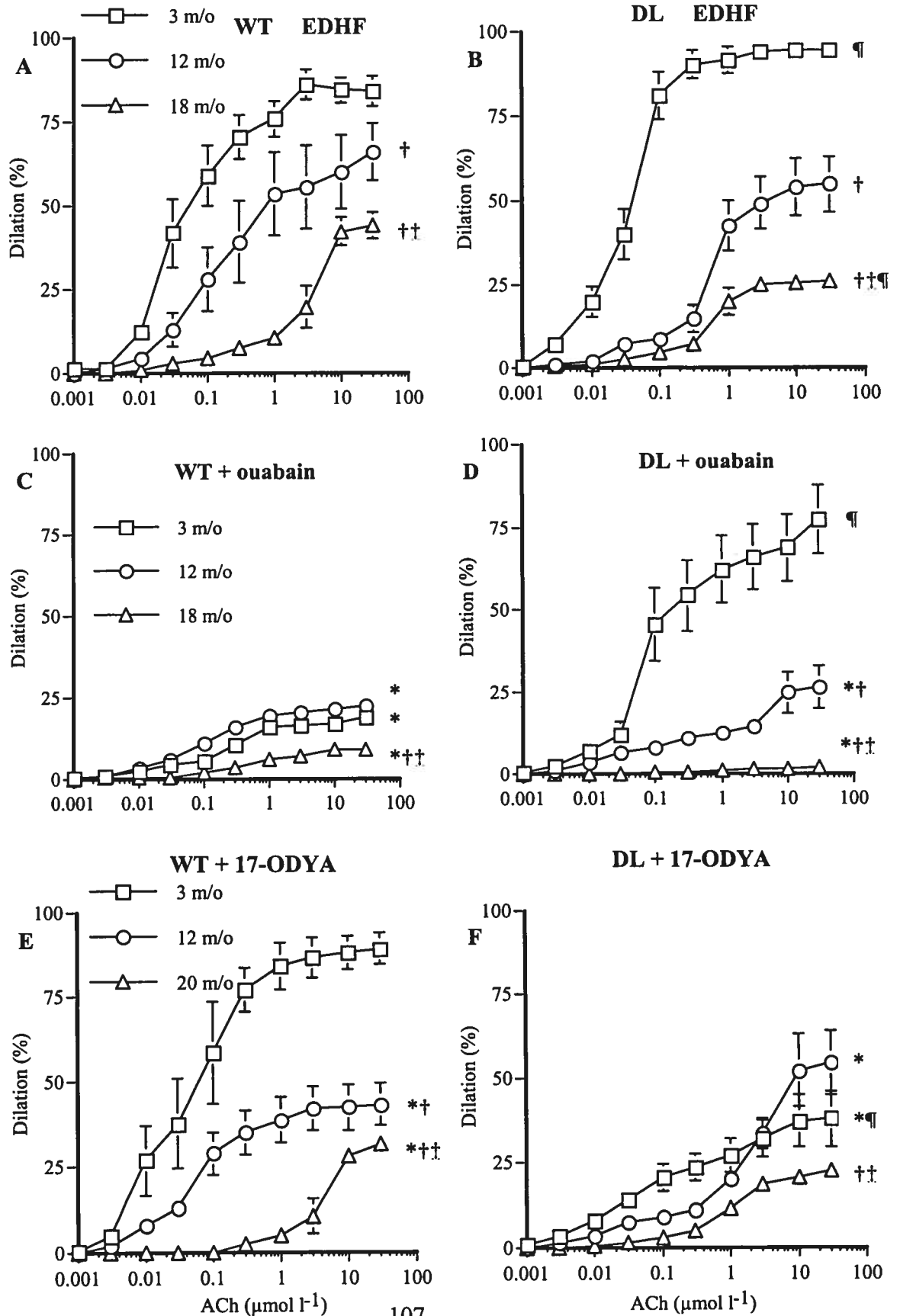
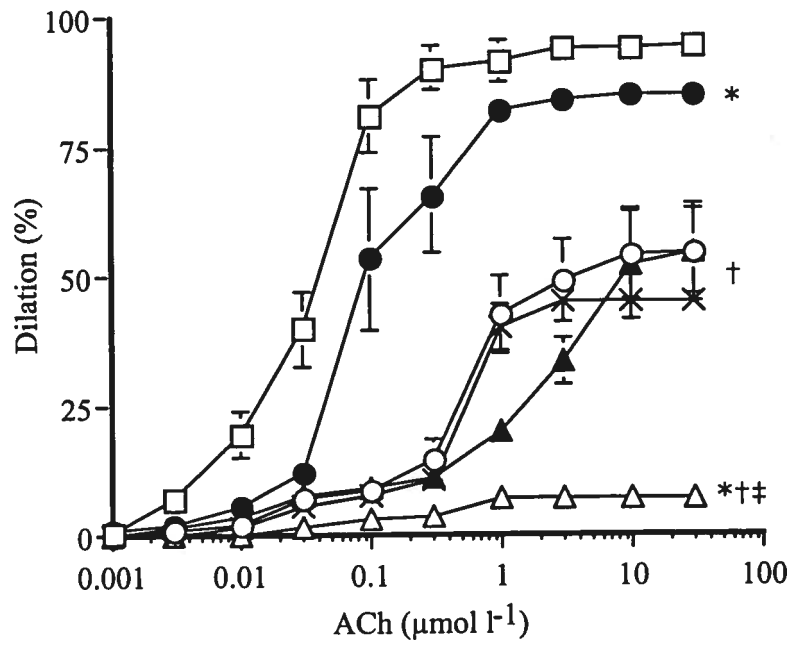
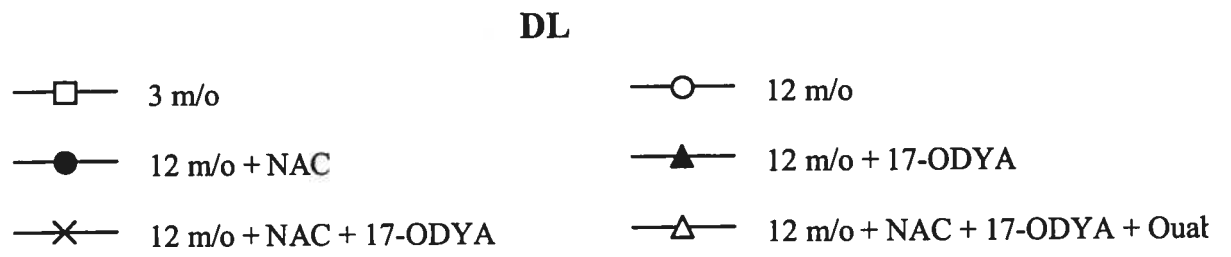


Figure 2.



**Figure 1.** Acetylcholine-induced dilation of *gracilis* arteries isolated from 3, 12 and 20 m/o WT (left panels) and DL (right panels) mice. (A and B) In control conditions (n = 7, 8 and 5, respectively), (C and D) in the presence of ouabain (1 mmol l<sup>-1</sup>; n = 7, 6 and 4, respectively), and (E and F) in the presence of 17-ODYA (10 μmol l<sup>-1</sup>; n = 6, 6 and 5 respectively). L-NNA (100 μmol l<sup>-1</sup>) and INDO (10 μmol l<sup>-1</sup>) were present in the bath. \*: P<0.05 compared to EDHF (A or B); †: P<0.05 compared to 3 m/o; ‡ : P<0.05 compared to 12 m/o; ¶ : P<0.05 compared to WT, same age and experimental conditions.

**Figure 2.** Acetylcholine-induced dilation of *gracilis* arteries isolated of 3 and 12 m/o DL mice (n=7 and 8 respectively). In arteries isolated from 12 m/o mice, the effects of N-Acetyl-L-Cystein (NAC; 1 μmol l<sup>-1</sup>) alone (n = 6), NAC plus 17-ODYA (10 μmol l<sup>-1</sup>, n = 6) and NAC plus 17-ODYA and ouabain (1 mmol l<sup>-1</sup>, n = 6) are reported. L-NNA (100 μmol l<sup>-1</sup>) and INDO (10 μmol l<sup>-1</sup>) were present in the bath. \*: P<0.05 compared to 3 m/o; †: P<0.05 compared to 12 m/o NAC. ‡: P<0.05 compared to 12 m/o 17-ODYA.

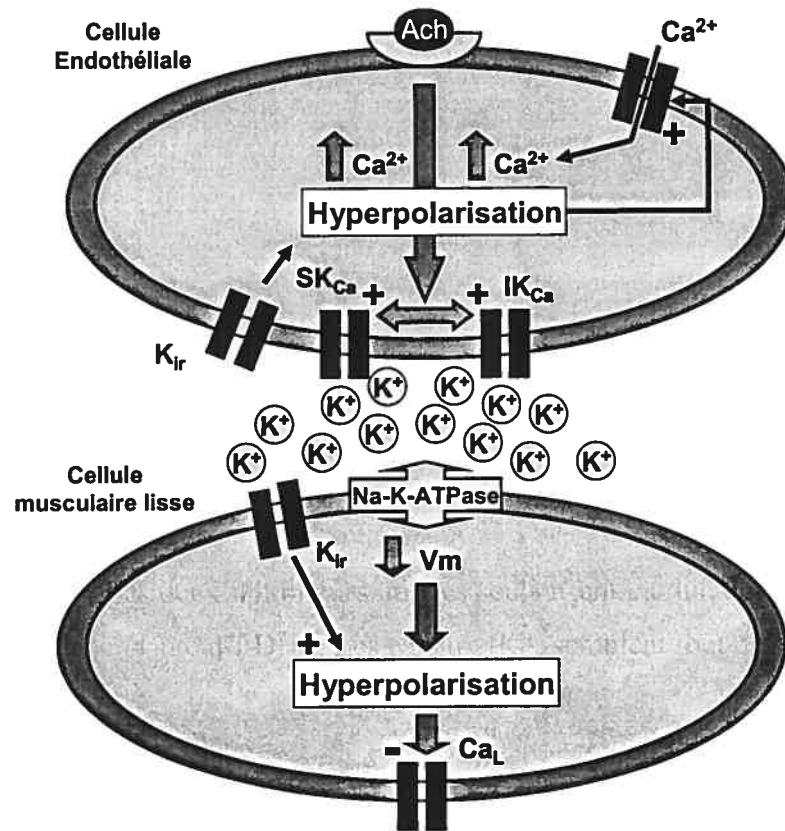
## **5.0- Discussion**

### **5.1- Nature et mécanisme d'action d'EDHF dans l'artère gracilis de la souris âgée de 3 mois**

Des trois vasodilatateurs libérés par l'endothélium en réponse à l'acétylcholine, l'EDHF est le plus important au niveau de l'artère *gracilis* avec une vasodilatation de 86% comparativement à 48% pour le NO et la PGI<sub>2</sub> combinés. Cela est en accord avec le fait qu'EDHF semble être plus important que le NO et la PGI<sub>2</sub> dans les petites artères<sup>105</sup>. Nos résultats démontrent qu'au niveau de l'artère *gracilis* de la souris C57Bl6 âgée de 3 mois, le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium est constitué d'ions K<sup>+</sup> (Figure 11). La réponse à l'Ach est sensible à une combinaison d'apamine et de charybdotoxine, ce qui suggèrent l'implication des canaux SK<sub>Ca</sub> et IK<sub>Ca</sub> dans la libération des ions K<sup>+</sup> (Figure 11). L'augmentation de 5 à 10 mM de la concentration myoendothéliale de K<sup>+</sup> qui s'en suit<sup>130</sup> active les pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase et les canaux K<sub>ir</sub> des cellules musculaires lisses provoquant ainsi l'hyperpolarisation de ces dernières (Figure 11). Il est possible que les canaux K<sub>ir</sub> soient aussi exprimés sur les cellules endothéliales et qu'ils participent aussi à l'hyperpolarisation endothéliale (Figure 11). L'hyperpolarisation endothéliale résultant de l'activation des canaux SK<sub>Ca</sub> et IK<sub>Ca</sub> favorise l'entrée de calcium dans les cellules endothéliales par le biais des canaux TRP ou cationiques non sélectifs (Figure 11).

Comme cela a été déjà démontré<sup>130;417</sup>, une combinaison d'apamine et de charybdotoxine était nécessaire afin de bloquer la dilatation dépendante d'EDHF induite par l'acétylcholine. Nos résultats démontrent qu'il en est de même dans notre préparation puisque l'apamine et la charybdotoxine appliquées ensemble ont fortement réduit la dilatation induite par EDHF (de 86±4 à 22±4%). L'activation des récepteurs muscariniques endothéliaux pourrait être en mesure d'activer ces canaux

directement <sup>132</sup>. Les deux inhibiteurs utilisés seuls n'ont eu que des effets partiels sur la dilatation dépendante d'EDHF. Les canaux  $IK_{Ca}$  semblent tout de



**Figure 11. Nature et mécanisme d'action d'EDHF dans l'artère *gracilis* de la souris âgée de 3 mois .** L'acétylcholine se lie à son récepteur sur la cellule endothéliale, ce qui provoque l'activation des canaux  $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$ , soit de manière directe, ou par une augmentation du calcium intracellulaire. L'hyperpolarisation endothéliale favorise l'entrée de calcium dans la cellule par des canaux cationiques sur la membrane, ce qui élève la concentration intracellulaire de calcium et augmente encore l'activation des canaux  $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$ . L'activation de ces canaux permet une légère augmentation de la concentration potassique extracellulaire entre les cellules endothéliales et musculaires lisses, ce qui active la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase et les canaux  $K_{ir}$  des cellules musculaires lisses. Cela a pour effet d'hyperpolariser les cellules musculaires lisses et de provoquer la fermeture des canaux  $Ca_L$ . Il est aussi possible que des canaux  $K_{ir}$  soient aussi exprimés sur les cellules endothéliales et qu'ils soient aussi activés par l'augmentation extracellulaire de potassium.

même plus importants que les canaux  $SK_{Ca}$  dans la réponse EDHF puisque la charybdotoxine a réduit cette réponse de manière plus prononcée (-37%) que l'apamine (-15%). Étant donné que la charybdotoxine est aussi un bloqueur des canaux  $BK_{Ca}$ , des expériences ont été faites en présence d'ibériotoxine. Cet inhibiteur n'a eu aucun effet sur la dilatation dépendante d'EDHF induite par l'acétylcholine



démontrant donc que les  $IK_{Ca}$  semblent bien être les canaux impliqués dans la réponse induite par EDHF.

Il a été démontré qu'une augmentation de la concentration extracellulaire d'ions  $K^+$  pouvait stimuler deux cibles des cellules musculaires lisses sensibles à cette augmentation soit la  $Na^+/K^+$ -ATPase et les canaux  $K_{ir}$  <sup>130</sup>. Nos résultats démontrent que la réponse dilatatrice dépendante d'EDHF induite par l'acétylcholine de l'artère *gracilis* de la souris est sensible au barium et à la ouabaïne. Le barium n'a diminué la dilatation que de 16% alors que la ouabaïne a été nettement plus efficace en diminuant la réponse induite par EDHF de 78%. Ainsi, la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase semble beaucoup plus impliquée que les canaux  $K_{ir}$  dans les dilatations induites par EDHF de l'artère *gracilis* de la souris. La combinaison de ouabaïne et de barium a réduit la réponse EDHF de 85% mais cet effet n'était pas significativement différent de la réduction obtenue avec la ouabaïne seule. Ainsi, il est possible que les canaux  $K_{ir}$  jouent un rôle mineur dans la dilatation dépendante d'EDHF.

Ainsi, au niveau de l'artère *gracilis* de la souris mâle de souche C57Bl6, EDHF est une augmentation de la concentration de  $K^+$  myoendothéliale générée par l'activité des canaux  $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$  endothéliaux (Figure 11). En réponse à cette augmentation, les pompes  $Na^+/K^+$ -ATPases et dans une moindre mesure, les canaux  $K_{ir}$  musculaires lisses sont stimulés, ce qui hyperpolarise et dilate le muscle lisse (Figure 11).

## **5.2- Effet du vieillissement sur la nature et le mécanisme d'action d'EDHF au niveau de l'artère *gracilis* de la souris**

Nos résultats démontrent que le vieillissement altère la fonction EDHF au niveau de l'artère *gracilis* de la souris C57Bl6 mâle. Il a déjà été démontré par d'autres que le vieillissement pouvait réduire l'efficacité de la dilatation dépendante d'EDHF <sup>122;410</sup>. Les effets du vieillissement sur EDHF sont complexes au niveau de l'artère *gracilis* de la souris mâle. À 12 mois, il y a une diminution de la dilatation engendrée par EDHF de 23%. Cette baisse d'efficacité est accompagnée d'un changement de la

nature du facteur EDHF. En effet, à 12 mois, un métabolite de l'acide arachidonique généré par un cytochrome P450 participe, avec les ions  $K^+$ , à la dilatation dépendante d'EDHF (Figure 12). Au niveau du muscle lisse, l'hyperpolarisation est engendrée par l'activation de la  $Na^+/K^+$ -ATPase. Les canaux  $K_{ir}$  ne semblent plus jouer de rôle. À 18 mois, l'efficacité de la dilatation dépendante d'EDHF n'est pas diminuée en amplitude mais la sensibilité à l'acétylcholine est fortement réduite ( $pD_2$  de 6.9 à 5.7 pour 12 et 18 mois respectivement). Les ions  $K^+$  et le métabolite de l'acide arachidonique généré par un cytochrome P450 demeurent impliqués dans la réponse EDHF à cet âge (Figure 12).

Alors qu'une combinaison d'apamine et de charybdotoxine a réduit la dilatation induite par EDHF de 74% à 3 mois, cette combinaison n'a diminué la réponse EDHF que de 30% à 12 mois. La raison de cette perte de l'efficacité de ces deux inhibiteurs pour bloquer la réponse EDHF n'est pas claire. Par contre, le tonus myogénique est augmenté de manière plus importante lorsque les canaux  $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$  sont inhibés à 12 mois comparativement à 3 mois. Une explication possible pourrait donc être qu'à 12 mois, les canaux  $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$  seraient plus actifs en condition passive et ils seraient donc moins disponibles pour une éventuelle activation lors d'une réponse EDHF. Le fait que le 17-ODYA ait réduit la réponse EDHF de 35% suggère qu'un métabolite de l'acide arachidonique généré par l'activité d'un cytochrome P450 est impliqué dans la réponse EDHF à 12 mois. Ce n'est qu'en combinant apamine, charybdotoxine et 17-ODYA que nous avons pu réduire la dilatation induite par EDHF à 18%, niveau similaire à celui obtenu par l'application d'apamine et de charybdotoxine à 3 mois (22%). L'implication des cytochromes P450 dans la réponse EDHF a été démontrée dans d'autres artères<sup>113;148;249</sup>. Dans ces études les métabolites de l'acide arachidonique générés par l'activité des cytochromes P450 sont des EETs et ces derniers hyperpolarisent généralement les cellules musculaires lisses en activant les canaux  $BK_{Ca}$ .

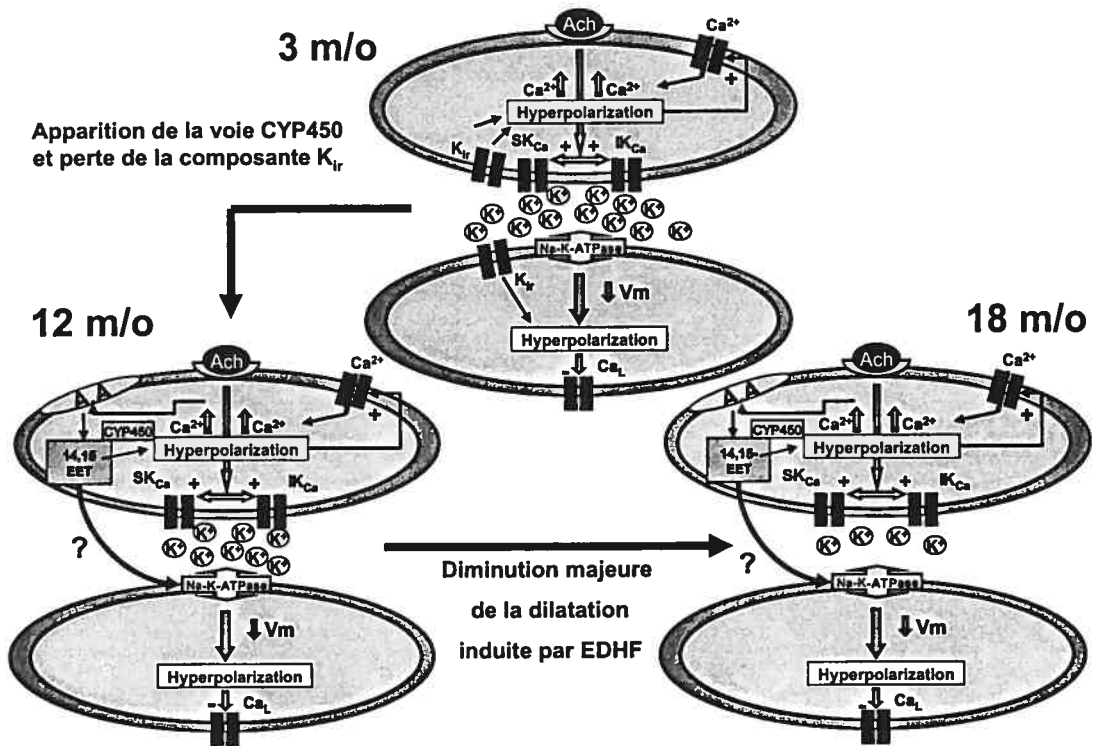


Figure 12. Effet du vieillissement sur la nature et le mécanisme d'action d'EDHF dans l'artère *gracilis* de la souris âgée de 3, 12 et 18 mois. Alors qu'à 3 mois, l'EDHF semblait uniquement être composé d'ions  $K^+$  dans l'artère *gracilis* de la souris, à 12 mois, un EDHF formé par l'action d'un cytochrome P450 sur l'acide arachidonique des phospholipides membranaires semble aussi être impliqué bien que les dilatations dépendantes d'EDHF soient moins efficaces. Ce second EDHF, qui semble être le 14,15-EET, pourrait agir sur le muscle lisse en activant la pompe  $Na^+/K^+-ATPase$ . Il est aussi possible que cet EET agisse au niveau de la cellule endothéliale en favorisant son hyperpolarisation. L'implication des canaux  $K_{ir}$  disparaît à 12 mois. À 18 mois, bien que les deux EDHFs soient encore présents, les dilatations induites par ces derniers sont beaucoup diminuées.

L'ibériotoxine n'a eu aucun effet sur les relaxations dépendantes d'EDHF dans l'artère *gracilis* de la souris suggérant la synthèse, par un cytochrome P450, d'un autre type de métabolite de l'acide arachidonique ou encore d'un EET utilisant un autre mécanisme d'action n'impliquant pas les canaux  $BK_{Ca}$ . Il a été démontré que l'acide arachidonique pouvait hyperpolariser l'artère coronaire du cochon d'inde par un mécanisme indépendant des EETs<sup>251</sup>. Il a aussi été démontré que les EETs peuvent, par un mécanisme dépendant de la protéine kinase C, augmenter la

communication par les jonctions gap<sup>285</sup>. Les EETs semblent aussi être en mesure d'augmenter la probabilité d'ouverture des canaux calciques endothéliaux<sup>284</sup>. Ainsi, les EETs pourraient agir en tant que seconds messagers impliqués dans les dilatations dépendantes d'EDHF plutôt qu'en tant qu'EDHF.

À 18 mois, l'apamine et la charybdotoxine ont réduit de 75% la dilatation dépendante d'EDHF soit une réduction semblable à celle obtenue en présence de ces deux inhibiteurs à 3 mois (74%). Le 17-ODYA a réduit la dilatation induite par EDHF de 35%. Le métabolite de l'acide arachidonique participant à la réponse EDHF présent à 12 mois semble toujours être impliqué à 18 mois. Pourtant, le fait que l'apamine et la charybdotoxine inhibent 75% de la réponse EDHF suggèrent que les canaux SK<sub>Ca</sub> et IK<sub>Ca</sub> sont en mesure, comme c'était le cas à 3 mois, d'induire la réponse EDHF à eux seuls. Il est pourtant important de noter que la réponse EDHF est réduite de 45% entre 3 et 18 mois. Ainsi, il est possible que l'importance relative des canaux SK<sub>Ca</sub> et IK<sub>Ca</sub> augmente avec la baisse de l'amplitude de la réponse EDHF.

La raison de l'apparition d'un second EDHF ou d'un second messenger généré par l'activité d'un cytochrome P450 et participant à la réponse EDHF à 12 mois n'est pas claire. À 12 mois, le tonus myogénique est augmenté de manière indépendante du NO et de la PGI<sub>2</sub>, un fait qui pourrait s'expliquer par un état plus dépolarisé de l'artère *gracilis* à cet âge. La ouabaïne n'augmente pas le tonus myogénique alors que c'était le cas à 3 mois. Cela suggère que l'activité de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase est réduite à 12 mois et cela pourrait être l'élément déclencheur de l'expression endothéliale de la composante sensible au 17-ODYA de la réponse EDHF.

Le fait que la ouabaïne bloque la réponse EDHF à 3, 12 et 18 mois suggère que le métabolite de l'acide arachidonique généré par le cytochrome P450, comme l'augmentation de la concentration extracellulaire de K<sup>+</sup>, hyperpolarise les cellules musculaires lisses en stimulant la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Il a été démontré que la ouabaïne était en mesure d'inhiber les réponses EDHF dépendantes des EETs et de l'acide arachidonique<sup>418;419</sup>.

La réponse dilatatrice dépendante du NO et de la PGI<sub>2</sub> induite par l'acétylcholine est aussi altérée par le vieillissement. À 12 mois, la dilatation dépendante du NO et de la PGI<sub>2</sub> est réduite de 38% et bien que cette dilatation soit maintenue à 18 mois, la sensibilité à l'acétylcholine est quant à elle très diminuée dans l'artère *gracilis* de la souris mâle (pD<sub>2</sub> de 7.9 à 5.2 pour 12 et 18 mois respectivement). Ces résultats sont en accord avec des études qui ont démontré que le vieillissement détériorait les réponses dilatatrices du NO et de la PGI<sub>2</sub><sup>401;402;404</sup>. Les mécanismes proposés pour expliquer cette diminution sont une diminution de la production de NO ou de GMPC<sup>404;420</sup>, un épaissement de la paroi artérielle qui limite l'accessibilité des substances vasodilatatrices au muscle lisse<sup>400</sup>, des mécanismes intracellulaires dysfonctionnels<sup>389</sup>, la présence d'un endothélium régénéré moins efficace<sup>330;397</sup> et une inactivation du NO par l'augmentation des radicaux libres observable avec le vieillissement<sup>402;405;408;421</sup>. Cette dernière possibilité a été testée par l'application de l'antioxydant n-acétyl-l-cystéine mais ce dernier n'a pas rétabli la réponse EDHF. Il est toujours possible que le stress oxydant ait un rôle à jouer dans la perte de la réponse induite par l'acétylcholine si les dommages provoqués par les radicaux libres sont irréversibles.

En résumé, le vieillissement détériore les dilatations induites par l'acétylcholine dépendantes d'EDHF et de NO/PGI<sub>2</sub>. À 3 mois, seule l'augmentation de la concentration extracellulaire d'ions K<sup>+</sup> provoquée par l'activation des canaux SK<sub>Ca</sub> et IK<sub>Ca</sub> endothéliaux est, par le biais de l'activation des canaux K<sub>ir</sub> et des pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases musculaires lisses, responsable de l'hyperpolarisation et de la relaxation des artères *gracilis* de la souris mâle C57Bl6 en réponse à l'acétylcholine lorsqu'en présence de L-NNA et d'indométhacine. À 12 mois, la réponse EDHF est réduite, mais en plus des ions K<sup>+</sup>, un métabolite de l'acide arachidonique généré par un cytochrome P450 participe à cette réponse. À 18 mois, les deux composantes EDHF sont moins efficaces, ce qui favorise le développement de la dysfonction endothéliale associée au vieillissement.

### 5.3- Effet de l'hypercholestérolémie et du vieillissement sur la nature et le mécanisme d'action d'EDHF au niveau de l'artère *gracilis* de la souris

Nos résultats démontrent qu'à l'âge de 3 mois, l'hypercholestérolémie induit déjà des changements dans la réponse dépendante d'EDHF au niveau de l'artère *gracilis* de la souris mâle. À cet âge, l'hypercholestérolémie augmente la dilatation dépendante d'EDHF induite par l'acétylcholine de 10%. Un tel effet de l'hypercholestérolémie a déjà été démontré au niveau des artères carotides et rénales du lapin <sup>358;359</sup>. Alors qu'au niveau de l'artère *gracilis* de la souris saine les ions  $K^+$  représentent le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, chez la souris hypercholestérolémique ce facteur ne semble plus suffisant pour dilater l'artère *gracilis* et un métabolite de l'acide arachidonique généré par un cytochrome P450 participe alors à la réponse EDHF induite par l'acétylcholine (Figure 13). Ce métabolite semble être le 14,15-EET puisque le EEZE, un antagoniste spécifique de cet EET, a produit les mêmes résultats que le 17-ODYA, un bloqueur non spécifique des cytochromes P450 chez les souris hypercholestérolémiques âgées de 3 mois. À 12 et 20 mois, ce métabolite de l'acide arachidonique ne semble plus être impliqué. Cependant, le n-acétyl-l-cystéine rétablit la réponse EDHF chez la souris de 12 mois à un niveau semblable à celui observable à 3 mois, et cette récupération est sensible au 17-ODYA. Ainsi, le stress oxydant serait à l'origine de la perte de la composante sensible au 17-ODYA à 12 mois, mais cet effet est réversible à cet âge. L'absence d'effet du n-acétyl-l-cystéine à 20 mois suggère

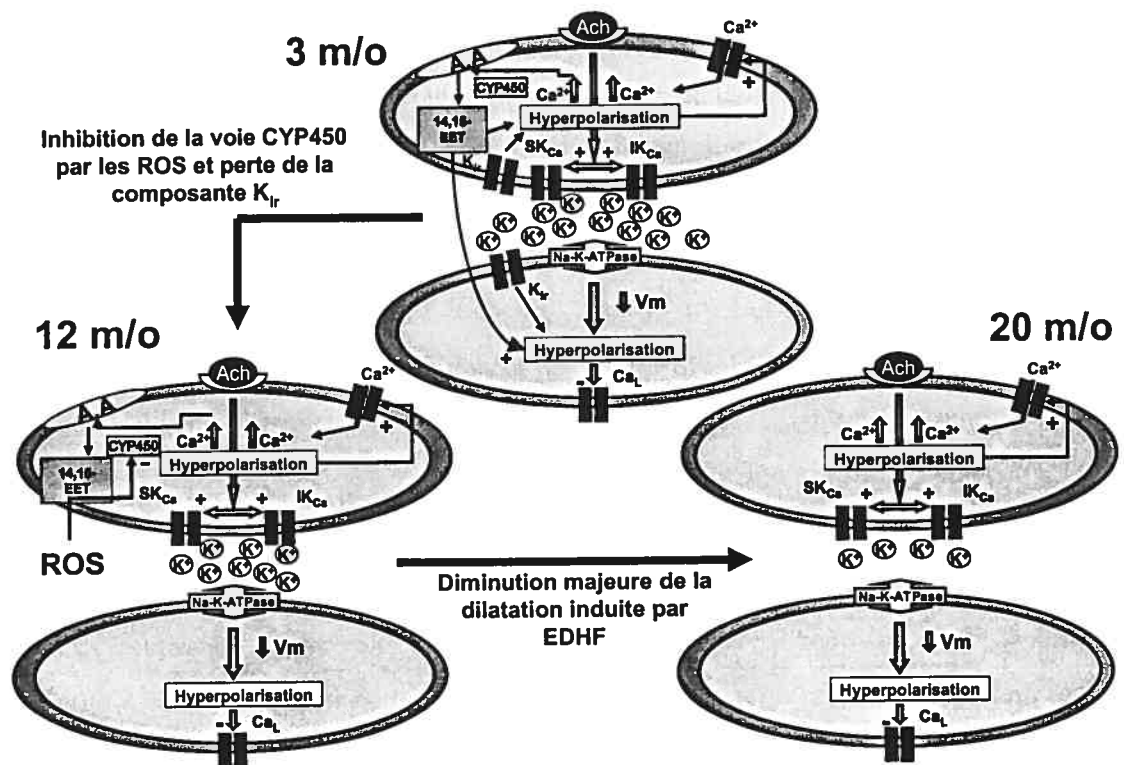


Figure 13. Effet du vieillissement associé à l'hypercholestérolémie sur la nature et le mécanisme d'action d'EDHF dans l'artère *gracilis* de la souris âgée de 3, 12 et 20 mois. Dès l'âge de 3 mois chez la souris hypercholestérolémique, il y a formation d'un second EDHF, en plus des ions  $K^+$ , formé par l'action d'un cytochrome P450 sur l'acide arachidonique des phospholipides membranaires. Cet EDHF semble être le 14,15-EET et sa cible musculaire lisse est inconnue. À 12 mois, les vasodilatations dépendantes d'EDHF sont beaucoup moins efficaces et la formation ou l'action du 14,15-EET semble être inhibée par les radicaux libres. Les canaux  $K_{Ir}$  ne semblent plus impliqués dans la vasodilatation dépendante d'EDHF. À 20 mois, l'EDHF composé du 14,15-EET n'est plus impliqué dans les vasodilatations dépendantes d'EDHF et ces dernières sont beaucoup moins efficaces.

la présence de dommages irréversibles. La réduction de la réponse EDHF induite par le vieillissement en présence d'hypercholestérolémie est plus importante que celle observée chez les souris saines. À 12 mois, la réponse EDHF est réduite de 40% et la sensibilité à l'acétylcholine est aussi diminuée ( $pD_2$  de 7.4 à 3 mois vs 6.3 à 12 mois). À 20 mois, la réponse EDHF est encore réduite de 54% par rapport à la réponse

EDHF des souris de 12 mois pour un total de réduction de 73% par rapport à la réponse EDHF observable à 3 mois.

Chez la souris hypercholestérolémique, le vieillissement n'affecte pas la capacité qu'a la combinaison d'apamine et de charybdotoxine d'inhiber la réponse EDHF bien que les effets de cette combinaison soient plus importants à 12 et à 20 mois (réponse inhibé à 92% et 98% à 12 et 20 mois, respectivement vs 75% à 3 mois). À 3 mois, la ouabaïne n'est plus en mesure de bloquer la réponse EDHF en condition hypercholestérolémique (inhibition à seulement 25% vs 81% à 3 mois chez la souris témoin). L'apport des canaux  $K_{ir}$  semble être plus important en comparaison avec la condition contrôle et même si l'EDHF principal, les ions  $K^+$ , ne semblent plus aussi efficaces pour dilater l'artère *gracilis* de la souris hypercholestérolémique, ils sont toujours impliqués comme le démontre la réduction de 43% de la réponse EDHF en présence de barium et de ouabaïne. Par contre, seule l'addition de 17-ODYA au barium et à la ouabaïne a permis de complètement bloquer la réponse EDHF (5%).

L'activation des canaux  $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$  entraîne l'hyperpolarisation des cellules endothéliales et favorise l'augmentation du calcium intracellulaire<sup>130;417</sup>. Cette augmentation du niveau de calcium intracellulaire pourrait être à l'origine de l'activation du cytochrome P450. Il a été démontré que l'hypercholestérolémie augmente la production d'EETs dans l'aorte de lapin<sup>360</sup>. Comme chez la souris saine de 12 mois, la nature du métabolite de l'acide arachidonique généré par un cytochrome P450 impliqué dans la réponse EDHF de l'artère *gracilis* de la souris hypercholestérolémique demeure inconnue. Même si ici encore l'ibériotoxine n'a pas eu d'effet sur la réponse induite par EDHF, un EET pourrait tout de même être l'EDHF formé pour les raisons expliquées précédemment.

L'implication du métabolite de l'acide arachidonique participant à la réponse EDHF dans l'artère *gracilis* de la souris hypercholestérolémique semble être perdue à 12 mois puisque le 17-ODYA n'a plus d'effet à cet âge. L'application d'un antioxydant soit le n-acétyl-l-cystéine a ramené le niveau de dilatation dépendante d'EDHF à une



valeur proche (84%) de celle observable au niveau de l'artère gracilis de la souris de 3 mois (95%). La composante sensible au stress oxydant semble être l'EDHF formé par un cytochrome P450 puisque la portion de la réponse EDHF récupérée sous l'action du n-acétyl-l-cystéine était sensible au 17-ODYA. À 20 mois, le n-acétyl-l-cystéine n'avait aucun effet sur la réponse EDHF suggérant donc la présence de dommages irréversibles par les radicaux libres. L'hypercholestérolémie semble être responsable de ces dommages puisque le n-acétyl-l-cystéine n'a pas eu d'effet au niveau de l'artère *gracilis* de la souris saine et aussi parce que la diminution attribuable au vieillissement de la réponse EDHF était beaucoup moins importante chez le sujet témoin. Le stress oxydant est augmenté par l'hypercholestérolémie <sup>353</sup>. De plus, les LDLs épuisent les protections antioxydantes favorisant ainsi la formation de radicaux libres <sup>355</sup>.

Il est intéressant de remarquer que les effets du vieillissement sur la réponse EDHF en présence et en absence d'hypercholestérolémie se ressemblent beaucoup. En effet, dans les deux cas, le vieillissement diminue la réponse EDHF. Chez la souris saine, un métabolite de l'acide arachidonique généré par le cytochrome P450 participe à la dilatation dépendante d'EDHF à partir de 12 mois alors qu'une voie semblable apparaît à 3 mois chez la souris hypercholestérolémique. Quoique les cibles de ce ou ces métabolites de l'acide arachidonique semblent différer, il semble logique d'émettre l'hypothèse que l'hypercholestérolémie pourrait favoriser l'apparition accélérée de la dysfonction endothéliale normale observée avec le vieillissement chez le sujet sain.

## **6.0- Conclusion**

En conclusion, au niveau de l'artère gracilis de la souris, l'EDHF a deux identités. Les ions potassiques, libérés par les canaux SK<sub>Ca</sub> et IK<sub>Ca</sub> endothéliaux, activent les pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases et dans une moindre mesure, les canaux K<sub>ir</sub>, hyperpolarisant et relaxant les cellules musculaires lisses. En condition saine, le vieillissement provoque l'apparition du second EDHF soit un métabolite de l'acide arachidonique

de nature inconnue, généré par un cytochrome P450 qui semble participer à l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses en activant les pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases. L'hypercholestérolémie provoque également la formation d'un métabolite de l'acide arachidonique de nature inconnue généré par un cytochrome P450 chez la souris âgée de 3 mois. La cible de ce métabolite est inconnue en condition hypercholestérolémique. Chez la souris hypercholestérolémique, ce mécanisme est inhibé de manière réversible par le stress oxydant à 12 mois alors que l'inhibition devient permanente et donc irréversible à 20 mois. Chez la souris saine comme chez la souris hypercholestérolémique, le vieillissement réduit la réponse EDHF. Cette réduction est plus drastique chez la souris hypercholestérolémique même si à 3 mois, l'hypercholestérolémie augmente transitoirement l'amplitude de la dilatation dépendante d'EDHF avant de la réduire fortement à 12 et à 20 mois.

## Remerciements

Un merci particulier à Stéphanie Sauvageau, ma tendre moitié qui m'a supporté et appuyé lors de mes études de Doctorat. Sa force de caractère et son assiduité au travail ont été de merveilleux exemples pour moi. À maintes reprises, son avis et ses raisonnements intelligents m'ont été d'une aide précieuse lors de nos nombreuses discussions. Stéphanie a toujours été présente et elle m'a toujours aidé à reprendre confiance en moi dans les moments difficiles de mes études de Doctorat et j'espère un jour être capable de lui rendre la pareille. Je me considère très chanceux de l'avoir à mes côtés.

J'aimerais remercier ma famille et tout particulièrement ma mère qui a toujours été présente pour me venir en aide quelque soit le problème qui se présentait. Elle a su m'enseigner à être persévérant dans mes études et pour cela je lui en serez éternellement reconnaissant.

Je voudrais remercier le personnel que j'ai côtoyé pendant mes études de maîtrise et du début de mon Doctorat soit :

- Le Dr Normand Leblanc pour m'avoir donné ma chance et pour avoir su m'aider à développer mon esprit scientifique.
- Denis Chartier pour son inépuisable expérience et sa patience infinie
- Marie-Andrée Lupien pour ses innombrables services et pour m'avoir initié au travail de laboratoire
- Le Dr Jonathan Ledoux pour m'avoir enseigné les rudiments de toutes les techniques que j'ai utilisées lors de ma maîtrise et surtout, pour avoir créé un environnement de travail tellement plaisant.
- Annick Migneault, Hui Sun, ainsi que tous les autres qui ont été présents dans le laboratoire à différentes périodes de ma maîtrise.

Je remercie aussi Guillaume Voghel. Il a été plaisant de travailler avec Guillaume même si nos projets respectifs étaient très différents. Guillaume n'a jamais été très

bavard mais il n'a jamais hésité à partager son opinion avec moi lorsque je faisais appel à lui.

Nada Farhat est un mystère pour moi. Je n'ai jamais su comment elle faisait pour être si gentille et douce avec tout le monde. Assidue, travaillante et serviable à l'extrême, Nada a toujours su m'impressionner avec le travail qu'elle accomplissait. Jamais elle n'a hésité à me venir en aide lorsque je faisais appel à elle.

Marie-Ève Gendron est la personne qui m'a appris la technique de l'artériographe et pour cela elle mérite amplement mes remerciements. Pourtant, sa présence a été appréciée tout au long de mon Doctorat surtout en raison de nos discussions. Nos projets étant très complémentaires, ils nous ont souvent été utiles de discuter de nos hypothèses et des problèmes rencontrés. Ces discussions m'ont été précieuses et très utiles.

Le Dre Nathalie Trescase mérite un merci bien particulier. Elle représente un puit de connaissance inépuisable à mes yeux. Il m'est difficile de me rappeler les rares fois où Nathalie n'a pas été en mesure de répondre à une de mes questions. Toujours gentille, aimable et très serviable, Nathalie est un don du ciel pour n'importe quel étudiant aux études supérieures. Elle rehausse grandement la qualité du travail scientifique accompli dans le laboratoire et son esprit critique et son sens de l'esthétique m'ont souvent été d'un grand secours.

Le Dr Éric Thorin est, selon moi et probablement beaucoup d'autres, un chercheur émérite. Il possède un esprit d'analyse impressionnant et il est toujours présent autant de corps que d'esprit pour ses étudiants et employés. Il m'a appris beaucoup au niveau scientifique et il m'a beaucoup aidé à aiguiser mon esprit scientifique et pour cela je l'en remercie énormément. Éric m'a aussi beaucoup appris au niveau de l'organisation et de la rigueur, deux composantes du travail pour lesquelles j'avais des lacunes. Il m'a aussi appris bien des choses sur ma propre personne en m'enseignant : à ne jamais perdre confiance en moi quoique les gens me disent, à ne

jamais prendre pour acquis l'avis d'une autre personne, à persévérer envers et contre tous lorsque les résultats ne sont pas équivalents au travail accompli et à comprendre que même les meilleurs peuvent se tromper et que malgré ces erreurs, il faut foncer tête première et travailler encore plus fort. Pour cela et pour tout le reste qui n'est pas écrit ici, je te remercie Éric, tu m'as nettement fait grandir en tant que personne.

## **Bibliographie**

1. Maclouf J, Folco G, and Patrono C. 1998. Eicosanoids and iso-eicosanoids: constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease. *Thromb Haemost* 79:691-705.
2. Kayama N, Sakaguchi K, Kaneko S, Kubota T, Fukuzawa T, Kawamura S, Yoshimoto T, and Yamamoto S. 1981. Inhibition of platelet aggregation by 1-alkylimidazole derivatives, thromboxane A synthetase inhibitors. *Prostaglandins* 21:543-544.
3. Shenker A, Goldsmith P, Unson CG, and Spiegel AM. 1991. The G protein coupled to the thromboxane A2 receptor in human platelets is a member of the novel Gq family. *J Biol Chem* 266:9309-9313.
4. Baldassare JJ, Tarver AP, Henderson PA, MacKin WM, Sahagan B, and Fisher GJ. 1993. Reconstitution of thromboxane A2 receptor-stimulated phosphoinositide hydrolysis in isolated platelet membranes: involvement of phosphoinositide-specific phospholipase C-beta and GTP-binding protein Gq. *Biochem J* 291:235-240.
5. Vanhoutte PM. 1996. Endothelium-dependent responses and inhibition of angiotensin-converting enzyme. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:S23-S29.
6. Pueyo ME and Michel JB. 1997. Angiotensin II receptors in endothelial cells. *Gen Pharmacol* 29:691-696.
7. Stoll M, Meffert S, Stroth U, and Unger T. 1995. Growth or antigrowth: angiotensin and the endothelium. *J Hypertens* 13:1529-1534.
8. Berridge MJ and Irvine RF. 1989. Inositol phosphates and cell signaling. *Nature* 341:197-205.

9. Alexander RW and Gimbrone MAJ. 1976. Stimulation of prostaglandin E synthesis in cultured human umbilical vein smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1617-1620.
10. Lassègue B, Alexander RW, Clark M, and Griendling KK. 1991. Angiotensin II-induced phosphatidylcholine hydrolysis in cultured vascular smooth muscle cells. Regulation and localization. *Biochem J* 276:19-25.
11. Bégeot M, Langlois D, Penhoat A, and Saez JM. 1988. Variations in guanine-binding proteins ( $G_s$ ,  $G_i$ ) in cultured bovine adrenal cells. Consequences on the effects of phorbol ester and angiotensin II on adrenocorticotropin-induced and cholera toxin-induced cAMP production. *Eur J Biochem* 174:317-321.
12. Ohya Y and Sperelakis N. 1991. Involvement of a GTP-binding protein in stimulating action of angiotensin II on calcium channels in vascular smooth cells. *Circ Res* 68:763-771.
13. Masaki T. 1995. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:235-255.
14. Ohlstein EH, Arleth A, Bryan H, Elliott JD, and Sung CP. 1992. The selective endothelin ETA receptor antagonist BQ123 antagonizes endothelin-1-mediated mitogenesis. *Eur J Biochem* 225:347-350.
15. Haynes WG, Strachan FE, and Webb DJ. 1995. Endothelin  $ET_A$  and  $ET_B$  receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation* 92:357-363.
16. D'Orleans-Juste P, Claing A, Telemaque S, Maurice MC, Yano M, and Gratton JP. 1994. Block of endothelin-1-induced release of thromboxane A2 from the guinea pig lung and nitric oxide from the rabbit kidney by selective  $ET_B$  receptor antagonist, BQ-788. *Br J Pharmacol* 113:1257-1262.

17. Katusic ZS. 1996. Superoxide anions and endothelial regulation of arterial tone. *Free Radic Biol Med* 20:443-448.
18. Brandes RP, Barton M, Philippens KM, Schweitzer G, and Mugge A. 1997. Endothelial-derived superoxide anions in pig coronary arteries: evidence from lucigenin chemiluminescence and histochemical techniques. *J Physiol* 500:331-342.
19. Hashimoto Y, Itoh K, Nishida K, Okano T, Miyazawa Y, and Okinaga K. 1994. Rapid superoxide production by endothelial cells and their injury upon reperfusion. *J Surg Res* 57:693-697.
20. Hishikawa K and Luscher TF. 1997. Pulsatile stretch stimulates superoxide production in human aortic endothelial cells. *Circulation* 96:3610-3616.
21. Grisham MB and McCord JM. 1986. Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. *American Physiological Society Physiology of Oxygen Radicals* 1-18.
22. Murphy MP, Packer MA, Scarlett JL, and Martin SW. 1998. Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *Gen Pharmacol* 31:179-186.
23. Palluy O, Bonne C, and Modat G. 1991. Hypoxia/reoxygenation alters endothelial prostacyclin synthesis-protection by superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 11:269-275.
24. Vanhoutte PM. 2004. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacol Res* 49:503-508.
25. Moncada S, Gryglewski RJ, Bunting S, and Vane JR. 1976. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263:663-665.



26. Miyata A, Hara S, Yokoyama C, Inoue H, Ullrich V, and Tanabe T. 1994. Molecular cloning and expression of human prostacyclin synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 200:1728-1734.
27. Schrör K. 1985. Prostaglandins, other eicosanoids and endothelial cells. *Basic Res Cardiol* 80:502-514.
28. Chang J, Musser JH, and McGregor H. 1987. Phospholipase A<sub>2</sub>: function and pharmacological regulation. *Biochem Pharmacol* 36:2429-2436.
29. Boie Y, Rushmore TH, Darmon-Goodwin A, Grygorczyk R, Slipetz DM, Metters KM, and Abramovitz M. 1994. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J Biol Chem* 269:12173-12178.
30. Coleman RA, Smith WL, and Narumiya S. 1994. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46:205-229.
31. Parfevona H, Hsu P, and Leffler CW. 1995. Dilator prostanoid-induced cyclic AMP formation and release by cerebral microvascular smooth muscle cells: inhibition by indomethacin. *J Pharmacol Exp Ther* 272:44-52.
32. Patrono C, Rotella CM, Toccafondi RS, Aterini S, Pinca E, Tanini A, and Zonefrati R. 1981. Prostacyclin stimulates the adenylate cyclase system of human thyroid tissue. *Prostaglandins* 22:105-115.
33. Alshihabi SN, Chang YS, Frangos JA, and Tarbell JM. 1996. Shear stress-induced release of PGE<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub> by vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 224:808-814.
34. Terashita Z, Fukui H, Nishikawa K, Hirata M, and Kikuchi S. 1982. Effects of arachidonic acid and bradykinin on the coronary flow, release of PGI<sub>2</sub> and

- cardiac functions in the perfused guinea-pig heart. *Jpn J Pharmacol* 32:351-358.
35. Grodzinska L and Gryglewski RJ. 1980. Angiotensin-induced release of prostacyclin from perfused organs. *Pharmacol Res Commun* 12:339-347.
  36. de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, and Vane JR. 1988. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9797-9800.
  37. Furchgott RF and Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.
  38. Palmer RMJ, Ferridge AG, and Moncada S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.
  39. Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, and Bloch KD. 1992. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267:14519-14522.
  40. Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, and Murad F. 1993. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS lett* 316:175-180.
  41. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, and Snyder SH. 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351:714-718.

42. Busse R, Mulsch A, Fleming I, and Hecker M. 1993. Mechanisms of nitric oxide release from the vascular endothelium. *Circulation* 87:V18-V25.
43. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, and Zeiher AM. 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601-605.
44. MacNaul KL and Hutchinson NI. 1993. Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 196:1330-1334.
45. Chen LY and Mehta JL. 1996. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 27:154-158.
46. Balligand JL, Ungereanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, and Kell RA. 1994. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem* 269:27580-27588.
47. Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, Rhodes P, Westmore K, Emson PC, and Moncada S. 1995. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4392-4396.
48. Iadecola C, Zhang F, and Xu X. 1995. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol* 268:R286-R292.

49. Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG, and Moncada S. 1995. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br J Cancer* 72:41-44.
50. Feng Q, Lu X, Jones DL, Shen J, and Arnold MO. 2001. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice. *Circulation* 104:700-707.
51. Wildhirt SM, Weismueller S, Schulze C, Conrad N, Kornberg A, and Reichart B. 1999. Inducible nitric oxide synthase activation after ischemia\reperfusion contributes to myocardial dysfunction and extent of infarct size in rabbits: evidence for a late phase of nitric oxide-mediated reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 43:698-711.
52. Cho HJ, Xie Q-w, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, and Nathan C. 1992. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 176:599-604.
53. Vodovotz Y, Kwon NS, Pospischil M, Manning J, Paik J, and Nathan C. 1994. Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN- $\gamma$  and bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 152:4110-4118.
54. Nathan C and Xie Q-w. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269:13725-13728.
55. Xu W, Charles IG, Moncada S, Gorman P, Sheer D, Liu L, and Emson PC. 1994. Mapping of the genes encoding human inducible and endothelial nitric oxide synthase (NOS2 and NOS3) to the pericentric region of chromosome 17 and to chromosome 7, respectively. *Genomics* 21:419-422.

56. Kishimoto J, Spurr N, Liao M, Lizhi L, Emson PC, and Xu W. 1992. Localization of brain nitric oxide synthase (NOS) to human chromosome 12. *Genomics* 14:802-804.
57. Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, and Moncada S. 1990. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101:746-752.
58. Moncada S, Palmer RMJ, and Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-142.
59. Murad F, Ishii K, Forstermann U, Gorsky L, Kerwin JF, Pollock J, and Heller M. 2004. EDRF is an intracellular second messenger and autacoid to regulate cyclic GMP synthesis in many cells. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 24:441-448.
60. Lee MR, Li L, and Kitazawa T. 1997. Cyclic GMP causes Ca desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem* 272:5063-5068.
61. Ishikawa T, Hume JR, and Keef KD. 1993. Regulation of Ca<sup>2+</sup> channels by cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 73:1128-1137.
62. Sumii K and Sperelakis N. 2003. cGMP-dependent protein kinase regulation of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rat ventricular myocytes. *Circ Res* 77:803-812.
63. Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, and Nelson MT. 1993. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 265:C299-C303.

64. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, and Cohen RA. 1994. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels. *Nature* 368:850-853.
65. Vanhoutte PM. 1997. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J* 18:E19-E29.
66. Biffi WL, Moore EE, Moore FA, and Barnett C. 1996. Nitric oxide reduces endothelial expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1. *J Surg Res* 63:328-332.
67. Spiecker M, Peng HB, and Liao JK. 1997. Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of I $\kappa$ B $\alpha$ . *J Biol Chem* 272:30969-30974.
68. Gryglewski RJ. 1995. Interactions between endothelial mediators. *Pharmacol Toxicol* 77:1-9.
69. Janssens S, Flaherty D, Nong Z, Varenne O, van Pelt N, Haustermans C, Zoldhelyi P, Gerard R, and Collen D. 1998. Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. *Circulation* 97:1274-1281.
70. Myers PR and Tanner MA. 1998. Vascular endothelial cell regulation of extracellular matrix collagen: role of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:717-722.
71. Ziegler T, Silacci P, Harrison VJ, and Hayoz D. 1998. Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension* 32:351-355.

72. Harrison DG, Sayegh H, Ohara Y, Inoue N, and Venema RC. 1996. Regulation of expression of the endothelial cell nitric oxide synthase. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:251-255.
73. Woodman CR, Muller JM, Laughlin MH, and Price EM. 1997. Induction of nitric oxide synthase mRNA in coronary resistance arteries isolated from exercise-trained pigs. *Am J Physiol* 273:H2575-H2579.
74. Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, and Bender JR. 1997. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Circ Res* 81:885-892.
75. Chen G, Suzuki H, and Weston AH. 1988. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* 95:1165-1174.
76. Bogle RG, Coade SB, Moncada S, Pearson JD, and Mann GE. 1991. Bradykinin and ATP stimulate L-arginine uptake and nitric oxide release in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 180:926-932.
77. Hu ZW, Miller JW, and Hoffman BB. 1994. Induction of enhanced release of endothelium-derived relaxing factor after prolonged exposure to alpha-adrenergic agonists: role in desensitization of smooth muscle contraction. *J Cardiovasc Pharmacol* 23:337-343.
78. Mankad PS, Chester AH, and Yacoub MH. 1991. 5-Hydroxytryptamine mediates endothelium dependent coronary vasodilation in the isolated rat heart by the release of nitric oxide. *Cardiovasc Res* 25:244-248.
79. Grser T and Rubanyi GM. 1992. Different mechanisms of hypoxic relaxation in canine coronary arteries and rat abdominal aortas. *J Cardiovasc Pharmacol* 20:S117-S119.

80. Kendrick KM, Guevara-Guzman R, Zorrilla J, Hinton MR, Broad KD, Mimmack M, and Ohkura S. 1997. Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature* 388:670-674.
81. Stenger S, Thuring H, Rollinghoff M, and Bogdan C. 1994. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med* 180:783-793.
82. Stuehr D and Nathan C. 1989. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169:1543-1555.
83. Gregory SH, Wing EJ, Hoffman RA, and Simmons RL. 1993. Reactive nitrogen intermediates suppress the primary immunologic response to listeria. *J Immunol* 150:2901-2909.
84. MacMicking J, Xie Q-w, and Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323-350.
85. Zhuo M, Small SA, Kandel ER, and Hawkins RD. 1993. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science* 260:1946-1950.
86. Kuriyama H and Suzuki H. 1978. The effects of acetylcholine on the membrane and contractile properties of smooth muscle cells of the rabbit superior mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 64:493-501.
87. Bolton TB, Lang RJ, and Takewaki T. 1984. Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J Physiol* 351:549-572.



88. Bolton TB and Clapp LH. 1986. Endothelial-dependent relaxant actions of carbachol and substance P in arterial smooth muscle. *Br J Pharmacol* 87:713-723.
89. Félétou M and Vanhoutte PM. 1988. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol* 93:515-524.
90. Cohen RA, Plane F, Najibi S, Huk I, Malinski T, and Garland CJ. 1997. Nitric oxide is the mediator of both endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization of the rabbit carotid artery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:4193-4198.
91. Kuo PC and Abe KY. 1995. Cytokine-mediated production of nitric oxide in isolated rat hepatocytes is dependent on cytochrome P450III activity. *FEBS lett* 360:10-14.
92. Kuo PC, Abe KY, and Dafoe DC. 1995. Cytochrome P450IIIA activity and cytokine-mediated synthesis of nitric oxide. *Surgery* 118:310-317.
93. Komori K, Lorenz RR, and Vanhoutte PM. 1988. Nitric oxide, ACh, and electrical and mechanical properties of canine arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 255:H207-H212.
94. Illiano SC, Nagao T, and Vanhoutte PM. 1992. Calmidazolium, a calmodulin inhibitor, inhibits endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the canine coronary artery. *Br J Pharmacol* 107:387-392.
95. Nagao T, Illiano SC, and Vanhoutte PM. 1992. Calmodulin antagonists inhibit endothelium-dependent hyperpolarization in the canine coronary artery. *Br J Pharmacol* 107:382-386.

96. Rubanyi GM and Vanhoutte PM. 1986. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor(s). *Am J Physiol* 250:H822-H827.
97. Gryglewski RJ, Palmer RMJ, and Moncada S. 1986. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320:454-456.
98. Kaw S and Hecker M. 1999. Endothelium-derived hyperpolarizing factor, but not nitric oxide or prostacyclin release is resistant to menadione-induced oxidative stress in the bovine coronary artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 359:133-139.
99. Shimokawa H and Matoba T. 2004. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol Res* 49:543-549.
100. Brandes RP, Schmitz-Winnenthal F, Félétou M, Gödecke A, Huang PL, Vanhoutte PM, Fleming I, and Busse R. 2000. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knock-out mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9747-9752.
101. Thorin E, Huang PL, Fishman MC, and Bevan JA. 1998. Nitric oxide inhibits alpha2-adrenoceptor-mediated endothelium-dependent vasodilation. *Circ Res* 82:1323-1329.
102. Olmos L, Mombouli JV, Illiano SC, and Venema RC. 1995. cGMP mediates the desensitization to bradykinin in isolated canine coronary arteries. *Am J Physiol* 268:H865-H870.

103. Thollon C, Fournet-Bourguignon MP, Saboureau D, Lesage L, Reure H, Vanhoutte PM, and Vilaine JP. 2002. Consequences of reduced production of NO on vascular reactivity of porcine coronary arteries after angioplasty: importance of EDHF. *Br J Pharmacol* 136:1153-1161.
104. Cohen RA and Vanhoutte PM. 1995. Endothelium-dependent hyperpolarization: beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 92:3337-3349.
105. Nagao T, Illiano SC, and Vanhoutte PM. 1992. Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the arterial tree of the rat. *Am J Physiol* 263:1090-1094.
106. He GW. 1997. Hyperkalemia exposure impairs EDHF-mediated endothelial function in the human coronary artery. *Ann Thorac Surg* 63:84-87.
107. He GW and Liu ZG. 2001. Comparison of nitric oxide release and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization between human radial and internal mammary arteries. *Circulation* 104:1344-1349.
108. Kemp BK and Cocks TM. 1997. Evidence that mechanisms dependent and independent of nitric oxide mediate endothelium-dependent relaxation to bradykinin in human small resistance-like coronary arteries. *Br J Pharmacol* 120:757-762.
109. Miura H, Liu Y, and Gutterman DD. 1999. Human coronary arteriolar dilation to bradykinin depends on membrane hyperpolarization: contribution to nitric oxide and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Circulation* 99:3132-3138.

110. Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Salto T, Miura M, and Gutterman DD. 2003. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res* 92:e31-e40.
111. Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA, and Vanhoutte PM. 1993. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary artery. *J Clin Invest* 92:2867-2871.
112. Thorin E. 2001. Different contribution of endothelial nitric oxide in the relaxation of human coronary arteries of ischemic and dilated cardiomyopathic hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 37:227-232.
113. Archer SL, Gragasin FS, Wu X, Wang S, McMurthy S, Kim DH, Platonov M, Koshal A, Hashimoto K, Campbell WB, Falck JR, and Michelakis ED. 2003. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating BK(Ca) channels. *Circulation* 107:769-776.
114. Hamilton CA, Williams R, Pathi V, Berg G, McArthur K, McPhaden AR, Reid JL, and Dominiczak AF. 1999. Pharmacological characterization of endothelium-dependent relaxation in human radial artery: comparison with internal thoracic artery. *Cardiovasc Res* 42:214-223.
115. Kessler P, Lischke V, and Hecker M. 1996. Etomidate and thiopental inhibit the release of endothelium-derived-hyperpolarizing factor in the human renal artery. *Anesthesiology* 84:1485-1488.
116. Bussemaker E, Popp R, Binder J, Busse R, and Fleming I. 2003. Characterization of the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) response in the human interlobar artery. *Kidney Int* 63:1749-1755.

117. Petersson J, Zygmunt PM, Brandt L, and Högestätt ED. 1995. Substance P-induced relaxation and hyperpolarisation in human cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 115:889-894.
118. Petersson J, Zygmunt PM, and Högestätt ED. 1997. Characterization of the potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 20:1344-1350.
119. Thorin E, Nguyen TD, and Bouthillier A. 1998. Control of vascular tone by endogenous endothelin-1 in human pial arteries. *Stroke* 29:175-180.
120. Pascoal IF and Umans JG. 1996. Effect of pregnancy on mechanisms of relaxation in human omental microvessels. *Hypertension* 28:183-187.
121. Wallerstedt SM and Bodelsson M. 1997. Endothelium-dependent relaxations by substance P in human isolated omental arteries and veins: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. *Br J Pharmacol* 120:25-30.
122. Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, and Takeshita A. 1997. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest* 100:2793-2799.
123. Buus NH, Simonsen U, Pilegaard HK, and Mulvany MJ. 2000. Nitric oxide, prostanoid and non NO, non prostanoid involvement in acetylcholine relaxation of isolated human small arteries. *Br J Pharmacol* 129:184-192.
124. Coleman HA, Tare M, and Parkington HC. 2001. K<sup>+</sup> currents underlying the action of endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig and human blood vessels. *J Physiol* 531:359-373.

125. Halcox JP, Narayanan S, Cramer-Joyce L, Mincemoyer R, and Quyyumi AA. 2001. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human forearm microcirculation. *Am J Physiol* 280:112470-112477.
126. McIntyre CA, Buckley CH, Jones GC, Sandeep TC, Andrews RC, Elliot AI, Gray GA, Williams BC, McKnight JA, Walker BR, and Hadoke PW. 2001. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and potassium use different mechanisms to induce relaxation of human subcutaneous resistance arteries. *Br J Pharmacol* 133:902-908.
127. Mehrke G and Daut J. 1990. The electrical response of cultured guinea-pig coronary endothelial cells to endothelium-dependent vasodilators. *J Physiol* 430:251-272.
128. Marchenko SM and Sage SO. 1993. Electrical properties of resting and acetylcholine-stimulated endothelium in intact rat aorta. *J Physiol* 462:735-751.
129. Gordon JL and Martin W. 1983. Endothelium-dependent relaxation of the pig aorta: relationship to stimulation of  $^{86}\text{Rb}$  efflux from isolated endothelial cells. *Br J Pharmacol* 79:531-541.
130. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, and Weston A. 1998.  $\text{K}^+$  is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396:269-272.
131. Frieden M, Sollini M, and Bény J. 1999. Substance P and bradykinin activate different types of  $\text{K}_{\text{Ca}}$  currents to hyperpolarize cultured porcine coronary artery endothelial cells. *J Physiol* 519:361-371.

132. Véquaud P and Thorin E. 2001. Endothelial G protein B-Subunits trigger nitric-oxide but not endothelium-derived hyperpolarizing factor-dependent dilation in rabbit resistance arteries. *Circ Res* 89:716-722.
133. Tomioka H, Hattori Y, Fukao M, Watanabe H, Akaishi Y, Sato A, Kim TQ, Sakuma I, Kitabatake A, and Kanno M. 2001. Role of endothelial Ni<sup>2+</sup>-sensitive Ca<sup>2+</sup> entry pathway in regulation of EDHF in porcine artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H730-H737.
134. Dora KA, Garland CJ, Kwan HY, and Yao X. 2001. Endothelial cell protein kinase G inhibits release of EDHF through a PKG-sensitive cation channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H1272-H1277.
135. Kamouchi M, Droogmans G, and Nilius B. 1999. Membrane potential as a modulator of the free intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in agonist-activated endothelial cells. *Gen Physiol Biophys* 18:199-208.
136. Nilius B, Droogmans G, and Wondergem R. 2003. Transient receptor potential channels in endothelium: solving the calcium entry puzzle? *Endothelium* 10:5-15.
137. Okada T, Shimizu S, Wakamori M, Maeda A, Kurosaki T, Takada N, Imoto K, and Mori Y. 1998. Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca<sup>2+</sup> channel from mouse brain. *J Biol Chem* 273:10279-10287.
138. Schaefer M, Plant TD, Obukhov AG, Hofmann T, Gudermann T, and Schultz G. 2000. Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem* 275:17517-17526.

139. Sedova M, Klishin A, Huser J, and Blatter LA. 2000. Capacitive Ca<sup>2+</sup> entry is graded with degree of intracellular Ca<sup>2+</sup> store depletion in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol* 523:549-559.
140. Nilius B and Droogmans G. 2001. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 81:1415-1459.
141. Fleming I, Fisslthaler B, and Busse R. 1996. Interdependence of calcium signaling and protein tyrosine phosphorylation in human endothelial cells. *J Biol Chem* 271:11009-11015.
142. Ma HT, Venkatachalam K, Li HS, Montell C, Kurotaki T, Patterson RL, and Gill DL. 2001. Assessment of the role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the activation of transient receptor potential channels and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry channels. *J Biol Chem* 276:18888-18896.
143. Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G, Kuo T, Pessah I, Mignery G, Zhu X, Birnbaumer L, and Muallem S. 1998. Functional interaction between InsP<sub>3</sub> receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* 396:478-482.
144. Trepakova ES, Csutora P, Hunton DL, Marchase RB, Cohen RA, and Bolotina VM. 2000. Calcium influx factor directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275:26158-26163.
145. Quignard JF, Chataigneau T, Corriu C, Edwards G, Weston A, Félétou M, and Vanhoutte PM. 2002. Endothelium-dependent hyperpolarisation to acetylcholine in carotid artery of guinea-pig: role of lipoxygenase. *J Cardiovasc Pharmacol* 40:467-477.



146. Marrelli SP, Eckmann MS, and Hunte MS. 2003. Role of endothelial intermediate conductance  $K_{Ca}$  channels in cerebral EDHF-mediated dilations. *Am J Physiol* 285:H1590-H1599.
147. Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A, and Hobbs AJ. 2003. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1426-1431.
148. Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, and Busse R. 1999. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 401:493-497.
149. Randall MD, Alexander SPH, Bennett T, Boyd EA, Fry JR, Gardiner SM, Kemp PA, McCulloch AI, and Kendall DA. 1996. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun* 229:114-120.
150. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, and Takeshita A. 2000. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 106:1521-1530.
151. Sandow SL and Hill CE. 2000. Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. *Circ Res* 86:341-346.
152. Félétou M and Vanhoutte PM. 2004. EDHF: new therapeutic targets? *Pharmacol Res* 49:565-580.
153. Ellis EF, Moore SF, and Willoughby KA. 1995. Anandamide and  $\Delta^9$ -THC dilation of cerebral arterioles is blocked by indomethacin. *Am J Physiol* 38:H1859-H1864.

154. Deutsch DG, Goligorsky MS, Schmid PG, Krebsbach RJ, Schmid HHO, Das SK, Dey SK, Arreaza G, Thorup C, Stefano G, and Moore LC. 1997. Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J Clin Invest* 100:1538-1546.
155. Randall MD, McCulloch AI, and Kendall DA. 1997. Comparative pharmacology of endothelium-derived hyperpolarizing factor and anandamide in rat isolated mesentery. *Eur J Pharmacol* 333:191-197.
156. Pratt PF, Hillard CJ, Edgmond WS, and Campbell WB. 1998. N-arachidonylethanolamide relaxation of bovine coronary artery is not mediated by CB1 cannabinoid receptor. *Am J Physiol* 43:H375-H381.
157. Chaytor AT, Martin PEM, Evans WH, Randall MD, and Griffith TM. 1999. The endothelial component of cannabinoid-induced relaxation in rabbit mesenteric artery depends on gap junctional communication. *J Physiol (Lond)* 520:539-550.
158. Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, and Harder DR. 1999. Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca<sup>2+</sup> channel current. *Am J Physiol* 45:H2085-H2093.
159. Fleming I, Schermer B, Popp R, and Busse R. 1999. Inhibition of the production of endothelium-derived hyperpolarizing factor by cannabinoid receptor agonists. *Br J Pharmacol* 126:949-960.
160. Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H-h, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, and Hogestatt ED. 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature (Lond)* 400:452-457.
161. Fulton D and Quilley J. 1998. Evidence against anandamide as the hyperpolarizing factor mediating the nitric oxide-independent coronary

- vasodilator effect of bradykinin in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 286:1146-1151.
162. Kagota S, Yamaguchi Y, Nakamura K, Sugiura T, Waku K, and Kunitomo M. 2001. 2-Arachidonoylglycerol, a candidate of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Eur J Pharmacol* 415:233-238.
163. Jarai Z, Wagner JA, Varga K, Lake K, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer A, and Razdan G. 1999. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB<sub>1</sub> or CB<sub>2</sub> receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14136-14141.
164. Offertaler L, Mo FM, Batkai S, Liu J, Begg M, Razdan RK, Martin BR, Bukoski RD, and Kunos G. 2003. Selective ligands and cellular effectors of a G-protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 63:699-705.
165. Chen HH and Burnett JC. 1998. C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic peptide system. *J Cardiovasc Pharmacol* 32:S22-S28.
166. Maack T. 1996. Role of atrial natriuretic factor in volume control. *Kidney Int* 49:1732-1737.
167. Wei CM, Aarhus LL, Miller VM, and Burnett JC. 1993. Action of C-type natriuretic peptide in isolated canine arteries and veins. *Am J Physiol* 264:H71-H73.
168. Wei CM, Hu S, Miller VM, and Burnett JC. 1994. Vascular actions of C-type natriuretic peptide in isolated porcine coronary arteries and coronary vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 205:765-771.

169. Furuya M, Yoshida M, Hayashi Y, Ohnuma N, Minamino M, Kangawa K, and Matsuo H. 1991. C-type natriuretic peptide is a growth inhibitor of rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 177:927-931.
170. Hunt PJ, Richards AM, Espiner EA, Nicholls MG, and Yandle TG. 1994. Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 78:1428-1435.
171. Igaki T, Itoh H, Suga S, Hama N, Ogawa Y, Komatsu Y, Mukoyama M, Sugawara A, Yoshimasa T, Tanaka I, and Nakao K. 1996. C-type natriuretic peptide in chronic renal failure and its action in humans. *Kidney Int* 55:S144-S147.
172. Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Kambayashi Y, Inouye K, and et al. 1992. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 130:229-239.
173. Honing ML, Smits P, Morrison PJ, Burnett JC, and Rabelink TJ. 2001. C-type natriuretic peptide-induced vasodilation is dependent on hyperpolarization in human forearm resistance vessels. *Hypertension* 37:1179-1183.
174. Kontos HA, Wei EP, Povlishock JT, and Christman CW. 1984. Oxygen radicals mediate the cerebral arteriolar dilation from arachidonate and bradykinin in cats. *Circ Res* 55:295-303.
175. Arroyo CM, Carmichael AJ, Bouscarel B, Liang JH, and Weglicki WB. 1990. Endothelial cells as a source of oxygen-free radicals. *Free Radic Res Commun* 9:287-296.

176. Griending KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, and Alexander RW. 1994. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74:1141-1148.
177. Holland JA, Meyer JW, Chang MM, O'Donnell RW, Johnson DK, and Ziegler LM. 1998. Thrombin stimulated reactive oxygen species production in cultured human endothelial cells. *Endothelium* 6:113-121.
178. Sohn HY, Keller M, Gloe T, Morawietz H, Rueckschloss U, and Pohl U. 2000. The small G-protein Rac mediates depolarization-induced superoxide formation in human endothelial cells. *J Biol Chem* 275:18745-18750.
179. Xiao L, Pimentel DR, Wang J, Singh K, Colucci WS, and Sawyer DB. 2002. Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in  $\alpha_1$ -adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 282:C926-C934.
180. De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, and Griending KK. 1998. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res* 82:1094-1101.
181. Fulton D, McGiff JC, Wolin MS, Kaminski P, and Quilley J. 1997. Evidence against a cytochrome P450-derived reactive oxygen species as the mediator of the nitric oxide-independent vasodilator effect of bradykinin in the perfused heart of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 280:702-709.
182. Puntarulo S and Cederbaum AI. 1998. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic Biol Med* 24:1324-1330.
183. Fleming I, Michaelis UR, Bredenkotter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, and Busse R. 2001. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase

(Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive species in coronary arteries. *Circ Res* 88:44-51.

184. Phung CD, Ezieme JA, and Turrens JF. 1994. Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 315:479-482.
185. Slot JW, Geuze HJ, Freeman BA, and Crapo JD. 1986. Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. *Lab Invest* 55:363-371.
186. Crosti N, Bajer J, Serra A, Rigo A, Scarpa M, and Viglino P. 1985. Coordinate expression of MnSOD and CuZnSOD in human fibroblasts. *Exp Cell Res* 160:396-402.
187. Raha S, McEachern GE, Myint AT, and Robinson BH. 2000. Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 29:170-180.
188. Cadenas E and Davies KJ. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29:222-230.
189. Ellis A and Triggle CR. 2003. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol* 81:1013-1028.
190. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, and Pritchard KA. 1998. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9220-9225.
191. Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, and Zweier JL. 1996. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells

leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6770-6774.

192. Heinzl B, John M, Klatt P, Böhme E, and Mayer B. 1992. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 281:627-630.
193. Sobey CG, Heistad DD, and Faraci FM. 1997. Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K<sup>+</sup> channels. *Stroke* 28:2290-2294.
194. Yang ST, Mayhan WG, Faraci FM, and Heistad DD. 1991. Mechanisms of impaired endothelium-dependent cerebral vasodilation in response to bradykinin in hypertensive rats. *Stroke* 22:1177-1182.
195. Needleman P, Jakschik B, and Johnson EM. 1973. Sulfhydryl requirement for relaxation of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 187:324-331.
196. Beny JL and von der Weid PY. 1991. Hydrogen peroxide: an endogenous smooth muscle cell hyperpolarizing factor. *Biochem Biophys Res Commun* 176:378-384.
197. Wei EP, Kontos HA, and Beckman JS. 1996. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am J Physiol* 271:H1262-H1266.
198. Filipovic DM and Reeves WB. 1997. Hydrogen peroxide activates glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> channels in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* 272:C737-C743.

199. Boyer CS, Bannenberg GL, Neve EP, Ryrfeldt A, and Moldeus P. 1995. Evidence for the activation of the signal-responsive phospholipase A2 by exogenous hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol* 50:753-761.
200. Barlow RS, El Mowafy AM, and White RE. 2000. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> opens BKCa channels via the PLA2-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol* 279:H475-H483.
201. Thomas G and Ramwell P. 1986. Induction of vascular relaxation by hydroperoxides. *Biochem Biophys Res Commun* 139:102-108.
202. Iesaki T, Okada T, Shimada I, Yamaguchi H, and Ochi R. 1996. Decrease in Ca<sup>2+</sup> sensitivity as a mechanism of hydrogen peroxide-induced relaxation of rabbit aorta. *Cardiovasc Res* 31:820-825.
203. Tan CM, Xenoyannis S, and Feldman RD. 1995. Oxidant stress enhances adenylyl cyclase activation. *Circ Res* 77:710-717.
204. Faraci FM, Sobey CG, Chrissobolis S, Lund DD, Heistad DD, and Weintraub NL. 2001. Arachidonate dilates basilar artery by lipoxygenase-dependent mechanism and activation of K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol* 281:R246-R253.
205. Clyman RI, Saugstad OD, and Mauray F. 1989. Reactive oxygen metabolites relax the lamb ductus arteriosus by stimulating prostaglandin production. *Circ Res* 64:1-8.
206. Iida Y and Katusic ZS. 2001. Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide. *Stroke* 31:2224-2230.
207. Fujimoto S, Mori M, and Tsushima H. 2003. Mechanisms underlying the hydrogen peroxide-induced, endothelium-independent relaxation of the norepinephrine-contraction in guinea-pig aorta. *Eur J Pharmacol* 459:65-73.



208. Pomposiello S, Rhaleb NE, Alva M, and Carretero OA. 1999. Reactive oxygen species: role in the relaxation induced by bradykinin or arachidonic acid via EDHF in isolated porcine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 34:567-574.
209. Barlow RS and White RE. 1998. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BK<sub>Ca</sub> channel activity. *Am J Physiol* 275:H1283-H1289.
210. Ellis A, Pannirselvam M, Anderson TJ, and Triggle CR. 2003. Catalase has negligible inhibitory effects on endothelium-dependent relaxations in mouse isolated aorta and small mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 140:1193-1200.
211. Itoh T, Kajikuri J, Hattori T, Kusama N, and Yamamoto T. 2003. Involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in superoxide dismutase-induced enhancement of endothelium-dependent relaxation in rabbit mesenteric resistance artery. *Br J Pharmacol* 139:444-456.
212. Elmoselhi AB and Grover AK. 1999. Peroxide sensitivity of endothelin responses in coronary artery smooth muscle: ET<sub>A</sub> vs ET<sub>B</sub> pathway. *Mol Cell Biochem* 202:47-52.
213. Kako K, Kato M, Matsuoka T, and Mustapha A. 1988. Depression of membrane-bound Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by free radicals and ischemia of kidney. *Am J Physiol* 254:C330-C337.
214. Gill JS, McKenna WJ, and Camm AJ. 1995. Free radicals irreversibly decrease Ca<sup>2+</sup> currents in guinea-pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 292:337-340.

215. Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, and Busse R. 1994. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol* 481:407-414.
216. Plane F, Pearson T, and Garland CJ. 1995. Multiple pathways underlying endothelium-dependent relaxation in the rabbit isolated femoral artery. *Br J Pharmacol* 115:31-38.
217. Chaytor AT, Evans WH, and Griffith TM. 1998. Central role of heterocellular gap junctional communication in endothelium-dependent relaxations of rabbit arteries. *J Physiol* 508:561-573.
218. Chaytor AT, Taylor HJ, and Griffith TM. 2002. Gap junction-dependent and -independent EDHF-type relaxations may involve smooth muscle cAMP accumulation. *Am J Physiol* 282:H1548-H1555.
219. Chaytor AT, Edwards DH, Bakker LM, and Griffith TM. 2003. Distinct hyperpolarizing and relaxant roles for gap junctions and endothelium-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in NO-independent relaxations of rabbit arteries. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15212-15217.
220. Perkins GA, Goodenough DA, and Sosinsky GE. 1998. Formation of the gap junction intercellular channels require a 30 degree rotation for interdigitating two apposing connexons. *J Mol Biol* 277:171-177.
221. Christ GJ, Spray DC, el-Sabban M, Moore LK, and Brink PR. 1996. Gap junctions in vascular tissue. Evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone. *Circ Res* 79:631-646.
222. Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, and Takeshita A. 1996. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size

- decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 28:703-711.
223. Yamamoto Y, Fukuta H, Nakahira Y, and Suzuki H. 1998. Blockade by 18B-glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles. *J Physiol* 511:501-508.
224. Yamamoto Y, Imaeda K, and Suzuki H. 1999. Endothelium-dependent hyperpolarization and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles. *J Physiol* 514:505-513.
225. Coleman HA, Tare M, and Parkington HC. 2001. EDHF is not K<sup>+</sup> but may be due to spread of current from the endothelium in guinea-pig arteriole. *Am J Physiol* 280:H2478-H2483.
226. Chaytor AT, Martin PEM, Edwards DH, and Griffith TM. 2001. Gap junctional communication underpins EDHF-type relaxations evoked by ACh in the rat hepatic artery. *Am J Physiol* 280:H2441-H2450.
227. Dora KA, Martin PEM, Chaytor AT, Evans WH, Garland CJ, and Griffith TM. 1999. Role of heterocellular gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: inhibition by a connexin mimetic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 254:27-31.
228. Edwards DH, Thollon C, Gardener MJ, Félétou M, Vilaine JP, Vanhoutte PM, and Weston A. 2000. Role of gap junctions and EETs in endothelium-dependent hyperpolarization of porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* 129:1145-1154.
229. Griffith TM and Taylor HJ. 1999. Cyclic AMP mediates EDHF-type relaxations of rabbit jugular vein. *Biochem Biophys Res Commun* 263:52-57.

230. Doughty JM, Boyle JP, and Langton PD. 2000. Potassium does not mimic EDHF in rat mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 130:1174-1182.
231. Berman RS, Martin PEM, Evans WH, and Griffith TM. 2002. Relative contributions of NO and gap junctional communication to endothelium-dependent relaxations of rabbit resistance arteries vary with vessel size. *Microvasc Res* 63:115-128.
232. Sandow SL, Tare M, Coleman HA, Hill CE, and Parkington HC. 2002. Involvement of myoendothelial gap junctions in the actions of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circ Res* 90:1108-1113.
233. Beny JL. 1999. Information networks in the arterial wall. *NIPS* 14:68-73.
234. Emerson GG and Segal SS. 2000. Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role in vasomotor control. *Circ Res* 87:474-479.
235. Emerson GG and Segal SS. 2001. Electrical activation of endothelium evokes vasodilatation and hyperpolarization along hamster feed arteries. *Am J Physiol* 280:H160-H167.
236. Abudara V, Eyzaguirre C, and Saez JC. 2000. Short- and long-term regulation of rat carotid body gap junctions by cAMP. Identification of connexin43, a gap junction subunit. *Adv Exp Med Biol* 75:359-369.
237. Grazul-Bilska AT, Reynolds LP, Bilski JJ, and Redmer DA. 2001. Effects of second messengers on gap junctional intercellular communication of ovine luteal cells throughout the estrous cycle. *Biol Reprod* 65:777-783.
238. Paulson AF, Lampe PD, Meyer RA, Tenbroek E, Atkinson MM, Walseth TF, and Johnson RG. 2000. Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in

gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *J Cell Sci* 113:3037-3049.

239. Kamata K, Umeda F, and Kasuya Y. 1996. Possible existence of novel endothelium-derived relaxing factor in the endothelium of rat mesenteric arterial bed. *J Cardiovasc Pharmacol* 27:601-606.
240. Taylor HJ, Chaytor AT, Edwards DH, and Griffith TM. 2001. Gap junction-dependent increases in smooth muscle cAMP underpin the EDHF phenomenon in rabbit arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 283:583-589.
241. Capdevila JH, Chacos N, Werringloer J, Prough RA, and Estabrook RW. 1981. Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:5362-5366.
242. Pinto A, Abraham NG, and Mullane KM. 1987. Arachidonic acid-induced endothelial-dependent relaxations of canine coronary arteries: contribution of a cytochrome P450 dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 240:856-882.
243. Rubanyi GM and Vanhoutte PM. 1987. Nature of endothelium-derived relaxing factor: are there two relaxing mediators? *Circ Res* 61:61-67.
244. Ma YH, Gebremedhin D, Schwartzman ML, Falck JR, Clark JE, Masters BS, Harder DR, and Roman RJ. 1993. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is an endogenous vasoconstrictor of canine renal arcuate arteries. *Circ Res* 72:126-136.
245. Fleming I. 2004. Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s). *Pharmacol Res* 49:525-533.

246. Fulton D, McGiff JC, and Quilley J. 1992. Contribution of NO and cytochrome P-450 to the vasodilator effect of bradykinin in the rat kidney. *Br J Pharmacol* 107:722-725.
247. Imig JD, Falck JR, Wei S, and Capdevila JH. 2001. Epoxygenase metabolites contribute to nitric oxide-independent afferent vasodilation in response to bradykinin. *J Vasc Res* 38:247-255.
248. Feddersen CO, Chang S, Czartalomna J, and Voelkel NF. 1990. Arachidonic acid causes cyclooxygenase-dependent and -independent pulmonary vasodilation. *J Appl Physiol* 68:1799-1808.
249. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, and Harder DR. 1996. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 78:415-423.
250. Campbell WB and Harder DR. 1999. Endothelium-derived hyperpolarizing factors and vascular cytochrome P-450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of tone. *Circ Res* 84:484-488.
251. Eckman DM, Hopkins N, McBride C, and Keef KD. 1998. Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in guinea-pig coronary artery: role of epoxyeicosatrienoic acid. *Br J Pharmacol* 124:181-189.
252. Nishikawa Y, Stepp DW, and Chilian WM. 1999. In vivo location and mechanism of EDHF-mediated vasodilation in canine coronary microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277:H1252-H1259.
253. Bolz SS, Fisslthaler B, Pieperhoff S, De Wit C, Fleming I, Busse R, and Pohl U. 2000. Antisense oligonucleotides against cytochrome P-450 2C8 attenuate EDHF-mediated  $Ca^{2+}$  changes and dilation in isolated resistance arteries. *FASEB J* 14:255-260.

254. Dong H, Waldron GJ, Galipeau D, Cole WC, and Triggle CR. 1997. NO/PGI<sub>2</sub>-independent vasorelaxation and the cytochrome P-450 pathway in rabbit carotid artery. *Br J Pharmacol* 120:695-701.
255. Lischke V, Busse R, and Hecker M. 1995. Selective inhibition by barbiturates of the synthesis of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the rabbit carotid artery. *Br J Pharmacol* 115:969-974.
256. Coats P, Johnston F, MacDonald J, McMurray JJ, and Hillier C. 2001. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: identification and mechanisms of action in human subcutaneous resistance arteries. *Circulation* 103:1702-1708.
257. Adeagbo AS. 1997. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: characterization as a cytochrome P-450 1A-linked metabolite of arachidonic acid in perfused rat mesenteric prearteriolar bed. *Am J Hypertens* 10:763-771.
258. Chen G and Cheung DW. 1996. Modulation of endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in rat mesenteric artery by cytochrome P-450 enzyme activity. *Circ Res* 79:827-833.
259. Keeney DS, Skinner C, Travers JB, Capdevila JH, Nanney LB, King LE Jr, and Waterman MR. 1998. Differentiating keratinocytes express as novel cytochrome P-450 enzyme, CYP2B19, having arachidonate monooxygenase activity. *J Biol Chem* 273:32071-32079.
260. Knickle LC and Bend JR. 1992. Dose-dependent, mechanism-based inactivation of cytochrome P-450 monooxygenases in vivo by 1-aminobenzotriazole in liver, lung, and kidney of untreated, phenobarbital-treated, and B-naphthoflavone-treated guinea pigs. *Can J Physiol Pharmacol* 70:1610-1617.

261. Laethem RM, Halpert JR, and Koop DR. 1994. Epoxidation of arachidonic acid as an active-site probe of cytochrome P-450 2B isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1206:42-48.
262. Ma J, Qu W, Scarborough PE, Tomer KB, Moomaw CR, Maronpot R, Davis LS, Breyer MD, and Zeldin DC. 1999. Molecular cloning, enzymatic characterization, developmental expression, and cellular localization of a mouse cytochrome P-450 highly expressed in kidney. *J Biol Chem* 274:17777-17788.
263. Makita K, Falck JR, and Capdevila JH. 1996. Cytochrome P-450, the arachidonic acid cascade, and hypertension: new vistas for an old enzyme system. *FASEB J* 10:1456-1463.
264. Rifkind AB, Lee C, Chang TK, and Waxman DJ. 1995. Arachidonic acid metabolism by human P-450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxidation in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 320:380-389.
265. Nguyen X, Wang MH, Reddy KM, Falck JR, and Shewartzman ML. 1999. Kinetic profile of the rat CYP4A isoforms: arachidonic acid metabolism and isoform-specific inhibitors. *Am J Physiol* 276:R1691-R1700.
266. Fisslthaler B, Popp R, Michaelis UR, Kiss L, Fleming I, and Busse R. 2001. Cyclic stretch enhances the expression and activity of coronary endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase. *Hypertension* 38:1427-1432.
267. Earley S and Walker BR. 2002. Endothelium-dependent blunting of myogenic responsiveness after chronic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H2202-H2209.



268. Gerbal-Chaloin S, Daujat M, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Vilarem MJ, and Maurel P. 2002. Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 277:209-217.
269. Fischer V, Johanson L, Heitz F, Tullman R, Graham E, Baldeck JP, and Robinson WT. 1999. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor fluvastatin: effect on human cytochrome P-450 and implications for metabolic drug interactions. *Drug Metab Dispos* 27:410-416.
270. Fisslthaler B, Hinsch N, Chataigneau T, Popp R, Kiss L, Busse R, and Fleming I. 2000. Nifedipine increases cytochrome P4502C expression and EDHF-mediated responses in coronary arteries. *Hypertension* 36:270-275.
271. Oesch-Bartlomowicz B, Richter B, Becker R, Vogel S, Padma PR, Hengstler JG, and Oesch F. 2001. cAMP-dependent phosphorylation of CYP2B1 as a functional switch for cyclophosphamide activation and its hormonal control in vivo and in vitro. *Int J Cancer* 94:733-742.
272. Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Mullick J, Sepuri NB, Otvos L, Pain D, and Avadhani NG. 1999. Dual targeting of cytochrome P4502B1 to endoplasmic reticulum and mitochondria involves a novel signal activation by cyclic AMP-dependent phosphorylation at Ser128. *EMBO J* 18:5494-5504.
273. Korsmeyer KK, Davoll S, Figueiredo-Pereira ME, and Correia MA. 1999. Proteolytic degradation of heme-modified hepatic cytochromes P450: a role for phosphorylation, ubiquitination, and the 26S proteasome? *Arch Biochem Biophys* 365:31-44.
274. Yu Z, Xu F, Huse LM, Morisseau C, Draper AJ, Newman JW, Parker C, Graham L, Engler MM, Hammock BD, Zeldin DC, and Kroetz DL. 2000.

Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res* 87:992-998.

275. Fang X, Kaduce TL, Weintraub NL, Harmon S, Teesch LM, Morisseau C, Thompson DA, Hammock BD, and Spector AA. 2001. Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells. Implications for the vascular effects of soluble epoxide hydrolase inhibition. *J Biol Chem* 276:14867-14874.
276. Takahashi K, Capdevila JH, Karara A, Falck JR, Jacobson HR, and Badr KF. 1990. Cytochrome P-450 arachidonate metabolites in rat kidney: characterization and hemodynamic responses. *Am J Physiol* 258:F781-F789.
277. Gebremedhin D, Ma YH, Falck JR, Roman RJ, VanRollins M, and Harder DR. 1992. Mechanism of action of cerebral epoxyeicosatrienoic acids on cerebral arterial smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 263:H519-H525.
278. Li PL and Campbell WB. 1997. Epoxyeicosatrienoic acids activate K<sup>+</sup> channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein. *Circ Res* 80:877-884.
279. Baron A, Frieden M, and Beny JL. 1997. Epoxyeicosatrienoic acids activate a high-conductance, Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel on pig coronary artery endothelial cells. *J Physiol (Lond)* 504:537-543.
280. Esguerra M, Wang J, Foster CD, Adelman JP, North RA, and Levitan IB. 1994. Cloned Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel modulated by a functionally associated protein kinase. *Nature* 369:563-565.

281. Desaphy JF and Joffre M. 1998. Effect of cyclic AMP on the calcium-dependent potassium conductance of rat Leydig cells. *Can J Physiol Pharmacol* 76:649-656.
282. Imig JD, Inscho EW, Deichamnn PC, Reddy KM, and Falck JR. 1999. Afferent arteriolar vasodilation to the sulfonimide analog of 11,12-epoxyeicosatrienoic acid involves protein kinase A. *Hypertension* 33:408-413.
283. Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, and Weston A. 2002. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sciences* 23:374-380.
284. Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, and Nilius B. 2003. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels 434. *Nature* 424:434-438.
285. Popp R, Brandes RP, Ott G, Busse R, and Fleming I. 2002. Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Circ Res* 90:800-806.
286. Hoepfl B, Rodenwaldt B, Pohl U, and De Wit C. 2002. EDHF, but not NO or prostaglandins, is critical to evoke a conducted dilation upon ACh in hamster arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H996-H1004.
287. Capdevila JH, Kishore V, Dishman E, Blair IA, and Falck JR. 1987. A novel pool of rat liver inositol and ethanolamine phospholipids contains epoxyeicosatrienoic acids (EETs). *Biochem Biophys Res Commun* 146:638-644.
288. VanRollins M, Kaduce TL, Fang X, Knapp HR, and Spector AA. 1996. Arachidonic acid diols produced by cytochrome P-450 monooxygenases are

incorporated into phospholipids of vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 271:14001-14009.

289. Weintraub NL, Fang X, Kaduce TL, VanRollins M, Chatterjee P, and Spector AA. 1997. Potentiation of endothelium-dependent relaxation by epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res* 81:258-267.
290. Zygmunt PM, Edwards G, Weston A, Davis SC, and Hogestatt ED. 1996. Effects of cytochrome P450 inhibitors on EDHF-mediated relaxation in the rat hepatic artery. *Br J Pharmacol* 118:1147-1152.
291. Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuma I, and Kitabatake A. 1997. Evidence against a role of cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolites in endothelium-dependent hyperpolarization by acetylcholine in rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 120:439-446.
292. Chataigneau T, Félétou M, Duhault J, and Vanhoutte PM. 1998. Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *Br J Pharmacol* 123:574-580.
293. Drummond GR, Selemidis S, and Cocks TM. 2000. Apamin-sensitive, non-nitric oxide (NO) endothelium-dependent relaxations to bradykinin in the bovine isolated coronary artery: no role for cytochrome P450 and K<sup>+</sup>. *Br J Pharmacol* 129:811-819.
294. De Mey J and Vanhoutte PM. 1980. Interaction between Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> exchanges and the direct inhibitory effects of acetylcholine on canine femoral arteries. *Circ Res* 46:826-836.

295. Fleming WW. 1980. The electrogenic Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> pump in smooth muscle. Physiologic and pharmacologic significance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20:129-149.
296. Haddy FJ. 1983. Potassium effects on contraction in arterial smooth mediated by Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *Fed Proc* 42 :239-245.
297. Cantley LC. 1986. Ion transport systems sequenced. *Trends Neurosci* 9:1-3.
298. Gick GG, Hatala MA, Chon D, and Ismail-Beigi F. 1993. Na,K-ATPase in several tissues of the rat, tissue-specific expression of subunit mRNAs and enzyme activity. *J Memb Biol* 131:229-236.
299. Apell HJ. 1989. Electrogenic properties of the Na,K pump. *J Memb Biol* 110:1103-1114.
300. Marin J and Redondo J. 1999. Vascular sodium pump: endothelial modulation and alterations in some pathological processes and aging. *Pharmacol Ther* 84:249-271.
301. McCarron JG and Halpern W. 1990. Potassium dilates rat cerebral arteries by two independent mechanisms. *Am J Physiol* 259:H902-H908.
302. Edwards FR and Hirst GDS. 1988. Inward rectification in submucosal arterioles of guinea-pig ileum. *J Physiol (Lond)* 404:437-454.
303. Lopatin AN, Makhina EN, and Nichols CG. 1994. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature (Lond)* 372:366-369.
304. Vandenberg CA. 1994. Cardiac inward rectifier potassium channel. *Ion Channels in the Cardiovascular System, ed. Spooner PM, Brown AM.*145-167.

305. Armstrong CM. 1971. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channel of giant axons. *J Gen Physiol* 58:413-437.
306. Hille B and Schwartz W. 1978. Potassium channels as multi-ion single file pores. *J Gen Physiol* 72:409-442.
307. Knot HJ, Zimmermann PA, and Nelson MT. 1996. Extracellular K<sup>+</sup>-induced hyperpolarization and dilations of rat coronary cerebral arteries involve inward rectifier channels. *J Physiol (Lond)* 492:419-430.
308. Quayle JM, McCarron JG, Brayden JE, and Nelson MT. 1993. Inward rectifier K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from rat resistance sized cerebral arteries. *Am J Physiol* 265:C1363-C1370.
309. Zaritzky JJ, Eckman DM, Wellman GC, and Nelson MT. 2000. Targeted disruption of K<sub>ir</sub>2.1 and K<sub>ir</sub>2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in K<sup>+</sup>-mediated vasodilation. *Circ Res* 87:160-166.
310. Weston AH, Richards GR, Burnham MP, Félétou M, Vanhoutte PM, and Edwards G. 2002. K<sup>+</sup>-induced hyperpolarization in rat mesenteric artery: identification, localization and role of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases. *Br J Pharmacol* 136:918-926.
311. Lacy PS, Pilkington G, Hanvesakul R, Fish HJ, Boyle JP, and Thurston H. 2000. Evidence against potassium as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat mesenteric small arteries. *Br J Pharmacol* 129:605-611.
312. Quignard JF, Félétou M, Thollon C, Vilaine JP, Duhault J, and Vanhoutte PM. 1999. Potassium ions and endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig carotid and porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 127:27-34.

313. Dora KA and Garland CJ. 2001. Properties of smooth muscle hyperpolarization and relaxation to  $K^+$  in the rat isolated mesenteric artery. *Am J Physiol* 280:H2424-H2429.
314. Richards GR, Weston AH, Burnham MP, Félétou M, Vanhoutte PM, and Edwards G. 2001. Suppression of  $K^+$ -induced hyperpolarization by phenylephrine in rat mesenteric artery: relevance to studies of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Br J Pharmacol* 134:1-5.
315. Doughty JM, Boyle JP, and Langton PD. 2001. Blockade of chloride channels reveals relaxations of rat small mesenteric arteries to raised potassium. *Br J Pharmacol* 132:293-301.
316. Schirmacher K, Nonhoff D, Wiemann M, Peterson-Grine E, Brink PR, and Bingmann D. 1996. Effects of calcium on gap junction between osteoblast-like cells in culture. *Calcif Tissue Int* 59:259-264.
317. Harris D, Martin PE, Evans WH, Kendall DA, Griffith TM, and Randall MD. 2000. Role of gap junctions in endothelium-derived hyperpolarizing factor responses and mechanisms of  $K^+$ -relaxation. *Eur J Pharmacol* 402:119-128.
318. Dora KA, Doyle MP, and Duling BR. 1997. Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6529-6534.
319. Dawes M, Sieniawska C, Delves T, Dwivedi R, Chowienczyk PJ, and Ritter JM. 2002. Barium reduces resting blood flow and inhibits potassium-induced vasodilatation in the human forearm. *Circulation* 105:1323-1328.
320. Edwards G, Félétou M, Gardener MJ, Thollon C, Vanhoutte PM, and Weston AH. 1999. Role of gap junctions in the responses to EDHF in rat and guinea-pig small arteries. *Br J Pharmacol* 128:1788-1794.

321. Ruiz E and Tejerina T. 1998. Relaxant effects of L-citrulline in rabbit vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 125:186-192.
322. Marx S, Vedernikov Y, Saade GR, and Garfield RE. 2000. Citrulline does not relax isolated rat and rabbit vessels. *Br J Pharmacol* 130:713-716.
323. Daniel EE, Wang YF, Salapatek AM, Mao YK, and Mori M. 2000. Arginosuccinate synthetase, arginosuccinate lyase and NOS in canine gastrointestinal tract: immunocytochemical studies. *Neurogastroenterol Motil* 12:317-334.
324. Berne RM. 1980. The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ Res* 47:807-813.
325. Iwamoto T, Umemura S, Toya Y, Uchibori T, Kogi K, Takagi N, and Ishii M. 1994. Identification of adenosine A<sub>2</sub>-receptor-cAMP system in human aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 199:905-910.
326. Kemp BK and Cocks TM. 1999. Adenosine mediates relaxation of human small resistance-like coronary arteries via A<sub>2B</sub> receptors. *Br J Pharmacol* 126:1796-2000.
327. Malmsjö M, Edvinsson L, and Erlinge D. 1998. P<sub>2U</sub>-receptor mediated endothelium-dependent but nitric oxide-independent vascular relaxation. *Br J Pharmacol* 123:719-729.
328. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, and Ganz P. 1986. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 315:1046-1051.
329. Thorin E. 2001. Influence of nitric oxide synthase inhibition and endothelin-1 receptor blockade on acetylcholine-induced coronary artery contraction in



- vitro in dilated and ischemic cardiomyopathies. *J Cardiovasc Pharmacol* 38:90-98.
330. Shimokawa H, Aarhus LL, and Vanhoutte PM. 1987. Porcine coronary arteries with regenerated endothelium have a reduced endothelium-dependent responsiveness to aggregating platelets and serotonin. *Circ Res* 61:256-270.
331. Shimokawa H, Flavahan NA, and Vanhoutte PM. 1989. Natural course of the impairment of endothelium-dependent relaxations after balloon endothelial removal in porcine coronary arteries. Possible dysfunction of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circ Res* 65:740-753.
332. Thorin E, Meerkin D, Bertrand OF, Paiement P, Joyal M, and Bonan R. 2000. Influence of postangioplasty beta-irradiation on endothelial function in porcine coronary arteries. *Circulation* 101:1430-1435.
333. Thollon C, Bidouard JP, Cambarrat C, Delescluse I, Villeneuve N, Vanhoutte PM, and Vilaine JP. 1999. Alteration of endothelium-dependent hyperpolarizations in porcine coronary arteries with regenerated endothelium. *Circ Res* 84:371-377.
334. Vanhoutte PM and Scott-Burden T. 1994. The endothelium in health and disease. *Texas Heart Inst J* 21:62-67.
335. Vanhoutte PM. 1991. Hypercholesterolemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxing factor by aggregating platelets. *Eur Heart J* 12:25-32.
336. Yeung AC, Vekshtein VI, Krantz S, Vita JA, Ryan TJ Jr, Ganz P, and Selwyn AP. 1991. The effect of atherosclerosis on the vasomotor response to coronary arteries to mental stress. *N Engl J Med* 325:1551-1556.

337. Bossaller C, Habib GB, Yamamoto H, Williams C, Wells S, and Henry PD. 1987. Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5' monophosphate formation on an atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. *J Clin Invest* 79:170-174.
338. Vanhoutte PM and Boulanger CM. 1995. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res Clin Exp* 18:87-98.
339. Katz SD, Biasucci L, Sabba C, Strom JA, Jondeau G, Galvao M, Solomon S, Nikolic SD, Forman R, and Le Jemtel TH. 1992. Impaired endothelium-mediated vasodilation in the peripheral vasculature of patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 19:918-925.
340. Morris ST and Jardine AG. 2000. The vascular endothelium in chronic renal failure. *J Nephrol* 13:96-105.
341. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, and Creager MA. 1993. Impaired endothelium dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 88:2510-2516.
342. Williams SB, Cusco JA, Roddy M, Johnstone MT, and Creager MA. 1996. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 27:567-574.
343. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Fasolo CB, Sudano I, and Salvetti A. 1995. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation* 91:1981-1987.
344. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, and Nerem RM. 1991. The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clin Cardiol* 14:11-116.

345. Kolodgie FD, Virmani R, Rice HE, and Mergner WJ. 1990. Vascular reactivity during the progression of atherosclerotic plaque. A study of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circ Res* 66:1112-1126.
346. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, and Dzau VJ. 1990. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 86:228-234.
347. Flavahan NA. 1992. Atherosclerosis of lipoprotein-induced endothelial dysfunction: potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation* 85:1927-1938.
348. Shimokawa H, Flavahan NA, and Vanhoutte PM. 1991. Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G-protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 83:652-660.
349. Flavahan NA. 1993. Lysophosphatidylcholine modifies G-proteins dependent signaling in porcine endothelial cells. *Am J Physiol* 264:H722-H727.
350. Liao JK and Clark SL. 1995. Regulation of G-protein  $\alpha_2i$  subunit expression by oxidized low-density lipoprotein. *J Clin Invest* 95:1457-1463.
351. Bode-Boger SM, Boger RH, Kienke S, Junker W, and Frolich JC. 1996. Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 219:598-603.
352. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, and Cooke JP. 1998. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 98:1842-1847.

353. Ohara Y, Peterson TE, and Harrison DG. 1993. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 92:2546-2551.
354. Beckman JS and Koppenol WH. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271:C1424-C1437.
355. Adams MR, Kinlay S, Blake GJ, Orford JL, Ganz P, and Selwyn AP. 2000. Atherogenic lipids and endothelial dysfunction: mechanisms in the genesis of ischemic syndromes. *Annu Rev Med* 51:149-167.
356. Liao JK, Shin WS, Lee WY, and Clark SL. 1995. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 270:319-324.
357. Froese DE, McMaster J, Man RY, Choy PC, and Kroeger EA. 1999. Inhibition of endothelium-dependent vascular relaxation by lysophosphatidylcholine: impact of lysophosphatidylcholine on mechanisms involving endothelium-derived nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Mol Cell Biochem* 197:1-6.
358. Brandes RP, Behra A, Lebherz C, Boger RH, Bode-Boger SM, Phivthong-Ngam L, and Mugge A. 1997. N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine- and indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the rabbit renal artery: effect of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 135:49-55.
359. Najibi S and Cohen RA. 1995. Enhanced role of K<sup>+</sup> channels in relaxation of hypercholesterolemic rabbit carotid artery to NO. *Am J Physiol* 269:H805-H811.

360. Pfister SL, Falck JR, and Campbell WB. 1991. Enhanced synthesis of epoxyeicosatrienoic acids by cholesterol-fed rabbit aorta. *Am J Physiol* 261:H843-H852.
361. Cai S and Sauvé R. 1997. Effects of thiol-modifying agents on a K(Ca<sup>2+</sup>) channel intermediate conductance in bovine aortic endothelial cells. *J Membr Biol* 158:137-158.
362. Nakaya H, Takeda Y, Tohse N, and Kanno M. 1992. Mechanism of the membrane depolarization induced by oxidative stress in guinea-pig ventricular cells. *J Mol Cell Cardiol* 24:523-534.
363. Jamme I, Petit E, Divoux D, Gerbi A, Maixent JM, and Nouvelot A. 1995. Modulation of mouse cerebral Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport* 7:333-337.
364. Rohn TT, Hinds TR, and Vincenzi FF. 1993. Inhibition of the Ca pump of intact red blood cells by *t*-butyl hydroperoxide: importance of glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 1153:67-76.
365. Libby P. 2001. The vascular biology of atherosclerosis. *Heart Disease: a Textbook of Cardiovascular Medicine* 995-1009.
366. Plutzky J. 2003. The vascular biology of atherosclerosis. *Am J Med* 115:55S-61S.
367. Glass CK and Witztum JL. 2001. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 104:503-516.
368. Creemers EEJM, Cleutjen JP, Smits JFM, and Daemen MJ. 2001. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 89:201-210.

369. Plutzky J. 1999. Atherosclerotic plaque rupture: emerging insights and opportunities. *Am J Cardiol* 84:15J-20J.
370. Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, and Just H. 1991. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolemic patients by L-arginine. *Lancet* 338:1546-1550.
371. McLenachan JM, Vita J, Fish DR, Treasure CB, Cox DA, Ganz P, and Selwyn AP. 1990. Early evidence of endothelial vasodilator dysfunction at coronary branch points. *Circulation* 82:1169-1173.
372. Sung CP, Arleth AJ, Storer B, and Feuerstein GZ. 1991. Modulation of U937 cell adhesion to vascular endothelial cells by cyclic AMP. *Life Sciences* 49:375-382.
373. Rush DS, Kerstein MD, Bellan JA, Knoop SM, Mayeux PL, Hyman AL, Kadowitz FJ, and McNamara DB. 1988. Prostacyclin, thromboxane A2 and prostaglandin E2 formation in atherosclerotic human carotid artery. *Arteriosclerosis* 8:73-78.
374. Myers DE, Huang WN, and Larkins RG. 1996. Lipoprotein-induced prostacyclin production in endothelial cells and effects of lipoprotein modification. *Am J Physiol* 271:C1504-C1511.
375. Félétou M and Vanhoutte PM. 1996. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:1082-1090.
376. Otsuji S, Nakajima O, Waku S, Kojima S, Hosokawa H, Kinoshita I, Okubo T, Tamoto S, Takada K, and Ishihara T. 1995. Attenuation of acetylcholine-induced vasoconstriction by L-arginine is related to the progression of atherosclerosis. *Am Heart J* 129:1094-1100.

377. Belmin J, Corman B, Merval R, and Tedgui A. 1993. Age-related changes in endothelial permeability and distribution volume of albumin in rat aorta. *Am J Physiol* 264:H679-H685.
378. Plante GE. 2002. Vascular response to stress in health and disease. *Metabolism* 51:25-30.
379. Virmani R, Avolio AP, Mergner WJ, Robinowitz M, Herderick EE, Cornhill JF, Guo SY, Liu TH, Ou DY, and O'Rourke M. 1991. Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis: comparison between occidental and Chinese communities. *Am J Pathol* 139:1119-1129.
380. Challah M, Nadaud S, Philippe M, Battle T, Soubrier F, Corman B, and Michel JB. 1997. Circulating and cellular markers of endothelial dysfunction with aging in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 273:H1941-H1948.
381. Li Z, Frölich J, Galis ZS, and Lakatta EG. 1999. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertension* 33:116-123.
382. Roach MR and Burton AC. 1959. The effect of age on the elasticity of human iliac arteries. *Can J Biochem Physiol* 37:557-570.
383. Van der Heijden-Spek, Staessen JA, Fagard RH, Hoeks AP, Boudier HA, and vanBortel LM. 2000. Effect of age on brachial artery wall properties differs from the aorta and is gender dependent: a population study. *Hypertension* 35:637-642.
384. Dohi Y and Lüscher F. 1990. Aging differentially affects direct and indirect actions of endothelin-1 in perfused mesenteric arteries of the rat. *Br J Pharmacol* 100:889-893.

385. Nyborg NCB. 1991. Ageing is associated with increased 5-HT<sub>2</sub>-receptor affinity and decreased receptor reserve in rat isolated coronary arteries. *Br J Pharmacol* 102:282-286.
386. Thorin E, Capdeville C, Trockle G, Wiernsperger N, and Atkinson J. 1990. Chronic treatment with naftidrofuryl attenuates the development of vascular hypersensitivity to serotonin in the spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 16:S54-S57.
387. Angus JA and Cocks TM. 1989. Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol Ther* 41:303-351.
388. Koga T, Takata Y, Kobayashi K, Takishita S, Yamashita Y, and Fujishima M. 1988. Ageing suppresses endothelium-dependent relaxation and generates contraction mediated by the muscarinic receptors in vascular smooth muscle of normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 6:S243-S245.
389. Koga T, Takata Y, Kobayashi K, Takishita S, Yamashita Y, and Fujishima M. 1989. Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aorta of the rat. *J Hypertens* 14:542-548.
390. Yang D, Gluais P, Zang JN, Vanhoutte PM, and Félétou M. 2004. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine, ATP and the calcium ionophore A 23187 in aortas from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Fund Clin Pharmacol* 18:321-326.
391. Cassie NJ, Cross MA, Phelan EL, and Millar JA. 1990. Sensitivity to Ca<sup>2+</sup> and the effects of a calcium channel antagonist in resistance vessels from two strains of genetically hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 6:S12-S13.



392. Wanstall JC and O'Donnell SR. 1989. Age influence responses of rat isolated aortae and pulmonary artery to the calcium channel agonist, Bay K 8644, and to potassium and calcium. *J Cardiovasc Pharmacol* 13:709-714.
393. Katano Y, Akera T, Temma K, and Kennedy RH. 1984. Enhanced ouabain sensitivity of the heart and myocardial sodium pump in aged rats. *Eur J Pharmacol* 105:95-103.
394. Ponte A, Sanchez-Ferrer CF, Hernandez C, Alonso MJ, and Marin J. 1996. Effect of ageing and hypertension on endothelial modulation of ouabain-induced contraction and sodium pump activity in the rat aorta. *J Hypertens* 14:705-712.
395. Toda N and Hayashi S. 1979. Age-dependent alteration in the response of isolated rabbit basilar arteries to vasoactive agents. *J Pharmacol Exp Ther* 211:716-721.
396. Toda N, Shimizu I, Okamura T, and Miyazaki M. 1986. Age-dependent change in the response of isolated beagle cerebral arteries to vasoactive agents. *J Cardiovasc Pharmacol* 8:681-688.
397. Shibano T, Codina J, Birnbaumer L, and Vanhoutte PM. 1992. Guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) causes endothelium-dependent, pertussis toxin-sensitive relaxations in porcine coronary arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 189:324-329.
398. Boulanger C, Lorenz RR, Hendrickson H, and Vanhoutte PM. 1988. Release of different relaxing factors by porcine endothelial cells in culture. *FASEB J* 2:A314.

399. Pearson PJ, Schaff HV, and Vanhoutte PM. 1990. Long-term impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets after reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circulation* 81:1921-1927.
400. Marin J. 1995. Age-related changes in vascular responses: A review. *Mech Ageing Develop* 79:71-114.
401. Gerhard M, Roddy M-A, Creager SJ, and Creager MA. 1996. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of human. *Hypertension* 27:849-853.
402. Rodriguez-Martinez MA, Alonso MJ, Redondo J, Salaices M, and Marin J. 1998. Role of lipid peroxidation and the glutathione-dependent antioxidant system in the impairment of endothelium-dependent vasodilations with age. *Br J Pharmacol* 123:113-121.
403. Shimizu I and Toda N. 1986. Alterations with age of the response to vasodilator agents in isolated mesenteric arteries of the beagle. *Br J Pharmacol* 89:769-778.
404. Woodman CR, Price EM, and Laughlin MH. 2003. Selected contribution: Aging impairs nitric oxide and prostacyclin mediation of endothelium-dependent dilation in soleus feed arteries. *J Appl Physiol* 95:2164-2170.
405. Van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, Palacios-Callender M, Erusalimsky JD, Quaschnig T, Malinski T, Gygi D, Ullrich V, and Luscher TF. 2000. Enhanced peroxynitrite formation is associated with aging. *J Exp Med* 192:1731-1743.
406. Murohara T, Yasue H, Ohgushi M, Sakaino N, and Jougasaki M. 1991. Age related attenuation of the endothelium dependent relaxation to noradrenaline in isolated pig coronary arteries. *Cardiovasc Res* 25:1002-1009.

407. Feldman RD, Tan CM, and Chorazyczewski J. 1995. G protein alteration in hypertension and aging. *Hypertension* 26:725-732.
408. Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P, Reed RL, and Jones DP. 1998. Glutathione in human plasma: Decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 24:699-704.
409. Van der Loo B, Labugger R, Aebischer CP, Skepper JN, Bachschmid M, Spitzer V, Kilo J, Altwegg L, Ullrich V, and Luscher TF. 2002. Cardiovascular aging is associated with vitamin E increase. *Circulation* 105:1635-1638.
410. Fujii K, Ohmori S, Tominaga M, Abe I, Takata Y, Ohya Y, Kobayashi K, and Fujishima M. 1993. Age-related changes in endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery. *Am J Physiol* 265:H509-H516.
411. Alvarez de Sotomayor M, Stoclet JC, and Andriantsitohaina R. 1999. Effect of ageing on the endothelium-dependent vasorelaxation induced by acetylcholine in rat mesenteric arteries. In: *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*. PM Vanhoutte (ed):323-332.
412. Muller JM, Spier SA, Ramsey MW, and Delp MD. 2002. Aging impairs endothelium-dependent vasodilation in rat skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1662-H1672.
413. Sanan DA, Newland DL, Tao R, Marcovina S, Wang J, Mooser V, Hammer RE, and Hobbs HH. 1998. Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein (a). *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4544-4549.

414. Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, and Burns DK. 1994. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest* 93:1885-1893.
415. Callow MJ, Verstuyft J, Tangirala R, Palinski W, and Rubin EM. 1995. Atherogenesis in transgenic mice with human apolipoprotein B and lipoprotein (a). *J Clin Invest* 96:1639-1646.
416. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, and Maeda N. 1992. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258:468-471.
417. Beny JL and Schaad O. 2000. An evaluation of potassium ions as endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 131:965-973.
418. Pratt PF, Li P, Hillard CJ, Kurian J, and Campbell WB. 2001. Endothelium-independent, ouabain-sensitive relaxation of bovine coronary arteries by EETs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H1113-H1121.
419. Rubanyi GM and Vanhoutte PM. 1985. Ouabain inhibits endothelium-dependent relaxations to arachidonic acid in canine coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 235:81-86.
420. Mayhan WG, Faraci FM, Baumbach GL, and Heistad DD. 1990. Effects of aging on responses of cerebral arterioles. *Am J Physiol* 258:H1138-H1143.
421. Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, and Kaley G. 2002. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res* 90:1159-1166.