

Université de Montréal

**Le peroxyde d'hydrogène en tant que facteur  
vasorelaxant dans les artères cérébrales de souris**

Par  
Annick Drouin

Département de Physiologie, Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc) en Physiologie

Mai, 2006

© Annick Drouin, 2006



W  
4  
U58  
2006  
V106

**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.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Le peroxyde d'hydrogène en tant que facteur vasorelaxant  
dans les artères cérébrales de souris

présenté par:  
Annick Drouin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Réjean Couture, président-rapporteur  
Dr. Éric Thorin, directeur de recherche  
Dr. Édith Hamel, membre du jury

## Résumé en Français

Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est une molécule de signalisation régulatrice du tonus vasculaire. Toutefois, son origine enzymatique et son mécanisme d'action restent controversés. Nos résultats suggèrent que le  $H_2O_2$  dérivé de l'activité de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) est un facteur relaxant dérivé de l'endothélium dans les artères cérébrales pressurisées de souris C57Bl/6. L'addition de N-nitro-L-arginine (L-NNA) ou de «piégeurs» du  $H_2O_2$  (DETC, catalase ou pyruvate) ont diminué ( $P < 0.05$ ) sans effets additifs la dilatation maximale à l'acétylcholine (ACh). Simultanément, une production de  $H_2O_2$  sensible au L-NNA, à la catalase ou au pyruvate a été détectée, suggérant que la production de superoxyde par la eNOS est un intermédiaire de la production de  $H_2O_2$ . La diminution de la dilatation par la catalase a été complètement rétablie par l'addition de tétrahydrobioptérine ( $BH_4$ ), un cofacteur de la eNOS. Cette dilatation est associée avec une production simultanée de NO (inhibée par l'addition d'un «piégeur» du NO, le 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethyl-imidazoline-1-oxyl 3-oxide, mais insensible à la catalase et au pyruvate). L'inhibition de la guanylate cyclase soluble par l'1H-[1,2,4]-oxadiazole-4,3-aquinoxalin-1-one (ODQ) a prévenu la dilatation induite par l'ACh et le  $H_2O_2$  exogène. L'addition de L-NNA, PTIO et d'ODQ - mais pas de DETC, de catalase ou de pyruvate - a augmenté la réponse myogénique, suggérant que la eNOS produit du NO à l'état basal et du  $H_2O_2$  suite à une stimulation muscarinique. En conclusion, l'activité physiologique de la eNOS peut induire une dilatation dépendante du  $H_2O_2$  dans les artères cérébrales de souris suite à une stimulation muscarinique.

**Mots clés:** Artères cérébrales de souris, endothélium, dilatation, NOS, peroxyde d'hydrogène, acétylcholine, tonus myogénique.

## Résumé en anglais

Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) produced by the vascular endothelium is a signaling molecule that has been shown to regulate vascular tone. However, its enzymatic origin and mechanism of action are largely unsettled. We present findings suggesting that  $H_2O_2$  derived from endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity is an endothelium-derived relaxing factor (EDRF) in isolated and pressurized cerebral artery of C57Bl/6 mice. Indeed, without any synergism, N-nitro-L-arginine (L-NNA) or  $H_2O_2$  scavengers catalase, PEG-catalase and pyruvate reduced ( $P < 0.05$ ) by more than 50% the endothelium-dependent dilation induced by acetylcholine (ACh). Simultaneously to the dilation,  $H_2O_2$  – but not NO – production, sensitive to either L-NNA, catalase or pyruvate, was detected. Silver diethyldithiocarbamate (DETC), a superoxide dismutase (SOD) inhibitor, but not 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethyl-imidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO), a specific NO scavenger, prevented ACh-induced dilation and  $H_2O_2$  production suggesting that eNOS-derived superoxide is an intermediate in the production of  $H_2O_2$ . Catalase-dependent inhibition of ACh-induced dilation was fully restored by the eNOS cofactor tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ ). This reversal was associated with a simultaneous NO-associated fluorescence sensitive to PTIO but not catalase or pyruvate. Soluble guanylate cyclase inhibition with 1H-[1,2,4]-oxadiazole-4,3-aquinoxalin-1-one (ODQ) prevented the dilation induced by ACh and by exogenous  $H_2O_2$ . Lastly, L-NNA, PTIO and ODQ – but not DETC, catalase or pyruvate – increased the pressure-dependent myogenic tone, suggesting that eNOS produces NO at rest, but leads to  $H_2O_2$  during muscarinic stimulation. In conclusion, physiological eNOS activity can lead to  $H_2O_2$ -dependent dilation in mouse cerebral arteries.

**Key words:** Mouse cerebral arteries, endothelium, dilation, NOS, hydrogen peroxide, acetylcholine, cerebral myogenic tone.

## Table des matières

Résumé en Français .....	iii
Résumé en anglais .....	iv
Listes des figures .....	vii
Liste des tableaux .....	x
Liste des abréviations .....	xi
Remerciements .....	xv
Introduction .....	1
1 Revue de la littérature .....	3
1.1 Les vaisseaux sanguins .....	3
1.1.1 Composition des vaisseaux sanguins .....	3
1.1.2 La vasculature cérébrale .....	6
1.1.3 Barrière hémato-encéphalique .....	7
1.1.4 Les cellules musculaires lisses (CML) .....	8
1.1.5 Tonus Myogénique.....	10
1.2 L'endothélium.....	13
1.2.1 Fonctions des cellules endothéliales.....	14
1.3 Les agents vasoconstricteurs.....	14
1.3.1 L'endothéline.....	15
1.3.2 L'angiotensine .....	16
1.3.3 La thromboxane .....	17
1.4 Les agents vasodilatateurs .....	17
1.4.1 Le monoxyde d'azote (NO).....	18
1.4.1.1 La NO synthase.....	20
1.4.1.2 La production de radicaux libres par la NOS .....	21
1.4.2 La prostacycline (PGI <sub>2</sub> ) .....	24
1.4.3 Les EDHF .....	24
1.5 Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS).....	26
1.5.1 Le peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	28
2 Rationnel de l'étude .....	32

3	Matériels et Méthodes .....	33
3.1	Conditions expérimentales.....	33
3.2	Études de réactivité.....	33
3.3	Études de fluorescence .....	36
3.4	Isolation des cellules endothéliales .....	37
3.5	Extraction des protéines.....	38
3.6	Quantification des protéines (Western blot) .....	39
3.7	Statistiques .....	40
4	Article .....	41
	Accord des coauteurs .....	42
	Abstract .....	45
	Introduction .....	46
	Materials and methods .....	47
	Results .....	50
	Discussion.....	53
	References .....	56
5	Discussion.....	66
5.1	Perspectives.....	74
6	Bibliographie.....	75

## Listes des figures

### Figures du mémoire:

- Figure 1.** Représentation de la composition morphologique d'un vaisseau sanguin typique Réf:(6).
- Figure 2.** Représentation schématique des différences morphologiques de la composition des artères cérébrales (gauche) et des artères systémiques (droite) Réf:(12).
- Figure 3.** Schéma de l'autorégulation cérébrale représentant la variation du débit sanguin cérébral (DSC) en fonction de la pression de perfusion ainsi que les modifications des résistances vasculaires cérébrales concomitantes figurées par le diamètre artériolaire. Réf:(38).
- Figure 4.** Schéma montrant l'action vasodilatatrice des différents facteurs relaxant dérivés de l'endothélium (EDRF) identifiés dans les vaisseaux sanguins suite à une stimulation par un agoniste AC; Adénylate cyclase, COX; cyclooxygénase, sGC; Guanylate cyclase soluble Réf:(57).
- Figure 5.** (A) Représentation schématique de la NOS montrant tous les cofacteurs impliqués dans la réaction d'oxydation. (B) Schéma montrant la réaction d'oxydation effectuée par la NOS lors de la formation de NO à partir de la L-Arginine Réf:(63).
- Figure 6.** Représentation du mécanisme d'action suggéré du BH<sub>4</sub> et de la L-arginine afin d'inhiber la formation de l'anion superoxyde par la NOS. L'ordre de la réaction est identifié en chiffre romain. Réf:(85)
- Figure 7.** Simplification schématique montrant les différentes sources enzymatiques et non-enzymatiques de la formation et de la chélation de l'anion superoxyde par les différents types de cellules. Réf:(98)
- Figure 8.** Représentation schématique montrant les différentes sources ainsi que les différents mécanismes d'action du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules vasculaires. Réf:(42)
- Figure 9.** Base du cerveau montrant les principales artères. Les artères postérieure et moyennes ont été utilisées dans cette étude Réf:(107).

**Figure 10.** Schéma récapitulatif des travaux effectués montrant la voie de dilatation utilisée par le  $H_2O_2$  suite à une stimulation muscarinique dans les artères cérébrales de souris C57Bl/6.

Figures de l'article:

**Figure 1.** Dilatation dépendante de l'endothélium induite par l'ACh dans les artères cérébrales pressurisées de souris C57Bl/6: (A) sans effets additifs, les artères cérébrales sont sensibles au L-NNA ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) et à la catalase ( $100 \text{ U/ml}$ ). (B) La chélation du NO par le PTIO ( $100 \mu\text{mol/L}$ ) n'a pas d'effet sur la dilatation à l'ACh, alors que les «piégeurs» du  $H_2O_2$  tels que le pyruvate ( $3 \text{ mmol/L}$ ) ou la PEG-catalase ( $50 \text{ U/mL}$ ) ainsi que l'inhibition de la SOD par le DETC ( $1 \text{ mmol/L}$ ) ont diminué significativement la dilatation induite par l'ACh. \*:  $P < 0.05$  comparativement à la situation contrôle (les «n» sont rapportés dans le tableau 1).

**Figure 2.** Représentation des changements de l'intensité fluorescente induite par l'addition d'ACh sur les artères cérébrales de souris pressurisées chargées avec (A) le DCF-DA ( $5 \mu\text{mol/L}$ ) et (B) le DAF-2 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ). Représentation graphique de l'augmentation moyenne d'intensités de fluorescence du DCF-DA (C) et du DAF-2 (D) durant la dilatation muscarinique ( $n = 3$  à  $5$  par groupe). \*:  $P < 0.05$  comparativement à la situation contrôle; †:  $P < 0.05$  comparativement au  $BH_4$ .

**Figure 3.** Effet de l'addition de L-NNA ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) et de catalase ( $100 \text{ U/ml}$ ) sur la dilatation dépendante de l'ACh (A) dans les artères cérébrales isolées à partir de souris  $eNOS^{-/-}$  ( $n = 6$ ) et (B) dans l'artère *gracilis* isolée chez la souris C57Bl/6 ( $n = 3$ ). \*:  $P < 0.05$  comparativement à la situation contrôle.

**Figure 4.** Effet de l'addition du cofacteur  $BH_4$  seul ou en combinaison avec la catalase sur la dilatation dépendante de l'endothélium à l'ACh (A) (les «n» sont rapportés dans le tableau 1). En (B), Western blot et représentation graphique montrant l'inefficacité de l'addition de  $BH_4$  sur

la formation de monomères (140 Kd) et de dimères (280 Kd) de la eNOS en condition dénaturante (R) et non dénaturante (NR). \*:  $P < 0.05$  comparativement à la situation contrôle (les expériences ont été reproduites à partir de 3 échantillons de cellules en culture).

**Figure 5.** Effet de l'addition de catalase (100 U/ml) et d'ODQ (10  $\mu\text{mol/L}$ ) sur la dilatation induite par (A) l'ACh ( $n = 6$  par groupe) et (B) par l'addition de  $\text{H}_2\text{O}_2$  exogène (avec et sans endothélium;  $n = 5$  par groupe) dans les artères cérébrales isolées à partir de souris C57Bl/6. \*:  $P < 0.05$  comparativement à la situation contrôle.

## Liste des tableaux

### Tableau de l'article:

**Tableau 1:** Tonus myogénique (MT), efficacité ( $E_{max}$ ) et sensibilité ( $pD_2$ ) à l'acétylcholine des artères cérébrales de souris mâles isolées à partir de souris C57Bl/6 et  $eNOS^{-/-}$ . Avant la dilatation, les vaisseaux ont été contractés similairement avec de la phényléphrine (10 or 30  $\mu M$ ).  $E_{max}$  est exprimé en pourcentage du diamètre de la dilatation maximale de l'artère.

## Liste des abréviations

AA	Acide arachidonique
AC	Adénylate cyclase
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ACh	Acétylcholine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPC	3',5'-adenosine monophosphate cyclique
Ang II	Angiotensine II
APA	Apamine
AT	Récepteur de l'angiotensine
ATP	Adénosine triphosphate
BBB	Barrière hémato-encéphalique
BH <sub>4</sub>	Tétrahydrobioptérine
BK	Bradykinine
BK <sub>ca</sub>	Canaux potassique à grande conductance
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcique
CAT	Catalase
Cav-1	Cavéoline-1
Chtx	Charybdotoxine
CML	Cellule musculaire lisse
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
COX	Cyclooxygénase
CS	Sérum de veau
Cu,Zn-SOD	Superoxide dismutase Cuivre, Zinc
DAF-2	4,5-diaminofluorescein diacétate
DAG	Diacylglycérol
DCFDA	5-(and-6)-chlorométhyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacétate, acétyl ester
DETC	<i>Silver diethyldithiocarbamate</i>
DMEM	Milieu Dubelcco's modifié Eagle

DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DTT	Dithiothréitol
EC	Cellule endothéliale
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
ecSOD	Superoxyde dismutase extracellulaire
EDCF	Facteur de constriction dérivé de l'endothélium
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
EDRF	Facteur relaxant dérivé de l'endothélium
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EET	Acide époxyeicosatriénoïque
EGTA	Acide éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)-N,N,N',N'- tétraacétique
eNOS	Isoforme endothéliale de la monoxyde d'azote synthase
eNOS <sup>-/-</sup>	Déficiencia en monoxyde d'azote synthase
ET	Endothéline
EZEE	Acide 14,15-époxyéicosa-5(Z)énoïque
FAD	Flavin adénine dinucléotide
FBS	Sérum de bovin foetal
FMN	Flavin mononucléotide
GCs	Guanylate cyclase soluble
GMPc	3'-5'-guanosine monophosphate cyclique
GTP	Guanosine triphosphate
GTPCH	GTP-cyclohydrolase I
H <sup>+</sup>	Ions hydrogène
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
Hrp	horseradish peroxydase
Ibério	Ibériotoxine
IK <sub>ca</sub>	canaux potassique à conductance intermédiaire
INDO	Indométhacine
iNOS	Isoforme inductible de la monoxyde d'azote synthase
IP <sub>3</sub>	Inositol triphosphate

K <sup>+</sup>	Ion potassique
K <sub>ca</sub>	Canaux potassique dépendant du calcium
KCl	Chlorure de potassium
L-NNA	N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginine
L-MMA	N-monométhyl-L-arginine
MCA	<i>Middle cerebral arteries</i>
MLC	Chaîne légère de myosine
Mn-SOD	Superoxide dismutase dépendante du manganèse
N <sub>2</sub>	Azote
Na <sup>+</sup>	Ion sodique
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
nNOS	Isoforme neuronale de la monoxyde d'azote synthase
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Monoxyde d'azote synthase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion superoxide
O <sub>2</sub>	Oxygène
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo-[4,3a]quinoxalin-1-one
ODYA	Acide 9,12-Octadécadiynoïque
OH <sup>-</sup>	Ion hydroxyl
ONOO <sup>-</sup>	Péroxynitrite
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PE	Phényléphrine
PEG-Cat	PEG-catalase
PGI <sub>2</sub>	Prostacycline
PKA	Protéine kinase A dépendante de l'AMPc
PKG	Protéine kinase G dépendante de la GMPc
PLC	Phospholipase C
PMT	<i>Photon multiplier transmitter</i>
PSS	Solution physiologique saline
PTIO	2-Phényl-4,4,5,5-tétraméthyl-imidazoline-1-oxyl 3-oxide
PYR	Pyruvate

RS	Réticulum sarcoplasmique
ROS	Espèces réactives dérivées de l'oxygène
SERCA	<i>Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase</i>
SK <sub>ca</sub>	Canaux potassique à petite conductance
SNC	Système nerveux central
SOD	Superoxide dismutase
TBST	<i>Buffer Salin Tris/Tween-20</i>
TX	Thromboxane
WT	Souris témoin

## Remerciements

Pour débiter j'aimerais remercier mes parents, ma sœur, mon frère, ma famille et mes ami(e)s qui ont su m'épauler, m'écouter et me supporter durant ces deux dernières années et les nombreuses autres précédentes. Ils m'ont rendu la vie plus agréable et plus facile. Toujours prêt à apporter des solutions, à me changer les idées ou encore à écouter mes histoires de souris auxquelles ils n'y comprenaient presque rien la plupart du temps. Merci d'avoir eu confiance et d'avoir été fier de ce que je suis et de ce que je deviendrai.

J'aimerais remercier mon directeur de recherche Dr. Éric Thorin qui, sans le savoir, m'a fait découvrir une passion que j'exercerai toute ma vie. Il m'a montré le plaisir de la curiosité, de la culture et la beauté de la recherche fondamentale qui m'étaient totalement inconnus avant de le rencontrer. C'est un honneur de te connaître et d'avoir pu apprendre autant de choses durant ces deux années (et celles à venir). Merci pour ta patience, pour la confiance que tu as eu en moi, pour tes connaissances et pour toutes les opportunités dont tu nous fais profiter à chaque année.

Un grand merci à Nathalie Trescases-Thorin qui prend soin de nous à tous les jours. Elle est toujours disponible pour écouter, aider ou rigoler. Même si je parle vite au quotidien, elle a su me comprendre et m'aider à dépasser mes limites. Ta présence est précieuse et je suis plus que choyée d'avoir pu passer ces deux dernières années en ta présence.

Je ne peux pas oublier Marie-Ève Gendron sans qui je ne saurais toujours pas comment utiliser un artériographe. Merci d'avoir partagé tes nombreuses connaissances avec moi et de m'avoir suivi et épaulé dans mon apprentissage (qui n'est pas encore terminé). Tu es une personne formidable comme amie, coéquipière et collègue. Heureux sont les gens qui travailleront avec une fille efficace, organisée et dévouée telle que toi pour les nombreuses années à venir.

Merci à Stéphanie Sauvageau qui n'est jamais bien loin quand j'ai besoin de parler ou de vider mon petit cœur. Même si ces occasions sont rares je sais qu'elles sont gravées dans ta mémoire. Merci de ton amitié et de ta franchise, elles m'ont été très précieuses au cours des années passées.

Merci à Guillaume Voghel et à Nada Farhat qui, malgré leurs champs d'activités scientifiques bien différents des miens, ont su être très présents et importants pour moi au cours de ma maîtrise.

Guillaume, il est très plaisant et enrichissant de discuter avec toi et ce peu importe le sujet. J'apprécie ta façon d'agir avec moi (quand je te demande de me changer les idées), tu es un grand frère incomparable sur qui on peut toujours compter. Merci d'avoir fait parti de ma vie durant ces deux années.

Nada, combien de cafés nous avons pris en parlant de la vie et de tout. Tu es une personne dévouée et merveilleuse. Ta joie de vivre est précieuse pour moi et tous ceux qui t'entourent.

Merci à Stéphane Krummen qui, même si nous avons passé peu de temps à travailler ensemble au laboratoire, est resté disponible. Ton aide est grandement appréciée. Malgré ton humour particulier, tu as été très présent et disponible lors de mes débuts. Merci pour ta collaboration, tes conseils, ta franchise incomparable et tellement appréciée ainsi que pour tes analyses de psychologue sur ma vie (on voyait rapidement que tu avais l'expérience).

Finalement, j'aimerais remercier tous les gens des autres laboratoires, nos collaborateurs qui m'ont aidé de près ou de loin dans l'avancement de mon projet. C'est à travers les petits accomplissements que se réalisent les grands projets.

## **Introduction**

De tous les organes corporels, le cerveau est le plus dépendant d'un apport sanguin continu. En effet, si le flot sanguin cérébral est interrompu, les fonctions cérébrales cessent quelques secondes plus tard et des dommages irréversibles aux constituants cellulaires adviennent dans les minutes suivant l'interruption du flot sanguin. Compte tenu l'importance de l'apport sanguin à cet organe, le corps humain a développé des mécanismes de défenses afin d'y assurer un débit constant. Ces mécanismes consistent en un ajustement du débit sanguin cérébral face aux variations de pression ainsi qu'en un contrôle humoral et neuronal de l'apport sanguin dans la circulation systémique. Finalement, la distribution de la circulation cérébrale sanguine est aussi régulée en fonction de l'activité des différentes régions du cerveau.

Un débat majeur en sciences neurologiques consiste à déterminer la relation entre l'apport sanguin au cerveau et la survie des cellules nerveuses (1). L'apport sanguin aux différents organes est physiologiquement contrôlé par le tonus du muscle lisse vasculaire. Celui-ci dépend des influences neuronales, chimiques, métaboliques et de facteurs physiques tels que la pression. Dans un organe tel que le cerveau, une détérioration des facteurs impliqués dans la relaxation du muscle lisse résulte en une augmentation de la résistance vasculaire et une diminution de la perfusion sanguine, ce qui pourrait avoir un effet néfaste sur la viabilité des cellules nerveuses et ainsi causer des dommages importants.

Les caractéristiques des vaisseaux sanguins cérébraux ne peuvent pas être extrapolées d'après ce que nous savons des vaisseaux sanguins périphériques. Aujourd'hui encore, les accidents vasculaires cérébraux demeurent une des majeures causes de mortalité et de morbidité dans le monde (2). Toutefois, les traitements utilisés contre les accidents cérébraux vasculaires sont limités aux agents qui bloquent l'agrégation plaquettaire ou les différentes cascades de coagulation mais n'affectent pas directement le flot sanguin. Comme l'endothélium vasculaire joue un rôle important dans la régulation du tonus myogénique et du flot sanguin en relâchant plusieurs facteurs qui induisent une dilatation du muscle lisse vasculaire,

l'étude de l'endothélium s'avère très prometteuse pour le traitement des maladies vasculaires (2). Ces facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF) incluent la prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ), le monoxyde d'azote (NO) ainsi que le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). Chacun des EDRF a été intensivement étudié mais il a récemment été suggéré que le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pouvait aussi être impliqué dans la dilatation des artères cérébrales et mésentériques de souris (3) ainsi que dans les artères coronaires humaines (4). Cependant, le mécanisme sous-jacent cette dilatation est encore très contesté dans la littérature.

Le but majeur de notre étude a été de caractériser le mécanisme de dilatation et l'implication du  $\text{H}_2\text{O}_2$  dérivé de l'endothélium dans les artères cérébrales de souris. L'impact de ce travail est important car il montre non seulement que le  $\text{H}_2\text{O}_2$  est un facteur relaxant dérivé de l'endothélium, mais aussi qu'en condition physiologique, dans les artères cérébrales, la NO synthase endothéliale (eNOS) pourrait induire une dilatation indépendante du NO.

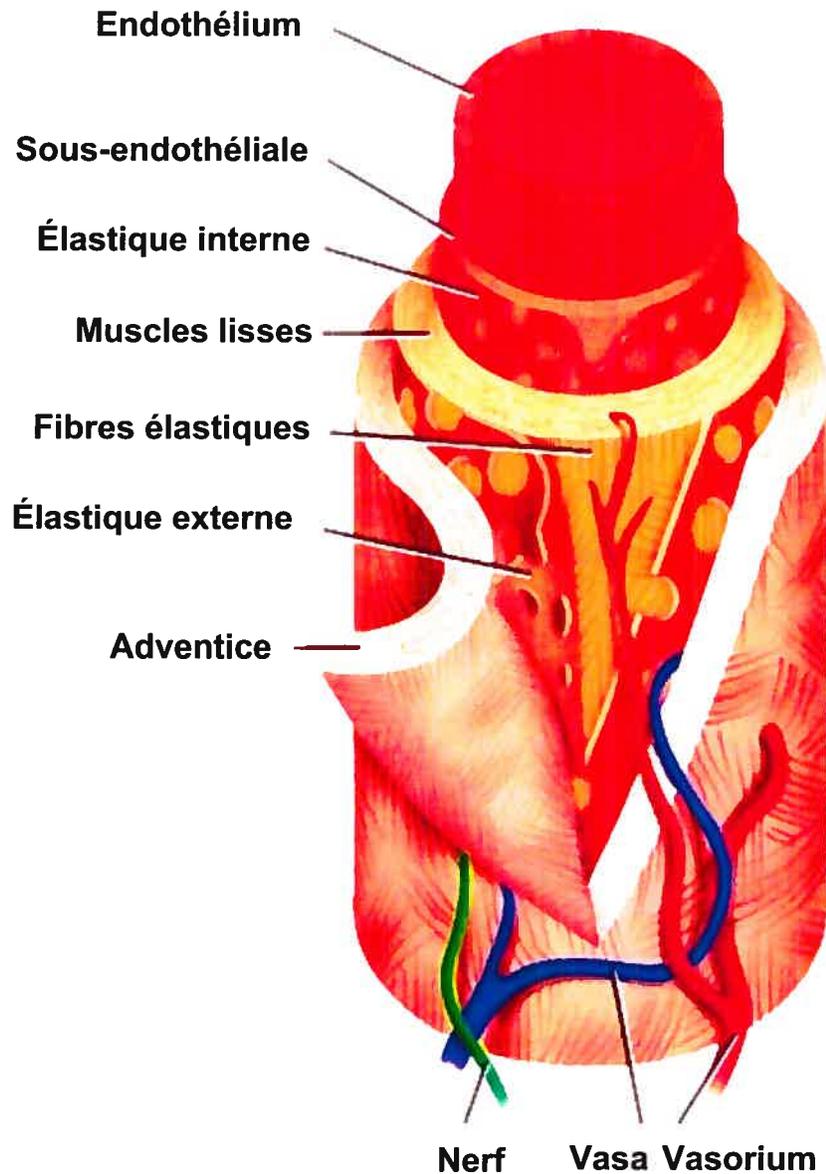
## **1 Revue de la littérature**

### **1.1 Les vaisseaux sanguins**

C'est au courant des années 1600 avec l'hypothèse de Malphigi qu'est apparue l'idée selon laquelle les organes étaient connectés au cœur par des «tuyaux» (5). Cependant, ce n'est que plusieurs années plus tard que le rôle et la complexité des vaisseaux sanguins ont commencé à être élucidés. Tous les nutriments essentiels et les déchets métaboliques sont véhiculés aux organes cibles par les vaisseaux. Ces derniers sont donc essentiels au maintien de l'homéostasie du corps humain. À travers les années, plusieurs rôles physiologiques et métaboliques ont été attribués aux vaisseaux sanguins. En plus d'exercer une influence sur la pression artérielle, les vaisseaux sanguins forment un organe fonctionnel capable de s'autoréguler en libérant plusieurs substances autocrines et paracrines. Malgré leur omniprésence dans le corps afin de desservir tous les organes, la particularité des vaisseaux réside dans leur adaptation à leur milieu. Bien qu'il soit le seul organe présent dans toutes les parties du corps humain, sa composition est difficile à identifier clairement. Non seulement la composition des différents vaisseaux varie selon l'organe qu'ils desservent mais aussi à l'intérieur même de l'organe selon la fonction accomplie par le vaisseau.

#### **1.1.1 Composition des vaisseaux sanguins**

Tel qu'il a été mentionné précédemment, le système vasculaire représente le seul organe dont la composition varie selon la localisation dans le corps et la fonction exercée dans les différents organes. Néanmoins, il est tout de même possible de tirer un portrait général de la composition des vaisseaux malgré les différences morphologiques existantes (voir figure 1). Ils sont composés de trois tuniques morphologiquement distinctes, soit de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau: l'intima, la média et l'adventice. L'importance et la complexité de ces trois tuniques dépendent du vaisseau sanguin et diffèrent selon la grosseur de celui-ci.

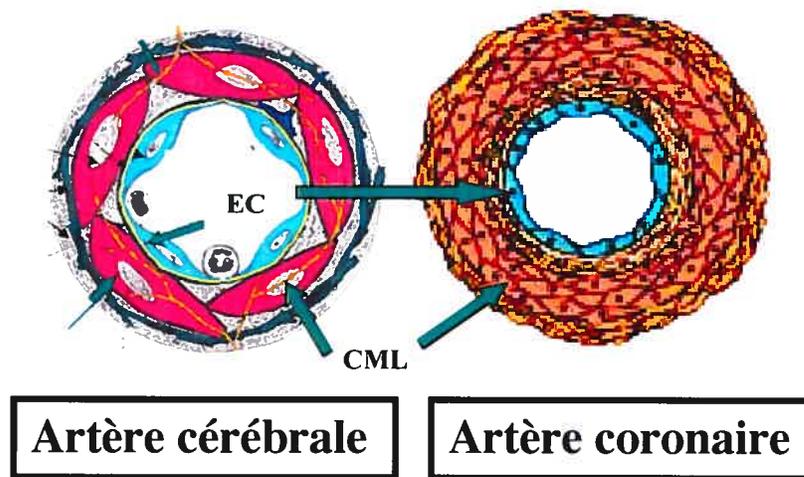


**Figure 1:** Représentation de la composition morphologique d'un vaisseau sanguin typique. Réf:(6)

L'intima est principalement constituée d'une monocouche de cellules endothéliales et d'une fine couche de tissu conjonctif. Ces cellules sont directement en contact avec le sang. On distingue trois classes morphologiques d'endothélium soit: continu, fenestré et discontinu. La morphologie de l'endothélium caractérise la perméabilité des différents lits vasculaires. Dans le cerveau, au niveau des

capillaires, cette couche représente la barrière hémato-encéphalique alors qu'au niveau des artérioles cérébrales, elle est associée à une mince couche de cellules musculaires lisses (CML). De plus, le cerveau étant une région où un ferme contrôle de la perméabilité entre le sang et le système nerveux est requis, les connexions entre les cellules sont très développées et très riches en jonctions serrées. Plusieurs études (7,8,9,10) ont confirmé que l'hétérogénéité des cellules endothéliales se retrouve à plusieurs niveau soit 1) au niveau des différents organes 2) entre les vaisseaux adjacents et 3) entre les gros et les petits vaisseaux à l'intérieur d'un même organe (11).

Une ou plusieurs couches de CML composent la majorité de la média. En plus de contenir des CML, la média possède des constituants extracellulaires comme des fibres élastiques, des fibrilles d'élastine et des faisceaux de collagène. Cette tunique varie selon les différents territoires vasculaires et la fonction du vaisseau. La tunique moyenne joue un rôle prépondérant dans la régulation de la circulation car une légère variation du diamètre des vaisseaux a un effet marqué sur le débit et la pression sanguine.



**Figure 2:** Représentation schématique des différences morphologiques de la composition des artères cérébrales (gauche) et des artères systémiques (droite). Réf: (12)

Dans les veines, l'adventice et la média sont souvent difficiles à distinguer. En réalité, l'adventice, selon le type de vaisseau, peut être très présente ou absente, tel que dans les capillaires par exemple. En général, l'adventice est constituée de fibres de collagène. Elle contient également quelques fibres élastiques épaisses et des fibroblastes. La tunique externe sert d'ancrage aux structures environnantes. C'est aussi dans l'adventice que se trouve la vasa vasorum, l'élément sanguin qui apporte les nutriments nécessaires à l'alimentation des vaisseaux de gros calibre.

### 1.1.2 La vasculature cérébrale

Comme la pression artérielle cérébrale de la souris représente environ 50-60 % de la pression artérielle systémique (~ de 110 -120 mm Hg) (13), il est juste de penser que la composition des vaisseaux cérébraux sera différente des vaisseaux périphériques. En effet, contrairement au lit vasculaire systémique, la vasculature cérébrale contient pratiquement que des artères de résistance (14). Ces caractéristiques font du cerveau un lit vasculaire unique à travers le corps humain (13).

De ce fait, la morphologie des artères cérébrales est différente de celle des artères périphériques (voir figure 2). La plus grande différence connue est sans aucun doute la présence de la barrière hémato-encéphalique qui est constituée par les cellules endothéliales. Une autre différence marquante est que les petites artères cérébrales ont une capacité de vasoconstriction diminuée, car elles possèdent moins de cellules musculaires lisses que les petites artères de résistances systémiques (15). De plus, comme la paroi des vaisseaux cérébraux est plus mince, on peut facilement imaginer que la pression exercée sur la paroi («strain») est augmentée pour une même pression artérielle, ce qui implique que ces artères sont plus susceptibles aux ruptures. Cependant, le maintien d'une faible pression artérielle tend à prévenir ce phénomène (16).

Les travaux du groupe de Baumbach ont estimé que la média des petites artères (diamètre d'environ 90  $\mu\text{m}$ ) est environ 4 fois plus épaisse dans les artères mésentériques que dans les artères cérébrales et que l'adventice de ces dernières est 3 fois plus petite que celle des artères mésentériques (voir figure 2) (13). En effet,

dans la circulation cérébrale la nécessité de l'adventice et du vasa vasorum est réduite, car dans ces vaisseaux de petites dimensions, l'alimentation des cellules à partir de la lumière s'avère suffisante.

### 1.1.3 Barrière hémato-encéphalique

Dans le lexique biomédical, peu de termes sont aussi reconnus que celui de barrière hémato-encéphalique (en anglais: blood-brain barrier (BBB)). Ce terme fait tout de suite penser à une barricade entre le sang et le cerveau qui est souvent considérée comme un obstacle plutôt qu'une protection. En vérité, la BBB agit des deux façons et c'est précisément cette dualité d'action qui fait que la BBB a un rôle vital en influençant les états physiologique et pathologique du cerveau. Au milieu des années 1960, plusieurs groupes de recherche ont observé la BBB suite à l'administration intraveineuse de marqueurs de l'endothélium. Toutefois, ce n'est qu'en 1967 que Reese et Karnovsky ainsi que Brightman et Reese ont pu résoudre l'énigme de la BBB avec la découverte des jonctions serrées (11,17). La BBB est constituée d'un endothélium continu de la paroi capillaire, d'une membrane basale entourant la face externe des capillaires et des pieds d'astrocytes fixés aux capillaires. La principale structure responsable des propriétés de la barrière est ce que l'on nomme les jonctions serrées («tight junctions») (17). Les cellules endothéliales adhèrent entre elles par des structures de jonctions fermées par des protéines transmembranaires adhésives qui sont responsables d'une adhésion homophile entre les cellules. Durant les dernières années, les découvertes de la composition moléculaire des jonctions serrées ont littéralement explosé et plusieurs protéines telles que l'occludine, la claudine-1 et 5 y ont été localisées (18,19,20,21,22).

Cependant cette barrière sang/cerveau n'est pas une cuirasse sans défauts. Dans des régions du cerveau regroupées autour des ventricules (organes péri-ventriculaires), l'endothélium se caractérise par l'absence de jonctions serrées autorisant la diffusion de substances dans l'espace périendothélial. Ces régions incluent la neurohypophyse, l'éminence médiane, l'organe vasculaire de la

membrane terminale, l'organe subfornical, l'épiphyse, la glande pinéale ainsi que l'area postrema. À ces endroits spécifiques, le cerveau possède des récepteurs sensoriels qui lui permettent de répondre aux changements de concentrations de glucose et d'osmolarité des liquides corporels. Les réponses perçues permettent d'envoyer les signaux nerveux et hormonaux nécessaires à la régulation de chacun des facteurs (23).

La barrière hémato-encéphalique est responsable de maintenir le microenvironnement neuroparenchymal en assurant la stabilité et le fonctionnement du système nerveux. Elle protège les tissus neuronaux contre les toxines, tamponnent les variations de la composition sanguine et maintient les fonctions de la barrière entre le sang et le cerveau (17). Elle a aussi un rôle de modulateur majeur de la livraison des nutriments au système nerveux central (SNC) (24). Le glucose, les acides aminés essentiels et certains électrolytes traversent la barrière par diffusion facilitée. Toutefois, la BBB reste impuissante contre les matières liposolubles comme les acides gras, l'oxygène (O<sub>2</sub>), le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), l'alcool, la nicotine, certaines drogues et les anesthésiques circulants qui peuvent facilement la traverser.

#### 1.1.4 Les cellules musculaires lisses (CML)

Bien que leur nombre diminue en fonction de la taille des vaisseaux et qu'elles soient moins nombreuses dans la vasculature cérébrale, les cellules musculaires lisses demeurent l'élément primaire de la contraction des vaisseaux sanguins. De nombreuses substances, vasodilatatrices ou vasoconstrictrices, contrôlent la contraction des CML. Même si leur mode d'action est spécifique à chaque substance, elles vont toutes agir sur le taux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire soit en l'augmentant ou en le diminuant. Ces hormones véhiculées par le sang peuvent agir *via* les cellules endothéliales ou directement sur les cellules musculaires lisses. Certaines substances exercent un effet vasoconstricteur sur les CML et un effet vasodilatateur *via* les cellules endothéliales (ACh, sérotonine, bradykinine, histamine, ATP, endothéline, noradrénaline). Dans ce cas, l'action finale

vasoconstrictrice ou vasodilatatrice dépendra de la biodisponibilité de la substance dans le compartiment lumière/endothélium par rapport à celui de la média. Il reste que les cellules endothéliales de la paroi vasculaire ont une importance considérable dans le contrôle de l'état de contraction des CML qui se situent à proximité.

L'état de contraction des CML dépend de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique et de la sensibilité de l'appareil contractile au calcium (filament d'actine et de myosine). La CML doit être capable d'augmenter la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  rapidement et de la diminuer tout aussi rapidement. Dans les CML, la concentration cytoplasmique en  $\text{Ca}^{2+}$  est d'environ  $0.1 \mu\text{M}$  alors que pour le compartiment extracellulaire, elle avoisine  $1$  à  $2 \text{ mM}$  (25) et  $10$  à  $15 \text{ mM}$  pour le réticulum sarcoplasmique (26,27). La concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique étant considérablement plus faible, la hausse du taux de  $\text{Ca}^{2+}$  sera un phénomène plutôt passif alors que la baisse demandera une dépense d'énergie. À l'état basal, malgré un gradient de concentration et un potentiel de membrane favorable ( $-80 \text{ mV}$ ), l'entrée du calcium dans la cellule est très faible car les canaux calciques dépendants du voltage sont fermés et la diffusion passive à travers la bicouche lipidique est négligeable (28,29).

Le gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire est maintenu par différents mécanismes de transport tels que la  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -ATPase. Son expression est variable dans les CMLV: elle est faible ou absente dans les petits vaisseaux et plus abondante dans les CMLV des grosses artères et des grosses veines (30). Son action au niveau de la régulation du pH intracellulaire est importante (31,32). Il existe un autre transporteur important, soit un échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Cet antiport a une faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  mais une grande capacité de transport. En conditions physiologiques, le  $\text{Na}^+$  entre selon son gradient électrochimique créant l'énergie nécessaire à l'expulsion du  $\text{Ca}^{2+}$ . L'importance physiologique de cette pompe est peu claire, elle serait surtout importante dans le cas où la  $[\text{Ca}^{2+}]$  cytoplasmique serait supérieure à  $1 \mu\text{M}$ , soit immédiatement après une contraction de la CML.

Seul le réticulum sarcoplasmique (RS) joue un rôle primordial dans la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Le réticulum sarcoplasmique ne représente que

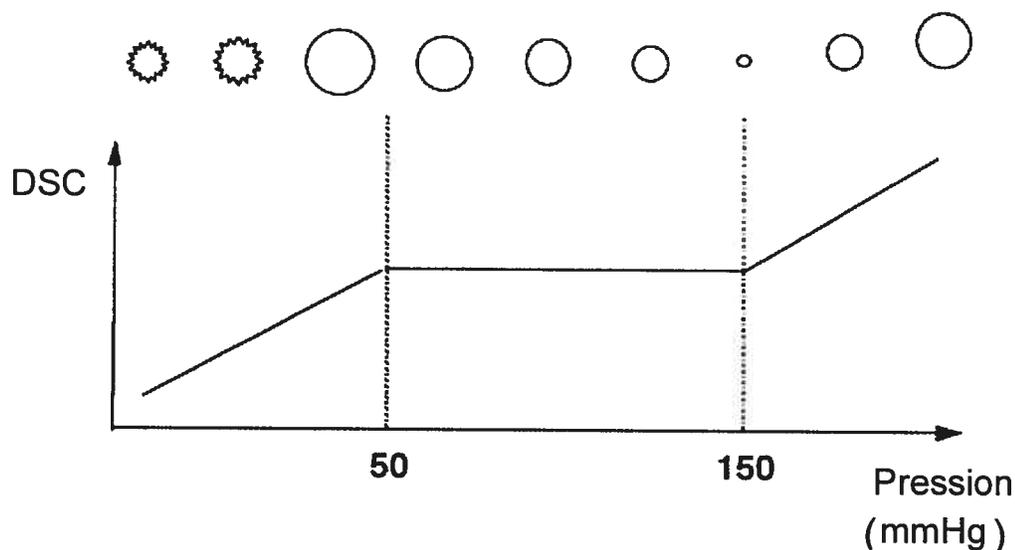
1,5 à 7,5 % du volume cellulaire total. Dans les CML artérielles, son abondance diminue proportionnellement à la taille de la lumière du vaisseau (27). Le pompage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum est assuré par des ATPases  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes du RS (Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase: SERCA) qui peuvent représenter jusqu'à 90 % des protéines de la membrane du réticulum. Les SERCA agissent en conjonction avec les transporteurs calciques dépendants de l'ATP de la membrane plasmique et probablement avec l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  pour maintenir un faible niveau cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$ . La contribution relative de ces systèmes est peu défini au niveau cérébral et varie en fonction de l'espèce et des différents types de CML. Toutefois, la plupart des auteurs considèrent que le transport par les SERCAs serait le mécanisme le plus important pour le maintien de cette faible concentration cytoplasmique en  $\text{Ca}^{2+}$  (28,29).

### 1.1.5 Tonus Myogénique

Comme les artères cérébrales possèdent des caractéristiques vasculaires uniques, l'autorégulation de ces artères devient un phénomène primordial dans le maintien de l'homéostasie cérébrale. Cette autorégulation du flot sanguin est un des mécanismes les plus importants qui permet au corps humain de maintenir une relation entre le débit sanguin et la demande métabolique (33). Il a été proposé que cette autorégulation serait effectuée par plusieurs mécanismes dont le contrôle métabolique (les facteurs métaboliques agissent sur les vaisseaux pour réguler le débit sanguin), les forces de cisaillement, le contrôle neurogénique et la réponse myogénique (la pression de perfusion agit sur le vaisseau afin de réguler le débit sanguin). Même si le degré de participation de ces facteurs dans la réponse autorégulatrice varie dans les différents lits vasculaires, il a été suggéré que le contrôle myogénique et les forces de cisaillement ont une contribution significative dans l'autorégulation de la circulation cérébrale et coronaire. Les forces de cisaillement influencent l'autorégulation *via* le maintien d'une balance entre la libération de différents médiateurs vasoactifs tel que le NO et influence le diamètre artériel lors de l'autorégulation. Le cerveau est dépendant d'un apport continu de

sang, la réponse myogénique est importante afin de s'assurer que le cerveau ne perçoive aucune variation de débit suite aux changements de pression ou de débit systémique.

Les CML ont un rôle très important dans la régulation du débit et de la pression sanguine des vaisseaux par le biais de la réponse myogénique. Décrite pour la première fois en 1902 par Bayliss (34), cette adaptation des CML est caractérisée par une diminution du diamètre du vaisseau suite à une augmentation de sa pression interne et d'une augmentation du diamètre du vaisseau suite à une diminution de sa pression intraluminale (voir figure 3). En fait, il a été bien établi que le tonus myogénique est associé à une dépolarisation membranaire des CML. Cependant, le mécanisme de dépolarisation ainsi que son importance dans le développement de la réponse myogénique sont encore le sujet de débats (33). Des études *in vitro* montrent que le tonus des artères cérébrales nécessite l'activation des CML par une dépolarisation de la membrane ainsi qu'une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique (35,36). La réponse myogénique est sensible aux facteurs circulants, neurogéniques et endothéliaux. En fait, le tonus myogénique peut être considéré comme un tonus de base préparant l'artère à augmenter la contraction si plus d'agonistes sont produits ou à diminuer la contraction en présence de substances vasodilatatrices. Un tonus basal permet donc un contrôle efficace du tonus vasculaire et du débit sanguin (37).



**Figure 3.** Schéma de l'autorégulation cérébrale représentant la variation du débit sanguin cérébral (DSC) en fonction de la pression de perfusion ainsi que les modifications des résistances vasculaires cérébrales concomitantes figurées par le diamètre artériolaire. Réf: (38)

Il a aussi été suggéré que le tonus myogénique dépend, entre autres, de l'innervation du vaisseau, des substances vasoactives circulantes ainsi que de l'influence de la circulation distale. Effectivement, même si la réponse myogénique est un mécanisme autorégulateur des CML, la balance entre la relâche de facteurs endothéliaux vasodilatateurs et vasoconstricteurs a une influence déterminante sur le tonus vasculaire (39). Sans le tonus myogénique, les artères seraient collapsées et l'éjection sanguine cardiaque serait insuffisante pour assurer une circulation adéquate (40).

## 1.2 L'endothélium

L'endothélium vasculaire est l'un des plus grands organes du corps humain (9). Il est constitué d'une monocouche cellulaire qui tapisse la surface intérieure des vaisseaux sanguins. La masse totale de l'endothélium est évaluée à 1% du poids corporel total, ce qui représente une masse d'environ 750 grammes chez un adulte moyen (41,42). Il est situé à l'interface entre le sang et le tissu vasculaire, endroit stratégique pour recevoir, intégrer et répondre aux signaux systémiques et locaux. En plus de fournir une barrière protectrice pour les tissus, il possède des propriétés anti-coagulantes et génère un bon nombre d'autacoïdes qui régulent le tonus vasculaire et l'homéostasie des tissus. Plusieurs fonctions vitales au maintien de l'homéostasie sont attribuables aux cellules endothéliales telles que: l'échange bi-directionnel entre le sang et les tissus, le contrôle de la coagulation sanguine et du tonus vasculaire par la relâche de vasodilatateurs et vasoconstricteurs, le recrutement et la diapédèse des leucocytes ainsi que la présentation des antigènes.

Au XIX<sup>e</sup> siècle, la découverte de Von Recklinghausen qu'une couche cellulaire tapissait l'intérieur des vaisseaux n'a été qu'une description plus pointue de la découverte de Malpighi concernant l'existence d'une séparation physique entre le sang et les tissus car aucune fonction substantielle n'y avait été attribuée (5). Il a fallu attendre en 1980 alors que Furchgott et Zawadzki ont découvert le potentiel vasoactif de l'endothélium (5). Malgré une même origine embryonnaire, une apparence histologique similaire et une fonction physiologique en commun, les endothéliums doivent être étudiés comme une population hétérogène de cellules représentant différents phénotypes (9).

Il a été démontré que la composition biochimique de la surface endothéliale varie significativement en fonction de sa localisation anatomique (9). Dans le cerveau, on retrouve principalement deux types de vaisseaux soit des artères de résistance et des capillaires. Alors que les artères de résistance ont pour fonction de contrôler le flot sanguin et d'influencer la perfusion globale du cerveau, les capillaires et pré capillaires, qui sont plus petits et ne contiennent pas de cellules musculaires lisses, ont pour fonction de contrôler la perméabilité de l'eau et des nutriments.

### 1.2.1 Fonctions des cellules endothéliales

Malgré sa structure (monocouche), l'endothélium accomplit une variété de fonctions différentes impliquées principalement dans le maintien des parois vasculaires et dans la balance hémodynamique du corps entier. Au centre de toutes ces fonctions se retrouve la sécrétion de plusieurs facteurs impliqués dans la coagulation, dans l'agrégation des plaquettes, dans la perméabilité vasculaire et l'inflammation vasculaire ainsi que dans la prolifération des CML (5).

Les cellules endothéliales sont aussi impliquées dans l'extravasation des leucocytes sous-jacent à l'inflammation. Effectivement, l'activation des cellules endothéliales est associée avec le recrutement des cellules inflammatoires, qui peut aussi résulter en une augmentation de la perméabilité vasculaire (43).

Durant les dernières années, l'impact de l'endothélium sur le tonus vasculaire a été reconnu. Cette découverte a mené à faire la distinction entre les EDCF et les EDRF (5). En fait, la couche de cellules endothéliales qui tapisse la surface interne des vaisseaux sanguins sert de régulateur du tonus vasculaire en relâchant plusieurs substances vasoactives soit des substances vasodilatatrices (NO, PGI<sub>2</sub>, EDHF, bradykinine, adrénomédulline, peptide natriurétique de type C, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et vasoconstrictrices (endothéline, angiotensine, thromboxane, prostaglandine, radicaux libres) (42, 44). Il a alors été défini que l'intégrité endothéliale passe par une balance maintenue entre la biodisponibilité des EDCF et des EDRF (5).

### 1.3 Les agents vasoconstricteurs

En 1980, Furchgott et Zawadzki ont rapporté l'importance de l'endothélium dans la vasodilatation à l'ACh. Ces résultats n'ont pas seulement conduit à la découverte du NO en tant que messager intracellulaire mais aussi à celle d'autres EDRF et en particulier le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) (45). De plus, il a rapidement été suggéré que les cellules endothéliales pouvaient aussi induire une contraction plutôt qu'une relaxation des cellules musculaires lisses environnantes (46). Ces réponses dépendantes de

l'endothélium ont été attribuées à la production de facteurs diffusibles nommés facteurs constricteurs dérivés de l'endothélium (EDCF). L'endothélium est une source considérable de facteurs vasoconstricteurs tels que l'endothéline (ET-1), plusieurs dérivés de l'acide arachidonique et l'angiotensine II (5). Au niveau cérébral, l'endothéline, l'angiotensine, la thromboxane et l'anion superoxyde sont tous considérés comme des EDCF potentiels.

### 1.3.1 L'endothéline

Comme les autres cellules endothéliales, les cellules endothéliales cérébrales contiennent l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) et possèdent donc la capacité de produire de l'endothéline (ET) (47). Trois différentes isoformes de l'ET ont été identifiées soit ET-1, ET-2 et ET-3 qui sont encodées à partir de différents gènes. De ces trois isoformes, l'endothéline-1 (ET-1) est la plus efficace, la mieux distribuée et, par conséquent, la plus étudiée. L'ET-1 est un peptide de 21 acides aminés et constitue l'un des plus importants agents vasoconstricteurs connus aujourd'hui (48). L'ET-1 est synthétisée dans l'endothélium à partir d'un précurseur biologique non actif, la proendothéline. Deux récepteurs à l'ET-1 ont été décrits chez le mammifère soit  $ET_A$  et  $ET_B$ , présents sur les cellules endothéliales et musculaires lisses et couplés aux protéines G (49). Les cellules cérébrales endothéliales et CML expriment les deux récepteurs ( $ET_A$  et  $ET_B$ ) qui sont localisés aux surfaces luminale et abluminale de l'endothélium.

L'ET-1 contracte les vaisseaux cérébraux *via* son action sur  $ET_A$  (50). La stimulation du récepteur  $ET_A$  des cellules musculaires lisses cause une vasoconstriction en induisant une augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire suite à l'activation de plusieurs voies de signalisation dont l'activation des phospholipases C et  $A_2$  (47). Parmi les autres voies impliquées dans la contraction des CML par l'ET-1, on retrouve: l'augmentation de la phosphorylation des protéines d'association des filaments d'actine *via* l'activation de ERK1/2, l'activation des canaux  $Cl^-$  dans les artères cérébrales et l'activation de la p38MAP kinase  $\alpha$  et/ou  $\beta$  (51) qui entraîne une augmentation de l'activité de HSP27 qui

régule la polymérisation de l'actine et augmente l'activité contractile des CML (52). L'ET-1 augmente donc la phosphorylation de la chaîne légère de myosine (MLC) par une augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire (53) et inhibe l'activation de la voie de signalisation de la Rho/Rho kinase par l'inhibition de la MLC phosphatase.

### 1.3.2 L'angiotensine

Le système rénine-angiotensine est un système hormonal dans lequel l'angiotensinogène et la rénine sont relâchées dans la circulation à partir du foie et des reins respectivement. Le produit résultant est l'angiotensine I, un décapeptide biologiquement inactif qui est ensuite clivé par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) dans les cellules endothéliales afin de produire l'angiotensine II (Ang II). L'Ang II se lie aux récepteurs de type I ( $AT_1$ ) ou II ( $AT_2$ ) qui sont couplés aux protéines G. Les cellules endothéliales cérébrales expriment les récepteurs  $AT_1$  qui pourraient jouer un rôle important dans plusieurs pathologies cérébrovasculaires.

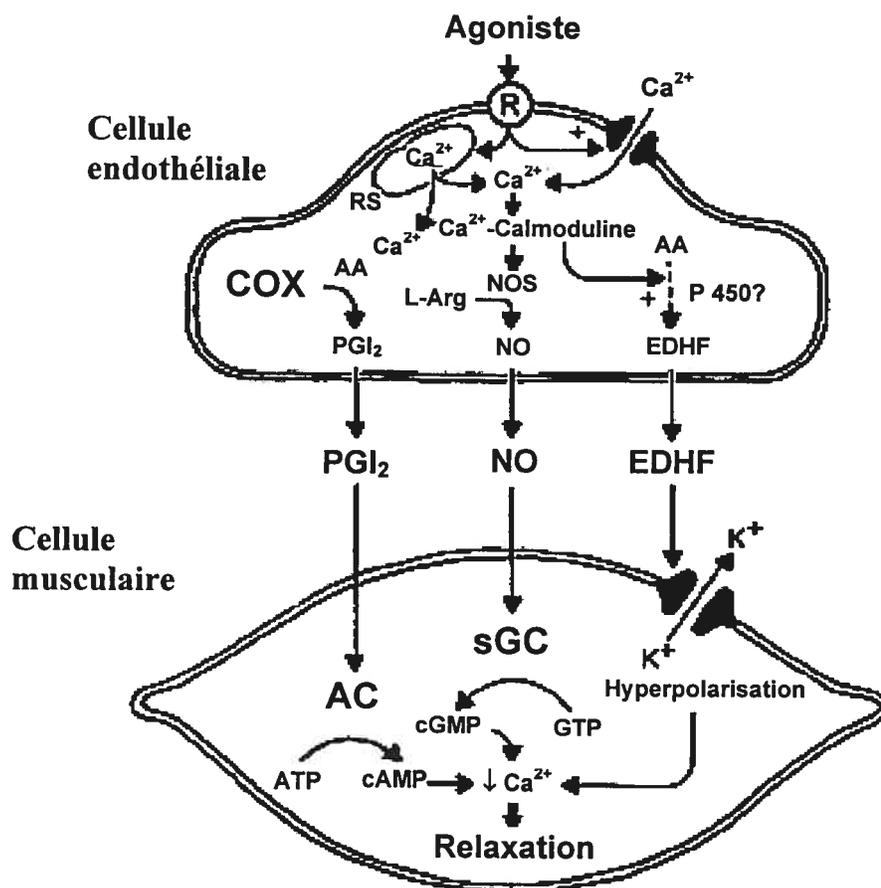
Des études récentes indiquent la présence, dans le système nerveux central d'un système rénine-angiotensine qui contient les mêmes intermédiaires que le système conventionnel (54). Les cellules endothéliales cérébrales sont grandement impliquées dans ce système rénine-angiotensine car elles produisent l'ACE. De plus, très récemment, la présence d'angiotensinogène et de rénine dans les cellules endothéliales cérébrales a été démontrée (47). En plus de l'Ang II, d'autres peptides dérivés de l'angiotensine et ayant des actions biologiques tels que l'Ang III, l'Ang IV et l'Ang (1-7) sont aussi sécrétés dans le cerveau (55). L'Ang IV et l'Ang (1-7) ont soulevé beaucoup d'intérêt durant les dernières années car leurs actions cardiovasculaires s'opposent à celles de l'Ang II. Ceci est aussi vrai pour le système cérébrovasculaire où l'activation du récepteur  $AT_1$  par l'Ang II est associée à une vasoconstriction et à une réduction du débit sanguin cérébral, alors que l'activation du récepteur  $AT_1$  par l'angiotensine IV et l'angiotensine (1-7) induit une augmentation du débit sanguin cérébral et une vasodilatation (56).

### 1.3.3 La thromboxane

L'acide arachidonique (AA) est métabolisé en une variété de produits nommés collectivement les éicosanoïdes. Alors que certains éicosanoïdes sont dilatateurs, d'autres ont une fonction vasoconstrictrice. La thromboxane est un agent vasoconstricteur dérivé de l'AA sous l'action de la cyclooxygénase (COX) et de la thromboxane synthase. La première étape dans la synthèse des éicosanoïdes implique la libération de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires par la phospholipase A<sub>2</sub>. Un fois libéré, l'acide arachidonique peut être métabolisé par la cyclooxygénase, la lipoxygénase, l'époxygénase ou la  $\Omega$ -hydrolase (57). Même si la thromboxane est d'abord impliquée dans l'agrégation plaquettaire, elle peut produire une vasoconstriction. L'action vasoconstrictrice de la thromboxane passe par un récepteur situé sur les CML. Le récepteur de la thromboxane est couplé à une protéine Gq qui active la phospholipase C (PLC). La PLC hydrolyse le phosphoinositol en deux composants soit le diacylglycérol (DAG) et le second messenger inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>). Ces deux molécules activent différentes voies de signalisation intracellulaire menant à une vasoconstriction.

### 1.4 Les agents vasodilatateurs

Il a précédemment été souligné que l'endothélium joue un rôle prépondérant dans la dilatation artérielle suite à une stimulation par l'ACh. Cette découverte est non seulement conséquente de la découverte du monoxyde d'azote (NO) en tant que messenger intracellulaire mais a aussi soulevé la question de la possibilité d'avoir d'autres EDRF produits suite à une stimulation de l'endothélium. En 1982, le groupe de Vanhoutte (46) a proposé qu'il y avait trois voies impliquées dans la dilatation dépendante de l'endothélium, une proposition encore valide aujourd'hui. En effet, elle peut être expliquée par la relâche de trois EDRF dont le NO, les PGI<sub>2</sub> et une substance indéterminée nommée le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) (58). Bien que la vasculature cérébrale soit unique au sein du corps humain, les EDRF impliqués dans la régulation de la vasodilatation dépendante de l'endothélium sont les mêmes qu'au niveau périphérique. Seule leur influence varie.



**Figure 4:** Schéma montrant l'action vasodilatatrice des différents facteurs relaxant dérivés de l'endothélium (EDRF) identifiés dans les vaisseaux sanguins suite à une stimulation par un agoniste AC; Adénylate cyclase, COX; cyclooxygénase, sGC; Guanylate cyclase soluble (Réf: 59).

#### 1.4.1 Le monoxyde d'azote (NO)

Le NO fut la première substance non prostanôïde identifiée et décrite comme étant impliquée dans la relaxation dépendante de l'endothélium (60). Le NO est un radical libre généré à partir de la partie terminale de la L-arginine par l'action de la NO synthase (NOS) (voir figure 5). En raison de son caractère lipophile, le

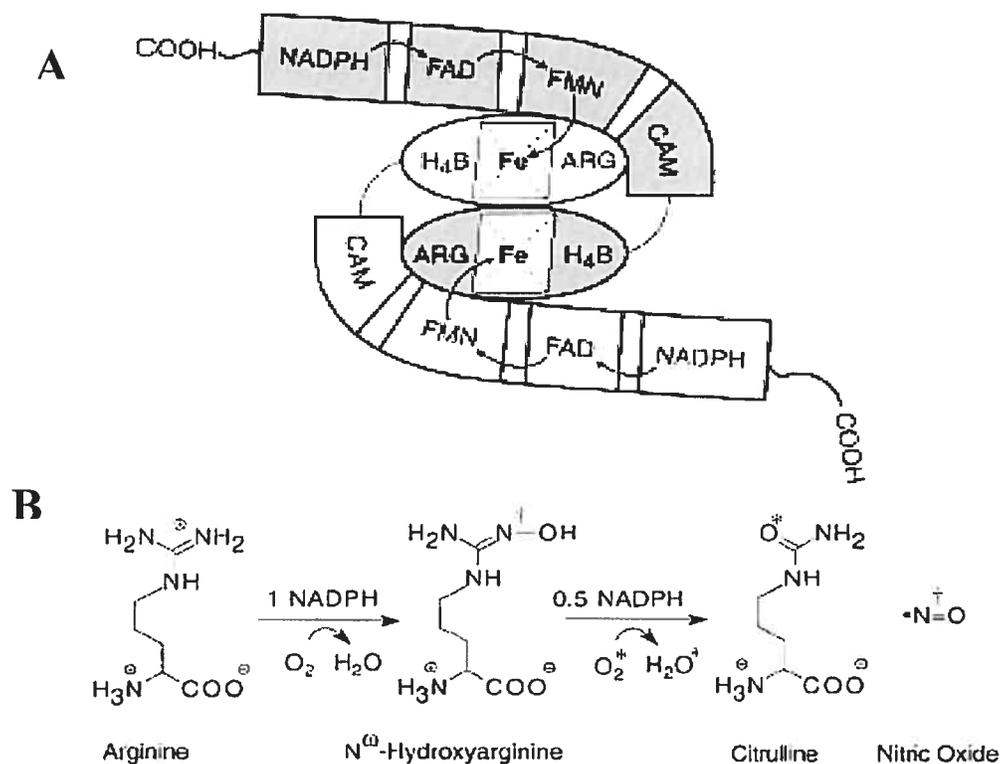
NO diffuse dans l'espace sous-endothélial et entre dans les CML afin de se lier au composé hème de la guanylate cyclase. Ceci augmente la production de la 3'-5'-guanosine monophosphate cyclique (GMPc) qui entraîne l'activation de protéines kinases dépendantes de la GMPc (PKG). Les PKG vont ensuite phosphoryler les canaux  $K^+$  créant une hyperpolarisation constitutive, une extrusion des ions  $Ca^{2+}$  et finalement, une relaxation des CML (5).

Le NO est un constituant majeur de la relaxation dépendante de l'endothélium dans les artères, incluant les artères coronaires et cérébrales. *In vivo*, les inhibiteurs de la NOS causent une vasoconstriction dans la plupart des lits vasculaires et une augmentation de la pression artérielle chez l'animal et l'humain (59). En plus de ses propriétés vasodilatatrices, le NO est aussi sécrété dans la lumière du vaisseau où il exerce un effet sur l'endothélium en inhibant l'adhésion des leucocytes et l'agrégation plaquettaire (61). De plus, même si le radical NO agit comme un anti-oxydant et termine la peroxydation lipidique, il possède aussi des effets pro-oxydants par la formation de peroxynitrite lors de sa liaison avec l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) (61).

La production de NO est régulée par des stimuli physiques et hormonaux. Le stimulus physiologique le plus important de la production de NO par les cellules endothéliales est lié au frottement du sang sur l'endothélium (forces de cisaillements). Si le débit sanguin augmente, les forces de cisaillement que subissent les cellules endothéliales vont être accrues provoquant une hausse de la production de NO et une vasodilatation afin de diminuer la résistance. Une grande variété de médiateurs circulants peuvent induire une vasodilatation *via* les cellules endothéliales en provoquant une libération de NO qui va diffuser vers les CML se trouvant à proximité et induire une dilatation.

### 1.4.1.1 La NO synthase

La NO synthase (NOS) est une protéine qui, en condition normale, est responsable de la conversion de la L-arginine en NO et en L-citrulline (62). Il existe trois isoformes de la NOS soit la forme neuronale (nNOS ou NOS1), la forme inducible (iNOS ou NOS2) et la forme endothéliale (eNOS ou NOS3). En condition physiologique, la nNOS et la eNOS se trouvent dans les neurones et l'endothélium cérébral, respectivement. Même si la iNOS n'est pas normalement exprimée dans le cerveau, un grand nombre de conditions pathologiques peuvent induire son expression dans les neurones et les vaisseaux sanguins suite à une stimulation par certaines endotoxines ou cytokines (63,64). Bien que le NO soit un important régulateur de la circulation cérébrale, l'importance relative de la eNOS et de la nNOS dans le contrôle du débit sanguin *in vivo* est encore inconnue.



**Figure 5:** (A) Représentation schématique de la NOS montrant tous les cofacteurs impliqués dans la réaction d'oxydation. (B) Schéma montrant la réaction d'oxydation effectuée par la NOS lors de la formation de NO à partir de la L-Arginine Réf: (65).

La NOS est une protéine dimérique possédant deux domaines actifs qui fonctionnent par transfert d'électron à partir du NADPH. Les trois isoformes de la NOS ont des structures et des activités catalytiques similaires. Elles partagent 50% d'homologie dans leurs séquences d'acides aminés et leur structure ressemble à celle de la NADPH cytochrome P-450 réductase (66). La NOS fonctionnelle est un homodimère formé de deux sous-unités identiques de 140 Kd liées par des ponts disulfures (66). Elle est donc une enzyme multi domaines avec un domaine hydrolase qui contient des sites de liaison pour le groupement hème, la L-arginine et la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>) ainsi qu'un domaine réductase contenant des sites de liaison pour le FMN, le FAD, le NADPH et la calmoduline (voir figure 5).

Dans les cellules endothéliales, la eNOS est localisée dans les cavéoles de la membrane plasmique où elle est associée avec la cavéoline-1 (Cav-1). Le calcium est un important régulateur de la eNOS. Suite à une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, le complexe Ca<sup>2+</sup>-calmoduline interagit avec la eNOS en la déplaçant de la Cav-1 provoquant ainsi son activation (67). La NOS peut être inhibée par des analogues de la L-arginine soit la N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA) ou la N-monométhyl-L-arginine (L-MMA) (62).

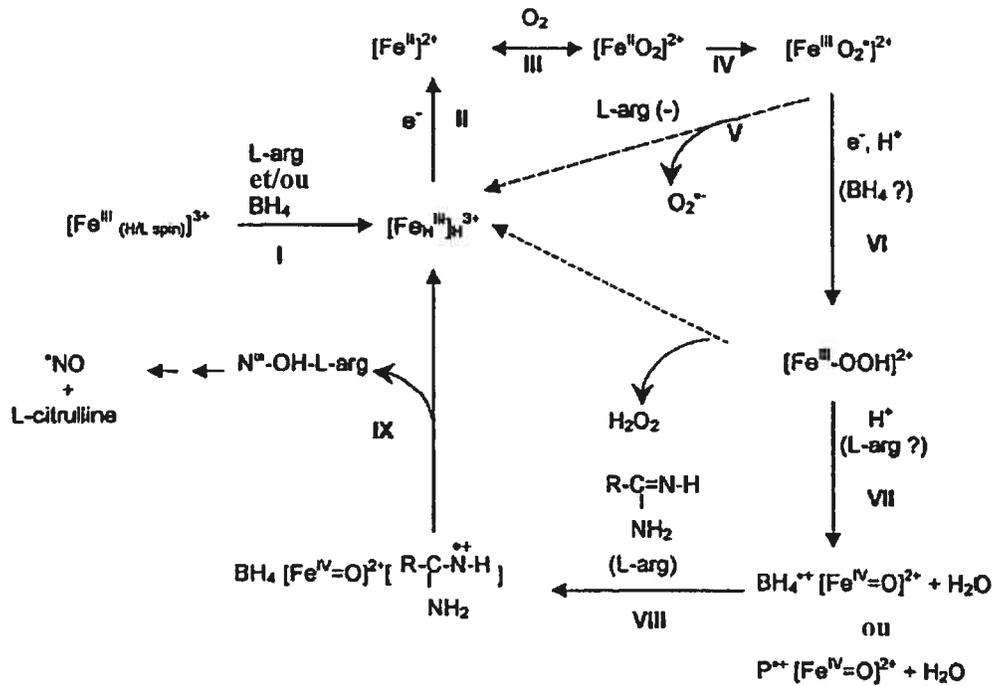
#### **1.4.1.2 La production de radicaux libres par la NOS**

Tel que mentionné précédemment, la NOS fonctionne par transfert d'électron à partir de la NADPH afin de produire du NO (voir figure 5). toutefois, la NOS a aussi la possibilité de produire des radicaux libres tels que l'anion superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Dans la littérature, l'isoforme neuronale de la NOS (nNOS) a clairement été identifiée comme une source de production de l'anion superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (68,69). Des données plus récentes ont montré que les isoformes inductible (iNOS) et endothéliale (eNOS) sont aussi capables d'induire la production de l'anion superoxide durant leur cycle enzymatique (70,71). Effectivement, même s'ils ont des localisations différentes dans le corps, leur domaine flavine a largement montré sa capacité de production de radicaux libres (71).

Même s'il a été proposé par quelques études que la diminution de L-arginine pouvait être impliquée dans la production de radicaux libres par la NOS, les recherches actuelles indiquent que le maintien d'un niveau adéquat de BH<sub>4</sub> semble être critique dans la régulation de la balance de NO et d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> produits par la eNOS (voir figure 6) (72,73,74). Le BH<sub>4</sub> est produit à partir du GTP par la GTP-cyclohydrolase I (GTPCH) et est essentiel à la production de NO par la NOS (75). La diminution de la concentration de BH<sub>4</sub> dans les cellules endothéliales chez les patients hypercholestérolémiques a été associée à une augmentation de la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et à une dysfonction endothéliale (76). De plus, l'addition de L-arginine, le substrat de la eNOS, de même que l'addition de la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), ont été rapportées comme étant capables d'améliorer la fonction endothéliale dans les conditions pathologiques (74,77,78,79,80,81,82).

Le BH<sub>4</sub> semble ne pas être seulement un cofacteur pour la NOS mais également un facteur protecteur des cellules endothéliales contre le stress oxydatif. En effet, il protège plusieurs types cellulaires, incluant les cellules endothéliales contre la toxicité des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS), du NO et du peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) (75). En plus d'être un cofacteur essentiel au fonctionnement de la NOS, le BH<sub>4</sub> est aussi nécessaire à la dimérisation de toutes les isoformes de la NOS. Bien que le BH<sub>4</sub> ait une nature anti-oxydante, l'effet de la diminution de la production d'anion superoxyde par la NOS a été attribué à son rôle dans la dimérisation plutôt qu'à celui d'anti-oxydant (83). Lors de plusieurs conditions pathologiques telles que l'athérosclérose et le diabète, le découplage de la NOS a été associé à une production de radicaux libres. Toutefois, des études récentes ont montré que le découplage de la eNOS pouvait aussi se retrouver en condition physiologique et fournir un mécanisme de protection à l'organisme (84). La génération de radicaux libres par la NOS ainsi que les mécanismes sous-jacents à cette production restent encore controversés. Toutefois, même si ce mécanisme est grandement suggéré pour les isoformes iNOS et nNOS, la eNOS semble être moins impliquée car pour des conditions réduites en BH<sub>4</sub>, elle produit une quantité

inférieure de superoxyde (85). De plus, le rôle allostérique du BH<sub>4</sub> semble être moins important pour la eNOS que pour les autres isoformes (86).



**Figure 6.** Représentation du mécanisme d'action suggéré du BH<sub>4</sub> et de la L-arginine afin d'inhiber la formation de l'anion superoxyde par la NOS. L'ordre de la réaction est identifié en chiffre romain. Réf: (87)

### 1.4.2 La prostacycline (PGI<sub>2</sub>)

Dans la dégradation des éicosanoïdes, la voie de la COX fût la première découverte et reste encore aujourd'hui la plus documentée. La prostacycline (PGI<sub>2</sub>) est produite dans la cellule endothéliale par la COX et induit une relaxation du muscle lisse vasculaire par l'activation de la PKA *via* une augmentation du 3',5'-adénosine monophosphate cyclique (AMPC) par l'adénylate cyclase (AC) (voir figure 4). Dans la plupart des vaisseaux sanguins, la contribution de la PGI<sub>2</sub> dans la dilatation dépendante de l'endothélium est moindre mais son action synergique avec le NO afin d'inhiber l'agrégation plaquettaire est non négligeable (61).

L'enzyme de la COX existe sous deux isoformes distinctes soit la COX-1 et la COX-2. À l'origine, la COX-1 était considérée comme étant l'isoforme stable et constitutive exprimée chez l'adulte alors que la COX-2 était considérée comme l'isoforme inductible de l'enzyme. Cependant, des études récentes effectuées sur les microvaisseaux cérébraux de cochons, d'humains et de rats identifient la COX-2 en tant qu'isoforme prédominante dans la circulation cérébrale en condition physiologique et pathologique (88). De plus, d'autres études montrent que les protéines de COX-1 et de COX-2 sont présentes dans les cellules vasculaires néonatales de fœtus humain indiquant que la COX-2 pourrait être importante dans la fonction des vaisseaux néonataux incluant les vaisseaux cérébraux (89). La COX produit plusieurs vasodilatateurs dont la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), la prostaglandine E<sub>2</sub> et la prostaglandine D<sub>2</sub>. Normalement, la PGI<sub>2</sub> et la prostaglandine E<sub>2</sub> sont considérées comme les métabolites majeurs de la COX. La PGI<sub>2</sub> est le plus étudié des métabolites de l'AA. Dans la vasculature cérébrale, la réaction de la COX produit la prostaglandine H<sub>2</sub> qui est ensuite convertie en PGI<sub>2</sub> par la PGI<sub>2</sub> synthase (90).

### 1.4.3 Les EDHF

Dans plusieurs lits vasculaires, l'ACh, l'ATP, la substance P ainsi que d'autres substances vasodilatatrices induisent une hyperpolarisation dépendante de l'endothélium qui contribue à la relaxation vasculaire (voir figure 4). Le facteur

hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) se définit comme un médiateur de la relaxation vasculaire non attribuable au NO ou aux prostaglandines, même si ces dernières peuvent hyperpolariser les CML. Étant plus impliqué dans la dilatation des vaisseaux de résistance, la contribution du facteur hyperpolarisant dans la dilatation dépendante de l'endothélium varie selon la nature et la grosseur du lit vasculaire étudié. Toutefois, dans les grosses artères, l'EDHF peut conduire à la dilatation dépendante de l'endothélium lorsque le NO est inhibé ou lors d'une dysfonction endothéliale (61). Même s'il était connu depuis longtemps que les CML cérébrales peuvent être hyperpolarisées par des mécanismes endothéliaux, ce n'est qu'en 1995 que sont apparus les évidences de l'existence d'un EDHF au niveaux cérébral (91).

Plusieurs candidats ont été identifiés comme EDHF au cours des dernières années; cependant, la nature exacte de ce facteur reste encore indéterminée. Parmi les meilleurs candidats se trouvent les jonctions gap, la pompe  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase, les acides époxiéicosatriénoïques (EET), les ions potassiques ( $\text{K}^+$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Au niveau systémique, l'EDHF est associé à une hyperpolarisation des CML résultant d'une hyperpolarisation des cellules endothéliales ou d'une activation des canaux potassiques sur les CML. Une hyperpolarisation des cellules endothéliales peut induire l'hyperpolarisation des CML par les jonctions gap, les canaux potassiques ou la pompe  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase. Les EET et le  $\text{H}_2\text{O}_2$  sont aussi des candidats potentiels car ils sont synthétisés et relâchés par les cellules endothéliales et peuvent activer les canaux potassiques des CML afin de créer une hyperpolarisation. Il est reconnu aujourd'hui que les EET, produits dans les cellules endothéliales par la cytochrome P450 époxygénase, entraînent une hyperpolarisation du muscle lisse *via* les canaux potassiques dépendants du calcium à grande conductance ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) (92,93,94,95).

Les canaux potassiques dépendants du calcium ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) sont des médiateurs importants de la relaxation associée aux EDHF (42). Les  $\text{K}_{\text{Ca}}$  peuvent être divisés en trois catégories soit, les canaux à grande conductance ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) sensibles à l'ibériotoxine (Ibério), les canaux à conductance intermédiaire ( $\text{IK}_{\text{Ca}}$ ) sensibles à la charybdotoxine (Chtx) et finalement, les canaux à petite conductance ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$ )

sensibles à l'apamine (APA). Contrairement aux deux autres types de canaux, les  $BK_{Ca}$  sont exprimés sur les CML alors que les  $IK_{Ca}$  et  $SK_{Ca}$  sont seulement exprimés sur les cellules endothéliales (96). L'activation de ces canaux provoque une sortie d'ions  $K^+$  de la cellule et induit une diminution du potentiel membranaire de la cellule, c'est-à-dire une hyperpolarisation. Cette hyperpolarisation peut être directement transmise aux CML par les jonctions gap (un mécanisme peu probable dans le cerveau) et induit une dilatation. Elle peut aussi augmenter l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans l'endothélium menant à la production d'un EDHF qui diffuse vers les CML afin d'induire une dilatation.

Au niveau cérébral, le  $H_2O_2$ , les canaux potassiques dépendant de l'ATP et les EET sont jusqu'à présent les meilleurs candidats suggérés (1,3,4). Toutefois, peu d'informations sont connues sur l'identité et le mécanisme d'action des EDHF au niveau cérébral, l'augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  dans les cellules endothéliales ne semble pas être toujours nécessaire (91). De plus, le mécanisme de la réponse des EDHF dans les vaisseaux semble être unique à travers les différents lits vasculaires (97). Le mécanisme d'action des EDHF cérébraux ne peut donc pas être extrapolé à partir de la circulation systémique.

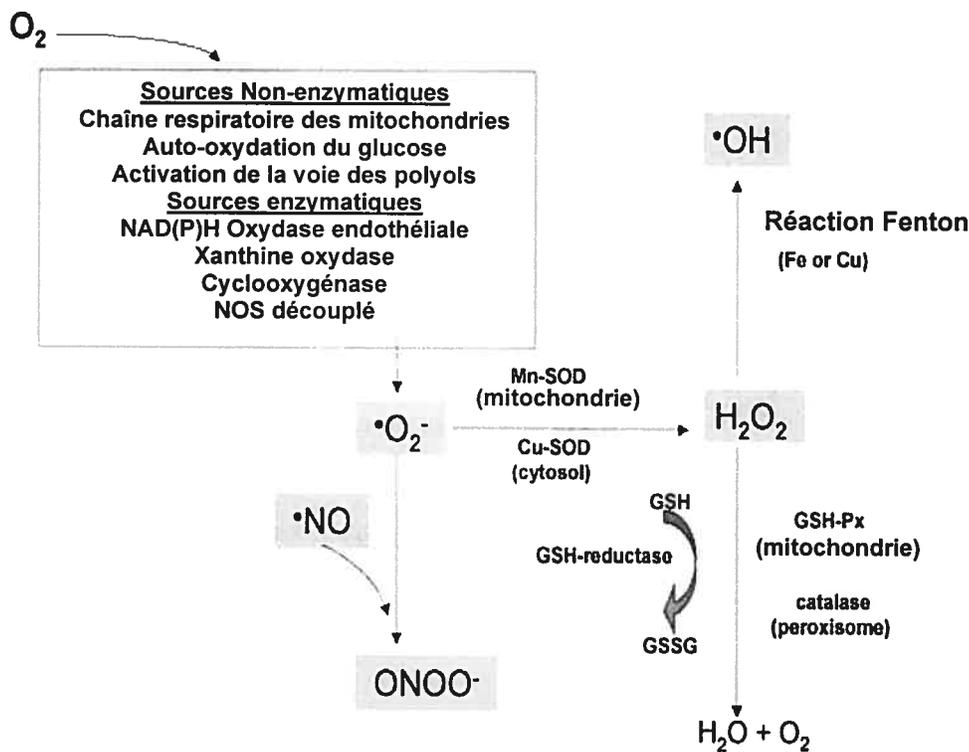
### **1.5 Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS)**

Il est traditionnellement admis que les radicaux libres ont un effet cellulaire néfaste sur les lipides, les protéines et l'ADN. En revanche, durant les dernières années, des évidences convaincantes ont montré que les radicaux libres n'ont pas seulement des conséquences toxiques sur le métabolisme cellulaire mais sont aussi des participants essentiels dans la signalisation et la régulation cellulaire. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) sont impliquées dans plusieurs voies intracellulaires pouvant induire un changement dans la transcription génique et la synthèse protéique et par conséquent, sur la fonction cellulaire. En condition physiologique, les radicaux libres sont produits en faible concentration et ils sont impliqués dans la signalisation moléculaire en régulant la contraction et la relaxation des CML. En condition pathologique, on remarque une augmentation de

la production des radicaux libres qui engendre une dysfonction endothéliale et un remodelage vasculaire.

Les ROS sont un groupe de molécules qui contiennent une ou plus d'une paire d'électrons et qui incluent des espèces telles que l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) et l'ion hydroxyle ( $OH^-$ ). Dans un plus large groupe de ROS se retrouvent le  $H_2O_2$ , le  $NO^\bullet$  et l' $ONOO^\bullet$ . L'anion superoxyde est créé à partir d'une molécule d'oxygène et il est le précurseur de plusieurs autres ROS (voir figure 7). Il existe plusieurs sources d'anion superoxyde dans la cellule endothéliale (voir figure 7) dont les mitochondries, la cyclooxygénase, la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, la lipoxygénase et, lors de conditions particulières, la NOS (98). Plusieurs types cellulaires peuvent produire de faibles niveaux de  $O_2^-$  et de  $H_2O_2$  en réponse à une variété de stimuli externes tels que les cytokines, les facteurs de croissance, les agonistes de récepteurs couplés aux protéines G et les forces de cisaillement (99). Le groupe de Flavahan a récemment suggéré que la signalisation intracellulaire liée aux ROS en condition physiologique serait plus présente dans les artérioles que dans les artères avec CML (100).

Il n'est pas encore clairement défini que les ROS sont impliquées dans la signalisation moléculaire au niveau cérébral, et cela aussi bien en conditions physiologique que pathologique. Toutefois quelques produits du métabolisme de l' $O_2^-$  tel que le  $H_2O_2$  et le  $OH^-$  semblent être de bons vasodilatateurs cérébraux et représentent des molécules importantes de la régulation du débit sanguin cérébral (101).



**Figure 7.** Simplification schématique montrant les différentes sources enzymatiques et non-enzymatiques de la formation et de la chélation de l'anion superoxyde par les différents types de cellules. Réf: (102)

### 1.5.1 Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )

Le  $H_2O_2$  est une petite molécule diffusible qui peut être synthétisée et détruite rapidement en réponse à un stimulus externe. Il remplit donc tous les critères pour être considéré comme messager intracellulaire (100). Même si le  $H_2O_2$  est décrit comme une ROS, contrairement au  $O_2^-$ , il ne possède pas d'électron libre. Cette caractéristique rend le  $H_2O_2$  plus stable et moins réactif avec les autres radicaux tissulaires (65). L'addition de  $H_2O_2$  exogène ou la production intracellulaire de  $H_2O_2$  suite à la stimulation par un agoniste peut affecter la

fonction de plusieurs protéines dont les protéines kinases, les phosphatases, les facteurs de transcription, les phospholipases, les canaux ioniques et les protéines G.

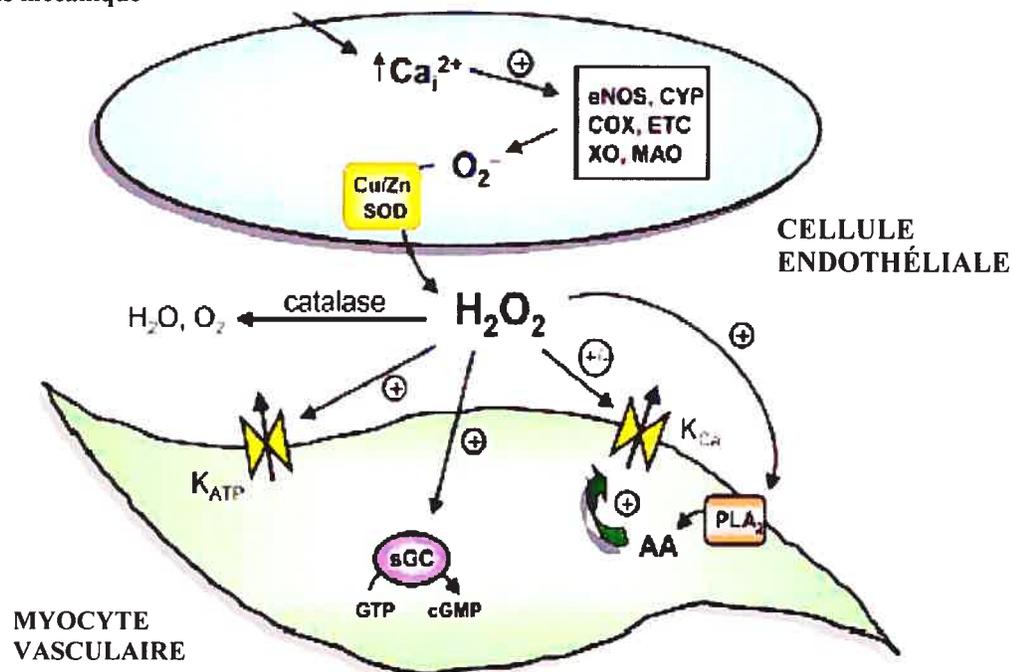
Le  $H_2O_2$  est synthétisé par la superoxide dismutase (SOD) à partir de l'anion superoxyde et est dégradé par la catalase en eau et en oxygène. Il existe trois isoformes de la SOD dont la SOD Cuivre-Zinc (Cu,Zn-SOD ou SOD 1) qui est localisée dans le cytosol, dans le noyau et en quantité moindre dans les mitochondries de tous les types cellulaires. La Cu,Zn-SOD est rapportée comme étant l'isoforme responsable de «piéger» l'anion superoxyde dérivé de la eNOS afin de prolonger la demi-vie du NO et d'inhiber la formation de  $ONOO^-$  (103). La Cu,Zn-SOD est l'isoforme le plus présent dans les vaisseaux sanguins, elle est responsable de 50 à 80% de l'activité totale des SOD (104). La SOD manganèse (MnSOD ou SOD2) est localisée dans la matrice mitochondriale et est l'isoforme principalement impliqué dans la chaîne respiratoire des mitochondries. La SOD extracellulaire (ecSOD ou SOD3) est sécrétée du côté extracellulaire et est liée à un polysaccharide à la surface de la cellule.

Des études récentes ont démontré une action contractile et vasorelaxante du  $H_2O_2$ , montrant ainsi une double action du  $H_2O_2$  sur les vaisseaux tout dépendamment de l'espèce et du lit vasculaire étudiés ainsi que de l'état de contractilité des cellules (103). Il a été suggéré par certaines études que la vasodilatation dépendante de l'endothélium induite par le  $H_2O_2$  se produit *via* une activation de la GCs par une augmentation de  $GMPC$ , (105,106) cependant d'autres études questionnent le rôle de la GCs dans cette dilatation (103). Une autre voie de dilatation privilégiée par le  $H_2O_2$  serait *via* les  $K_{Ca}$  sensibles à l'ATP et/ou au voltage. Dans certains cas, l'activation des canaux potassiques est précédée d'une activation des métabolites de l'AA suggérant une implication des éicosanoïdes dans cette dilatation. Toutefois, le rôle de ces métabolites dans la relaxation est encore indéfini (103).

En accord avec son aptitude d'activation des canaux potassiques, plusieurs études suggèrent que le  $H_2O_2$  pourrait être un EDHF dans plusieurs lits vasculaires tel qu'au niveau cérébral. Toutefois, plusieurs groupes sont en contradiction avec cette information, car ils ont été incapables de démontrer la nature hyperpolarisante

du  $H_2O_2$ . Il a été suggéré que dans certaines situations, lorsque le NO est diminué, le facteur EDHF vient compenser afin de maintenir la dilatation. Bien que l'action paracrine vasculaire du  $H_2O_2$  soit le sujet de plusieurs études, le mécanisme d'action ainsi que la source de  $H_2O_2$  sont encore très contestés dans la littérature (voir figure 8). Un article intéressant publié par Sato et al. indique que le  $H_2O_2$  exogène et endogène peuvent induire une vasodilatation par des mécanismes différents selon l'origine et la localisation du peroxyde (106)

Activation d'un récepteur,  
stress mécanique



**Figure 8.** Représentation schématique montrant les différentes sources ainsi que les différents mécanismes d'action du  $H_2O_2$  dans les cellules vasculaires. Réf: (42)

## 2 Rationnel de l'étude

La vasculature cérébrale est principalement constituée d'artères de résistance et, en raison de la nécessité d'un débit sanguin constant, ce lit vasculaire possède des caractéristiques uniques. De ce fait, les attributs des vaisseaux cérébraux ne peuvent pas être extrapolés à partir de la vasculature systémique. La caractérisation de ces vaisseaux est cependant essentielle car elle permet de comprendre les mécanismes de la dysfonction endothéliale cérébrale observée lors de pathologies telles que l'athérosclérose et le diabète.

Dans les vaisseaux cérébraux, l'implication de la NOS dans le maintien du tonus vasculaire cérébral est marquée. La production de radicaux libres par la NOS est également un sujet d'actualité contesté et mal défini. Dans la littérature, le rôle des radicaux libres dans la circulation est devenu de plus en plus complexe, en particulier en ce qui concerne le  $H_2O_2$ . Ce dernier a été suggéré comme un vasodilatateur potentiel dans les artères cérébrales de souris et dans les artères coronaires humaines. Toutefois, le mécanisme d'action de cette dilatation est encore incertain.

Comme le  $H_2O_2$  est plus stable que le NO et qu'il pourrait représenter un mécanisme de dilatation robuste dérivé de l'endothélium, nous avons émis l'hypothèse qu'en condition physiologique, le  $H_2O_2$  dérivé de l'activité de la NOS est un EDRF dans les artères cérébrales de souris. Le but de cette étude a donc été de déterminer l'implication du  $H_2O_2$  dans la dilatation dépendante de l'endothélium dans les artères cérébrales de souris.

### 3 Matériels et Méthodes

#### 3.1 Conditions expérimentales

Toutes les expériences et les procédures utilisées sont en accord avec notre guide institutionnel de la protection des animaux ainsi qu'avec le «*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of Canada*». Les expériences ont été effectuées sur des artères cérébrales de souris mâles âgées de trois mois ( $\pm 7$  jours). Deux modèles de souris ont été utilisés soit des souris témoins (WT) C57BL/6 (Charles River Laboratories, St-Constant, Quebec, Canada) et des souris C57BL/6-B6.129P2-Nos3<sup>tm1Unc/J</sup> (eNOS<sup>-/-</sup>) n'exprimant pas la protéine NO synthase endothéliale (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine 04609, U.S.A.). Le poids moyen des souris était de  $29 \pm 1$  g (WT) et  $24 \pm 1$  g (eNOS<sup>-/-</sup>). Les souris ont été anesthésiées par une inhalation de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Le cerveau a rapidement été prélevé de la cavité crânienne et placé dans une solution physiologique saline (PSS) de la composition suivante (mmol/L): NaCl 130, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 1.6, MgSO<sub>4</sub> 1.17, NaHCO<sub>3</sub> 14.9, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, EDTA 0.026, glucose 10 à 4°C. Pour certaines expériences, le cerveau a été congelé dans l'azote liquide immédiatement après le prélèvement. Les expériences effectuées ont servi à étudier la fonction endothéliale ainsi que l'expression et la fonction des protéines endothéliales par plusieurs méthodes complémentaires.

#### 3.2 Études de réactivité

Afin d'étudier la vasodilatation cérébrale dépendante de l'endothélium, nous avons utilisé une méthode précédemment décrite par notre laboratoire (107). Le montage utilisé contient une paire de micropipettes perfusées avec du PSS. Des segments de l'artère cérébrale «*postérieure*» et des artères cérébrales moyennes (voir figure 9) (diamètre de  $110 \pm 30$   $\mu$ m lorsque pressurisée à 60 mm Hg) sont prélevés du cerveau. La partie supérieure de l'artère a été placée et ligaturée sur la micropipette supérieure qui est connectée à un système de contrôle automatique de la pression et un système de perfusion (Living System, Burlington, Vermont,

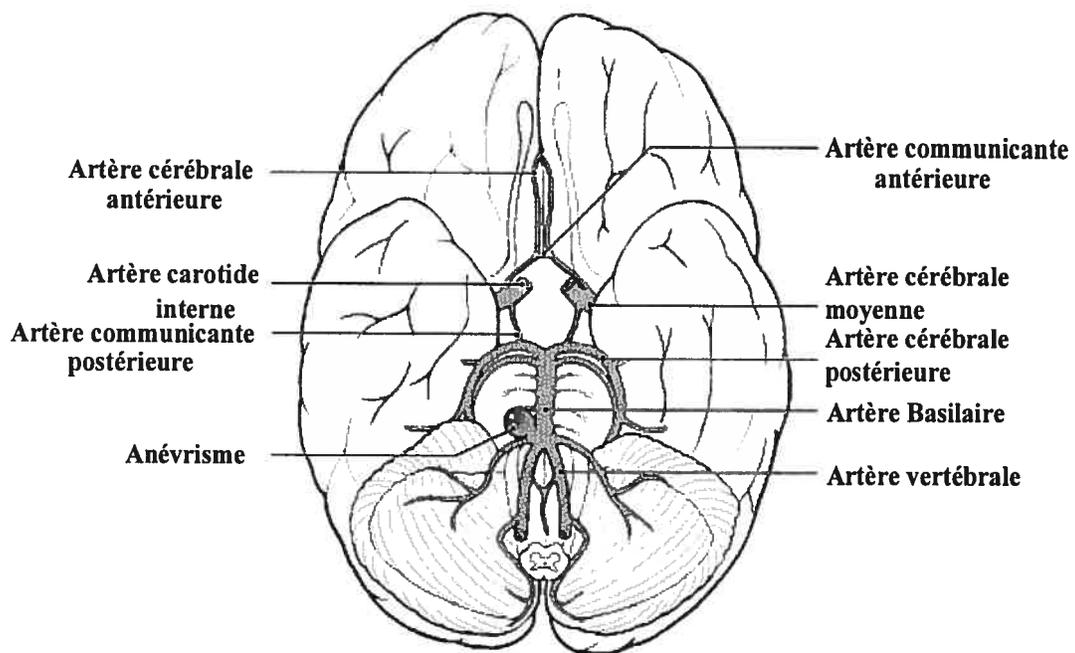
U.S.A.). L'artère a ensuite été perfusée afin d'y enlever tous les résidus de sang. La deuxième extrémité de l'artère a alors été placée et attachée sur la micropipette inférieure du montage. L'artère installée dans le système est maintenue à une pression interne constante de 60 mm Hg. Elle est oxygénée avec 12% d'oxygène (O<sub>2</sub>), 5% de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et 83% d'azote (N<sub>2</sub>) et est maintenue à 37°C avec un pH de 7.4.

Après 40 minutes d'équilibration, les artères ont également été précontractées à la phényléphrine (PE; 30 μM), un agoniste des récepteurs α<sub>1</sub>-adrénergiques situés sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux. Une contraction supérieure à 40% du diamètre initial a été considérée comme acceptable. Les changements de diamètre (dilatation) associés à l'addition de concentrations croissantes d'acétylcholine (ACh; 0.1 nM à 30 μM) ou de peroxyde d'hydrogène exogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0.1 nM à 30 μM) ont été enregistrés en utilisant un moniteur vidéo analyseur de dimensions (Living System, Burlington, Vermont, U.S.A.). À la fin de chaque protocole, la solution contenue dans le bain a été changée pour une solution de PSS ne contenant pas de calcium (PSS-calcium free) afin d'obtenir le diamètre maximal passif de l'artère.

Par cette méthode, nous avons déterminé l'implication des différents facteurs endothéliaux dans la vasodilatation des artères cérébrales de la souris. Pour ce faire, nous avons effectué des courbes concentration-réponse à l'ACh sur les artères cérébrales en présence: d'un inhibiteur de la NO synthase, le *n*-nitro-L-arginine (L-NNA; 10 μM); d'un inhibiteur de la formation des prostanoïdes endogènes, l'indométhacine (INDO, 10 μM); d'une solution physiologique dépolarisante contenant 40 mM de KCl; de différents inhibiteurs des canaux potassiques tels que l'apamine (APA; 10 μM), la charybdotoxine (Chtx; 10 μM) et l'ibériotoxine (Ibério; 10 μM), qui sont des inhibiteurs respectifs des SK<sub>Ca</sub>, IK<sub>Ca</sub> et BK<sub>Ca</sub>. Nous avons aussi utilisé différentes combinaisons de ces inhibiteurs.

Nos résultats montrent que seulement l'ibériotoxine a un effet sur la dilatation dépendante de l'endothélium dans nos artères. Les canaux BK<sub>Ca</sub> sont, contrairement aux canaux SK<sub>Ca</sub> et IK<sub>Ca</sub>, exprimés sur les cellules musculaires lisses et non sur l'endothélium, et ils peuvent induire une hyperpolarisation des cellules par

l'intermédiaire des acides époxyicosatriénoïques (EET) (95,108). Nous avons donc utilisé l'acide 14,15-époxyéicosa-5(Z)énoïque (EEZE; 1 $\mu$ M), un antagoniste des récepteurs des EET synthétisé par JR Falck (109). Une combinaison de L-NNA, d'EZEE et d'INDO a eu pour effet de bloquer complètement la dilatation à l'ACH dépendante de l'endothélium.



**Figure 9:** Base du cerveau montrant les principales artères. Les artères postérieure et moyennes ont été utilisées dans cette étude. Réf:(110)

Nous avons aussi par cette méthode, déterminé l'implication du  $H_2O_2$  et son mécanisme d'action dans la vasodilatation en effectuant des courbes concentration-réponse à l'ACh en présence de catalase (CAT; 100 U/mL), qui dégrade le  $H_2O_2$  en eau et en oxygène; de PEG-Catalase (PEG-CAT; 100U/mL), qui est la forme liposoluble; de 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethyl-imidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO; 100 $\mu$ M), un piègeur du NO; du pyruvate (PYR; 3 mM), un piègeur du  $H_2O_2$ ; du 1H-[1,2,4]Oxadiazolo-[4,3a]quinoxalin-1-one (ODQ; 10  $\mu$ M), un inhibiteur de la guanylate cyclase soluble; de la tétrahydrobioptérine ( $BH_4$ ; 1 mM), un cofacteur essentiel de la NOS; de silver diéthylthiocarbamate (DETC; 1 mM), un inhibiteur de la SOD ainsi que de différentes combinaisons de ces composés. Des courbes concentration-réponse au  $H_2O_2$  exogène (1nM-30  $\mu$ M) ont aussi été effectuées en présence des mêmes inhibiteurs.

Toutes les drogues ont été préparées dans l'eau doublement distillée sauf pour l'INDO et le EZEE qui ont été préparés dans l'éthanol et le DETC qui a été dissout dans le DMSO. L'apamine, la charybdotoxine, l'ibériotoxine, l'ACh, le  $BH_4$ , la catalase, l'INDO, le L-NNA, l'ODQ, le DETC, la PEG-catalase, le PTIO, le pyruvate et la PE proviennent de chez Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, Ontario, Canada). Le EZEE a été synthétisé par le Dr. JR Falck (Université du Texas, Dallas, TX, U.S.A.) Toutes les drogues ont été ajoutées directement dans le bain de l'artériographe (du côté extraluminal) 30 minutes avant le début des expériences et la concentration finale d'éthanol dans le bain n'a pas excédé 0.01%, donc aucun véhicule n'a été utilisé pour cette étude.

### 3.3 Études de fluorescence

Dans le laboratoire, nous avons développé une méthode appliquée sur des artères vivantes pressurisées utilisant un marqueur fluorescent se liant aux radicaux libres permettant de quantifier l'augmentation de  $H_2O_2$  et de NO suite à une stimulation de l'artère avec l'ACh en présence ou non des différents inhibiteurs. Pour ces études, les artères ont été isolées à partir de cerveaux de souris WT ou eNOS<sup>-/-</sup> tel que précédemment décrit. Les artères ont été montées et pressurisées à 60 mmHg sur un artériographe dans une solution de PSS oxygénée et maintenue à

37°C (pH 7.4). Le 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacétate acétyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA; 5 µM), un agent fluorescent qui réagit en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (111), ou le 4,5-diaminofluorescein diacétate (DAF-2; 10 µM), un agent fluorescent qui réagit en présence de NO (112), a été ajouté du côté extraluminal de l'artère 30 minutes avant le début de chaque expérience afin de permettre au composé fluorescent d'entrer dans la paroi vasculaire. Les vaisseaux ont été lavés trois fois avec du PSS, contractés avec la PE (10 µM) et dilatés avec l'ACh (10 µM) en mesurant simultanément les variations d'intensité de la fluorescence émise par la dichlorofluorescéine contenue dans les cellules suivant le clivage de la molécule d'acétate du composé fluorescent par les estérases membranaires. La contraction (PE) et la dilatation (ACh) de l'artère ont été maintenues jusqu'à la stabilisation du diamètre de l'artère soit environ 3 à 5 minutes.

Le composé fluorescent est excité à une longueur d'onde de 415-420 nm et les données de fluorescence sont obtenues à une longueur d'onde de 520 nm par un système Ionoptix Aquire (Milton, MA, U.S.A.). Un compteur de photons (PMT) a été ajouté au microscope afin d'enregistrer les données de fluorescence. Avant chaque expérience, l'état basal de fluorescence a été enregistré et les résultats représentent la différence de fluorescence entre l'artère stimulée à l'ACh et l'état basal de cette même artère au début de l'expérience. Le DCF-DA provient de Molecular Probe (Eugene, OR, U.S.A.) et le DAF-2 de Calbiochem (San Diego, CA, U.S.A.). Les agents sont préparés dans le DMSO la journée même et la concentration finale de DMSO dans le bain de l'artériographe ne dépasse jamais 0,01%.

### **3.4 Isolation des cellules endothéliales**

Dans notre étude, la NO synthase s'est avérée être une protéine essentielle dans la dilatation au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dépendante de l'endothélium. Afin de déterminer son mécanisme d'action, nous avons isolé et mis en culture des cellules endothéliales provenant de l'artère basilaire de souris WT. Pour y parvenir, l'artère basilaire a été prélevée chez des souris âgées de trois mois et les cellules endothéliales ont été mises en culture par une méthode précédemment utilisée par Thorin et al (39).

L'artère a été découpée en petits morceaux et écrasée au fond d'un pètri 35 mm préalablement strié. Les morceaux écrasés ont ensuite été incubés dans un milieu Dubelcco's modified Eagle medium (DMEM) maintenu à 37°C dans un incubateur avec 95% air/5% CO<sub>2</sub> avec addition de 10% sérum foetal bovin (FBS), 10% sérum de veau (CS), 1% penicilline-streptomycine, 90 µg/ml héparine (Sigma), 50 µg/ml de supplément de croissance pour les cellules endothéliales (EC) (Beckton Dickinson, Oakville, ON, CA), et 100 U/ml de fungizone (Gibco, Burlington, ON, CA). Le milieu de culture des cellules a été changé 3 fois par semaine. L'origine endothéliale des cellules a été confirmée par une double coloration pour le facteur von Willebrand et la molécule d'adhésion des cellules endothéliales (CD31) tel que décrit précédemment (39). Une coloration positive confirme que cette méthode permet d'obtenir des cellules endothéliales pratiquement pures (>95%). Les cellules ont été utilisées seulement au premier passage soit de 4 à 6 semaines suivant leurs mise en culture.

### 3.5 Extraction des protéines

Nous avons extrait les protéines à partir des cellules endothéliales en culture sous trois conditions soit en condition dénaturante, non dénaturante et non dénaturante avec stimulation au BH<sub>4</sub>. Les cellules de la troisième condition ont été stimulées pendant 30 min dans une solution de PSS contenant du BH<sub>4</sub> (1mM) à 37 °C. Pour chacune des conditions, le milieu de culture a été retiré et remplacé par 100 µl de trypsine durant 5 minutes afin de décoller les cellules du pètri. La trypsine a été inactivée en ajoutant 1 ml de milieu DMEM et l'homogénat a été récolté dans des tubes. Afin de recueillir les cellules, nous avons centrifugé l'homogénat 10 minutes à 13,000 rpm à 4 °C puis nous avons jeté le surnageant et lavé le culot dans du PBS pour ensuite procéder à une autre centrifugation. Le culot contenant les cellules a été récupéré et suspendu pour 30 minutes à 4 °C dans un tampon de lyse de composition suivante: 50 mmol/L de Tris-HCl, 20 mmol/L de β-glycérophosphate, 20 mmol/L de NaF, 5 mmol/L d'EDTA, 10 mmol/L d'EGTA, 1 mmol/L de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mmol/L de benzamidine, 0.5 mmol/L de PMSF, 10 mg/ml

de leupeptine, 1 mmol/L de microcystine LR, and 1% (v/v) de Triton X-100 en condition non dénaturante. En condition dénaturante, nous avons ajouté 5 mmol/L de dithiothréitol (DTT) au tampon de lyse. Après 30 minutes dans le tampon, les échantillons ont été mélangés, gelés dans l'azote liquide puis chauffés à 37 °C pendant environ 30 secondes. Cette étape a été répétée 3 fois pour chacune des conditions. Les échantillons ont été ensuite centrifugés 10 minutes à 13,000 rpm à 4 °C. Le surnageant contenant les protéines a été récupéré. Afin de déterminer la concentration en protéines de nos échantillons, une courbe (12 points) standard de la densité optique en fonction de différentes concentrations de la protéine  $\alpha$ -globuline, a été construite (0-25  $\mu$ g/ml). Le dosage des échantillons en teneur protéique a été réalisé par la méthode de Bradford.

### 3.6 Quantification des protéines (Western blot)

Le niveau de dimérisation de la protéine NO synthase endothéliale (eNOS) a été déterminé dans le lysat cellulaire en utilisant un anticorps anti-eNOS (BD Tansduction lab.). Pour chacune des conditions énumérées précédemment, 40  $\mu$ g de protéines ont été solubilisés dans un tampon Laemli (en condition dénaturante, 0.1% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoéthanol a été ajouté). Les échantillons ont été déposés sur un mini gel SDS-PAGE contenant 7% d'acrylamide. Après avoir migré (45 min, 200 mA, 4°C), les protéines ont été transférées (à 100 V, 4°C pendant 90 min) sur une membrane de nitrocellulose (0,2  $\mu$ m) dans un tampon de transfert contenant 25 mM de Tris-HCl, 200 mM de glycine et 5% de méthanol. La membrane a ensuite été bloquée pendant 2 heures dans une solution de blocage [5% (w/v) de lait en poudre (Carnation) dissout dans 25 mM de Tris (pH = 7,5 à 20°C), 150 mM de NaCl (TBS) et 0,05% (v/v) de tween-20 (TBST)] puis incubée en présence du premier anticorps (anti-eNOS) dilué 1:100 dans la solution de blocage pendant 16 heures à 4°C. Après trois lavages avec le TBST (10 min chacun), la membrane a été bloquée 10 min avec le TBST contenant 5 % de lait en poudre.

Le second anticorps [(anti-lapin conjugué à l'enzyme Horseradish peroxidase (Hrp))] a été ajouté au tampon de blocage avec une dilution de 1:10 000

pendant 2 heures supplémentaires à la température de la pièce. La fluorescence du second anticorps a été détectée en utilisant le ECL comme substrat et visualisée sur un film BioMax MR (Kodak).

La même technique a été effectuée afin de voir si la quantité de protéines insérées dans le gel est équivalente entre tous les puits. Les anticorps utilisés précédemment ont été retirés de la membrane en lavant celle-ci deux fois 15 minutes à la température de la pièce avec du NaOH 0,2 N (113). La membrane a ensuite été bloquée avec la solution de blocage et incubée avec le premier anticorps dirigé contre la protéine  $\beta$ -actine, qui est présente dans toutes les cellules endothéliales, puis lavée et incubée avec le second anticorps (anti-goat conjugué à l'enzyme Hrp) tel que décrit précédemment.

### 3.7 Statistiques

Dans toutes les études, la lettre «*n*» fait référence au nombre de souris utilisées pour chacun des protocoles. Les valeurs expriment la moyenne  $\pm$  SEM. Les variations de diamètres sont exprimées en pourcentage du diamètre maximal (%  $D_{max}$ ) déterminé par la mesure du diamètre de l'artère dans une solution de PSS ne contenant pas de Calcium ( $Ca^{2+}$  free-PSS). La sensibilité ( $pD_2$ ), qui est le logarithme négatif de l' $EC_{50}$ , est calculée pour chaque courbe concentration-réponse grâce au programme Allfit (Deléan, Université de Montréal). Le tonus myogénique est exprimé en pourcentage du  $D_{max}$ . Pour chacune des courbes concentration-réponse, un test ANOVA de type «one-way» a été effectué afin de déterminer les différences d'efficacité ( $E_{max}$ ) significatives. L'obtention d'une valeur de  $P$  inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative (Scheffe's  $F$  test).

#### 4 Article

### **Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in mouse cerebral arteries**

Annick Drouin, Nathalie Thorin-Trescases, PhD, John R. Falck<sup>1</sup>, PhD, Eric Thorin, PhD.

Université de Montréal, Department of Surgery and Research Center, Institut de Cardiologie de Montréal, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada and <sup>1</sup>Department of Biochemistry, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, U.S.A.

Corresponding author:

Dr. Eric Thorin, Institut de Cardiologie de Montréal, centre de recherche, 5000, rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330; fax.: (514) 376-1355; Email:

████████████████████

Montréal, le 26 janvier 2006

Madame Annick Drouin  


**Objet : Autorisation de déposer votre mémoire de maîtrise sous forme d'articles**

Madame Drouin,

Suite à votre demande, j'ai le plaisir de vous autoriser à présenter votre mémoire de maîtrise sous forme d'articles. Il est entendu que vous devrez vous soumettre aux conditions minimales de dépôt décrites dans le «Guide de présentation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat», édition de mars 2001. Ce document est disponible sur le site de la FES. Vous pouvez également vous le procurer à la Librairie de l'Université de Montréal.

**Cependant, afin de respecter la loi canadienne sur les droits d'auteurs, vous devrez, au moment du dépôt de votre mémoire, remettre, avec les formulaires de reproduction et diffusion dûment complétés et signés, les déclarations écrites de tous les coauteurs des articles inclus dans votre mémoire autorisant la reproduction et la diffusion de votre mémoire de maîtrise.**

Veuillez agréer, Madame Drouin, l'expression de mes sentiments les meilleurs.



Réjean Couture, Ph.D.  
Professeur titulaire  
Responsable du programme de physiologie

c.c. : Éric Thorin ✓  
Sylvie Durocher, Faculté des études supérieures

## Accord des coauteurs

### 1. Identification de l'étudiant et du programme

Annick Drouin, \*\*\* Participation à 100% dans la réalisation des expériences et à 70% dans la rédaction du papier.

M.Sc. Physiologie.

### 2. Description de l'article

Annick Drouin, Nathalie Thorin-Trescases, PhD, John R. Falck<sup>1</sup>, PhD, Eric Thorin, PhD.

**Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in mouse cerebral arteries**

A été soumis pour publication dans *Stroke* en avril 2006.

### 3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Annick Drouin** inclue cet article dans son **mémoire de maîtrise** qui a pour titre: **Le peroxyde d'hydrogène en tant que facteur vasorelaxant dans les artères cérébrales de souris**

Dr. Éric Thorin \_\_\_\_\_  
Coauteur Signature Date

Dr. Nathalie Thorin-Trescases \_\_\_\_\_  
Coauteur Signature Date

Dr. John R. Falck \_\_\_\_\_  
Coauteur Signature Date

**Accord des coauteurs****1. Identification de l'étudiant et du programme**

Annick Drouin,  
M.Sc. Physiologie.

**2. Description de l'article**

Annick Drouin, Nathalie Thorin-Trescases, PhD, John R. Falck<sup>1</sup>, PhD, Eric Thorin, PhD.

**Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in mouse cerebral arteries**

A été soumis pour publication dans *Stroke* en avril 2006.

**3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Annick Drouin** inclue cet article dans son **mémoire de maîtrise** qui a pour titre: **Le peroxyde d'hydrogène en tant que facteur vasorelaxant dans les artères cérébrales de souris**

Dr. Éric Thorin  
Coauteur



19 Mai 2006  
Date

Dr. Nathalie Thorin-Trescases  
Coauteur



19 Mai 2006  
Date

Dr. John R. Falck  
Coauteur



May 19, 2006  
Date

**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), the NIH (GM31278, JRF) and the Robert A. Welch Foundation (JRF). E. Thorin is a senior scholar of the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec*.

**Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in mouse cerebral arteries**

Université de Montréal, Department of Surgery and Research Center, Institut de Cardiologie de Montréal, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada and <sup>1</sup>Department of Biochemistry, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, U.S.A.

**Short title:** eNOS-dependent peroxide dilation

Total word count: 4000

Number of tables: 1

Number of figures: 5

**Key words:** Mouse cerebral arteries, endothelium, dilation, NOS, peroxide.

**Abstract**

**Background and Purpose**— Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) produced by the vascular endothelium is a signaling molecule regulating vascular tone. We hypothesized that  $H_2O_2$  derived from eNOS activity could play a physiological role in endothelium-dependent dilation of mouse cerebral arteries.

**Methods**— Simultaneous endothelium-dependent dilation and fluorescence-associated free radical (DCF-DA) or NO (DAF-2) production were recorded in isolated and pressurized (60 mm Hg) cerebral artery of C57Bl/6 mice.

**Results**— Without synergism, N-nitro-L-arginine (L-NNA) or the  $H_2O_2$  scavengers catalase, PEG-catalase and pyruvate reduced ( $P < 0.05$ ) by 50% the endothelium-dependent dilation induced by acetylcholine (ACh). Simultaneously to the dilation,  $H_2O_2$  – but not NO – production, sensitive to either L-NNA, catalase or pyruvate, was detected. In cerebral arteries from C57Bl/6•eNOS<sup>-/-</sup> mice, catalase had no effect on the dilation induced by ACh and no  $H_2O_2$ -associated fluorescence was observed. In C57Bl/6 mice, silver diethyldithiocarbamate (DETC), a superoxide dismutase (SOD) inhibitor, but not the specific NO scavenger 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO), prevented ACh-induced dilation and  $H_2O_2$  production suggesting that eNOS-derived superoxide is an intermediate in the production of  $H_2O_2$ . The catalase-sensitive ACh-induced dilation was restored by the eNOS cofactor tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ ). This reversal was associated with a simultaneous NO-associated fluorescence sensitive to PTIO but not to catalase or pyruvate. Soluble guanylate cyclase inhibition with 1H-[1,2,4]-oxadiazole-4,3-aquinoxalin-1-one (ODQ) prevented the dilation induced by ACh and by exogenous  $H_2O_2$ . Lastly, L-NNA, PTIO and ODQ – but not DETC, catalase or pyruvate – increased the pressure-dependent myogenic tone, suggesting that eNOS produces NO at rest, but leads to  $H_2O_2$  during muscarinic stimulation.

**Conclusions**—  $H_2O_2$ -dependent dilation in mouse cerebral arteries appears to be a physiological eNOS-derived mechanism.

## Introduction

Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), formed from superoxide ( $\text{O}_2^-$ ) as a result of the activity of various superoxide dismutases (SOD), is an important regulator of the function of the cerebrovascular wall (1,2). Although not a free radical,  $\text{H}_2\text{O}_2$  is a reactive oxidative species (ROS). It has been proposed to be an endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) both in cerebral (1) and peripheral (3-5) arteries.  $\text{H}_2\text{O}_2$  may also dilate arteries by alternative unknown means (6-8), by stimulating the production of prostanoids (9) or the soluble guanylate cyclase (sGC) (10).

In physiological condition, the origin of  $\text{O}_2^-$  that leads to the formation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  is unsettled. Endothelial NOS (eNOS) however, generates  $\text{O}_2^-$  during enzymatic cycling (11,12). The eNOS-dependent generation of  $\text{O}_2^-$  is proposed to be functionally significant only in pathological conditions and related to the limited availability of L-arginine, the substrate of eNOS, as well as of its essential cofactor tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) (13-15). This concept has been challenged in a recent review article by Rabelink and Lüscher (16) where they proposed that eNOS-dependent  $\text{O}_2^-$  generation leading to the formation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  may be relevant in physiological conditions for host defense. It is unclear however, if this concept applies to the regulation of vascular tone. Since  $\text{H}_2\text{O}_2$  is an important regulator of cerebrovascular tone (17), we have investigated the role of endogenous  $\text{H}_2\text{O}_2$  during endothelial stimulation and its dependence to eNOS activation. We hypothesized that eNOS produces physiologically relevant levels of free radicals leading to  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dependent dilation.

## Materials and methods

**Animals and tissues preparation.** The procedures and protocols were performed in accordance with our institutional guidelines and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* of Canada. Experiments were conducted on cerebral arteries isolated from 3 month-old male mice of C57BL/6 ( $29 \pm 1$  g,  $n = 66$ ; Charles River Laboratories, Quebec, Canada) and C57Bl/6•129P2-Nos3<sup>tm1Unc</sup>/J (eNOS<sup>-/-</sup>,  $24 \pm 1$  g,  $n = 6$ ; Jackson Laboratory, Maine, U.S.A.) using a method previously described (18). Cerebral arteries (*anterior*, *posterior* and *posterior communicating* cerebral arteries) as well as the *gracilis* arteries were carefully isolated, cannulated at both ends and pressurized at 60 mm Hg (cerebral arteries) or 80 mm Hg (*gracilis* arteries, ref. 18) in no-flow condition (internal diameter of 80-140  $\mu\text{m}$ ).

**Reactivity studies.** An equilibration period of 40 min was allowed before starting the experiment and the myogenic tone was measured. Similar vessel pre-constrictions (reduction of 50% of the maximal diameter) with phenylephrine (PE; 10 to 30  $\mu\text{mol/L}$ ) were obtained before each experiment. A single cumulative concentration-response curve to acetylcholine (ACh; 1 nmol/L to 30  $\mu\text{mol/L}$ ), bradykinin (0.1 nmol/L to 0.3  $\mu\text{mol/L}$ ) or exogenous hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 1 nmol/L to 30  $\mu\text{mol/L}$ ) was performed on each segment. We used catalase (100 U/mL) or PEG-catalase (50 U/mL), *N*<sup>w</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA; 10  $\mu\text{mol/L}$ ), pyruvate (3 mmol/L), a  $\text{H}_2\text{O}_2$  scavenger (19), silver diethyldithiocarbamate (DETC; 1 mmol/L), a superoxide dismutase (SOD) inhibitor, 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO; 100  $\mu\text{mol/L}$ ), a NO scavenger, indomethacin (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 14,15-epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid (EEZE; 1  $\mu\text{mol/L}$ ), a 11,12 epoxyeicosatrienoic acid (11,12 EET) receptor antagonist (20) tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ; 1 mmol/L) and 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3a]quinoxalin-1-one (ODQ; 10  $\mu\text{mol/L}$ ), a soluble guanylate cyclase (sGC) inhibitor. Apamin, charybdotoxin and iberiotoxin were used to block small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive  $\text{K}^+$  channels ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ), intermediate-conductance (I)  $\text{K}_{\text{Ca}}$  and big-conductance (B)  $\text{K}_{\text{Ca}}$ , respectively. All antagonists and inhibitors were purchased from Sigma Chemical

Co. (St. Louis, MI, U.S.A.) except for EEZE that was synthesized by Dr. JR Falck. All drugs were directly added to the bath chamber (extraluminally) 30 minutes before the beginning of the experiments and the final concentration of ethanol or DMSO never exceeded 0.01%.

**Fluorescence studies.** Pressurized cerebral arteries were incubated in oxygenated PSS (37°C) containing either 5  $\mu\text{mol/L}$  of 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (DCF-DA, a ROS-reacting fluorescent dye; Molecular Probe, OR, U.S.A.; ref. 6,21) or 10  $\mu\text{mol/L}$  of 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2, a fluorescent dye more selective to NO; Calbiochem, CA, U.S.A.; ref. 21,22) 30 min before the beginning of the experiment with or without inhibitors. Vessels were then washed with PSS, pre-constricted with PE and dilated with ACh (1  $\mu\text{mol/L}$ ) while recording simultaneously the changes in diameter and in fluorescence intensities of dichlorofluorescein retained intracellularly after cleavage of the acetate moieties. Fluorescence intensities at 492-495 nm (excitation) were measured at 520 nm with an IonOptix Acquire system (IonOptix, MA, U.S.A.). Before each experiment, basal fluorescence intensity was recorded. Results represent differences between stimulated and basal intensity.

**Endothelial cell culture.** Basilar artery of 3 month-old C57Bl/6 mice were isolated and cultured as previously described (23).

**Determination of eNOS monomers and dimers.** After 30 min incubation with or without  $\text{BH}_4$  (1 mmol), cultured EC were resuspended for 30 min in a lysis buffer and proteins separated in non-reducing gels. In reducing conditions, 5 mmol/L dithiothreitol were added. Rabbit antibody against eNOS (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) diluted 1:100 was used.

**Statistics.** *n* refers to the number of animals used in each protocol. Half-maximum effective concentrations ( $\text{EC}_{50}$ ) of ACh and exogenous  $\text{H}_2\text{O}_2$  were measured as previously described (18). The  $pD_2$  value is the  $-\log$  of the  $\text{EC}_{50}$ . Continuous

variables are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The maximal diameter ( $D_{\max}$ ) was determined by changing the PSS to a  $\text{Ca}^{2+}$ -free PSS (18). Myogenic tone is expressed as percentage of the  $D_{\max}$ . Dilations are expressed as percentage of  $D_{\max}$ . One-way 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).

## Results

**Implication of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and eNOS in cerebral vasodilation.** The NOS inhibitor N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA, 10 μmol/L) reduced the endothelium-dependent dilation to ACh of cerebral arteries (Table 1, Fig. 1A). Catalase (100 U/mL) and the cell permeable PEG-catalase (50 U/ml) likewise reduced ACh-induced dilation (Table 1, Fig. 1A and B). Combination of L-NNA and catalase had no additive inhibitory effects on the dilatory response induced by ACh (Fig. 1A). In addition, bradykinin (0.1 nmol/L – 1 μmol/L)-induced endothelium-dependent dilations ( $E_{max} = 41 \pm 3\%$ ) were also reduced by catalase ( $E_{max} = 28 \pm 4\%$ ,  $n=3$ ) ( $P < 0.05$ ).

Addition of pyruvate (3 mmol/L), a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenger, or DETC (1 mmol/L), a SOD inhibitor, reduced ACh-induced maximal dilation (Table 1, Fig. 1B). The NO scavenger PTIO (100 μmol/L) however, had no inhibitory effect on the dilation induced by ACh (Table 1, Fig. 1B).

To confirm these pharmacological data, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was assessed in pressurized vessels after incorporation of the fluorescent ROS-reactive dye, DCF-DA (24). ACh-induced dilation was associated with an increase in fluorescent intensity (Fig. 2A and C): ROS-dependent signals were abolished by L-NNA, catalase, DETC and pyruvate, but not by PTIO (Fig. 2C), demonstrating the specificity dye for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in our experimental conditions.

**ACh-induced dilation of cerebral arteries of eNOS<sup>-/-</sup> mice and *gracilis* arteries of C57Bl/6 mice.** To confirm that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> originated from eNOS, cerebral arteries were isolated from C57Bl/6•eNOS<sup>-/-</sup> mice: ACh induced a dilation that was neither affected by L-NNA nor by catalase (Fig. 3A). In addition, ACh-induced dilation did not significantly increase the fluorescence intensity of DCF-DA (+36±10 a.u. compared to +189±33 a.u. in cerebral arteries from C57Bl/6 mice;  $n=4$  per group,  $P < 0.05$ ).

Similar experiments were performed in pressurized mouse *gracilis* arteries (80-140 μm) from C57Bl/6 mice. ACh-induced dilation was sensitive to L-NNA but insensitive to catalase (Fig. 3B). ACh-induced dilation was not associated with a

rise in DCF-associated fluorescence intensity ( $+44\pm 12$  a.u. to ACh,  $1\ \mu\text{M}$ ) suggesting that  $\text{H}_2\text{O}_2$  is not a ubiquitous pathway in the vasculature.

**Effects of  $\text{BH}_4$  on eNOS activity.**  $\text{BH}_4$  ( $1\ \text{mmol/L}$ ) *per se* did not alter ACh-induced dilation (Table 1, Fig. 4A) but led to the production of NO as revealed by the apparition of a strong DAF-2-associated fluorescence that was prevented by PTIO (Fig. 2B and D) but not by pyruvate or catalase (Fig. 2D). In the presence of  $\text{BH}_4$ , the reduction of ACh-induced dilation by catalase was fully compensated (Table 1, Fig. 4A).

Cultured endothelial cells from the mouse basilar artery were incubated with or without  $\text{BH}_4$  ( $1\ \text{mmol/L}$ ). Both monomers and homodimers of eNOS proteins were detected by Western blot, and the relative expression of monomers *versus* dimers was not altered by exposure to  $\text{BH}_4$  (Fig. 4B).

**Dilatory mechanism of action of  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** ODQ ( $1\ \mu\text{mol/L}$ ), an inhibitor of the sGC, reduced the dilatory response triggered by ACh as efficiently as catalase (Table 1, Fig. 5A). Exogenous  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced an endothelium-independent dilation (Fig. 5B), which was abolished in the presence of ODQ. Likewise, catalase prevented exogenous  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced dilation.

**Impact of eNOS activity on myogenic tone.** L-NNA, PTIO and ODQ strongly increased myogenic tone (Table 1). In contrast, addition of catalase, pyruvate and DETC did not affect myogenic tone (Table 1).  $\text{BH}_4$  did not reduce the myogenic response.

**Other factors involved in ACh-induced dilation of C57Bl/6 mouse cerebral arteries.** In C57Bl/6 mouse cerebral arteries, indomethacin, a cyclooxygenase (COX) inhibitor, reduced the dilatory effect of ACh (Table 1). The involvement of EDHF was first tested in the presence of apamin and charybdotoxin (Table 1). In our experimental conditions, the combination of the two toxins did not significantly limit the dilatory response triggered by ACh (Table 1). In the presence of

iberiotoxin however, the dilation induced by ACh was reduced. Activation of BK<sub>Ca</sub> by endothelium-derived arachidonic acid metabolite 11,12 epoxyecosatrienoic acids (11,12 EET) hyperpolarizes smooth muscle (20). 14,15-epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid (EZEE), a 11,12 EET receptor antagonist (18,20) reduced ACh-induced dilation similarly to iberiotoxin. Altogether, co-addition of indomethacin, catalase and EZEE abolished ACh-induced dilation (Table 1) as efficiently as removal of the endothelium (Fig. 1A).

## Discussion

The results of the present study suggest that  $H_2O_2$  derived from eNOS activity is an EDRF in pressurized cerebral arteries isolated from C57Bl/6 mice. ACh-induced dilation was sensitive without synergism, to eNOS inhibition and  $H_2O_2$  scavengers and associated with  $H_2O_2$  production, which was prevented by L-NNA, catalase, DETC and pyruvate. This  $H_2O_2$ -dependent response was absent in cerebral arteries from eNOS<sup>-/-</sup> mice. This supports the concept that in C57Bl/6 mouse cerebral arteries, activation of eNOS-dependent dilation is partly mediated by  $H_2O_2$  and that this pathway is physiologically relevant.

Endothelial NOS inhibition limited the dilation equally to  $H_2O_2$  scavengers strongly suggesting that  $H_2O_2$  originates from stimulated eNOS activity. This hypothesis is supported by the absence of  $H_2O_2$ -associated fluorescence in cerebral arteries incubated in the presence of L-NNA and in cerebral arteries isolated from eNOS<sup>-/-</sup> mice. The specificity of the two fluorescent dyes used in the study for  $H_2O_2$  and NO (DCF-DA and DAF, respectively) is illustrated by the data presented in figure 2. While DCF signals were abolished by  $H_2O_2$  scavenging, they were insensitive to PTIO suggesting that in these healthy arteries and in our experimental conditions peroxynitrites are not produced. Peroxynitrites would have been detected by DCF (24) and their production prevented by PTIO (Fig. 2C). This interaction between  $O_2^-$  and NO occurs however, at much higher levels of  $O_2^-$  unlikely to be reached in physiologically healthy vessels (2,13-16). Likewise, additional sources of  $O_2^-$  have been reported in diseased arteries (1,2), such as NADP(H) oxidase. This pathway however, has never been shown to be significant in the endothelium whether or not the arteries are healthy. Most importantly, NADP(H) oxidase is not sensitive to activation by ACh.

The generation of  $H_2O_2$  from eNOS-derived  $O_2^-$  most likely requires endothelial superoxide dismutases (SOD) as revealed by the inhibitory effects of DETC. The critical role of SOD confirms previous reports using human coronary and submucosal intestinal arteries (4,8). *In vivo*, the dilation to ACh of cerebral arterioles of Mn SOD<sup>+/-</sup> mice is also impaired (17). Although in SOD deficient

mice, excess free radicals may have damaged the endothelium and perturb NO availability, our study further supports the concept for a physiological role of  $H_2O_2$ : a significant part of the endothelium-dependent dilation induced by ACh is reduced by  $H_2O_2$  scavenging.

The production of  $O_2^-$  by eNOS is however referred to “eNOS uncoupling” (13,15), which is believed to be associated with cardiovascular diseases (2). Re-coupling of eNOS to produce NO is achieved by exposing the endothelium to  $BH_4$  (25), a cofactor of eNOS. Our data promote the concept that the production of  $H_2O_2$  by eNOS may represent a “physiological eNOS uncoupling” state in mouse cerebral arteries. In the presence of excess  $BH_4$ , eNOS activation produced NO and restored a normal level of dilation in the presence of catalase. The “eNOS uncoupling” that leads to  $O_2^-$  production has been associated with a predominance of eNOS proteins in the monomer configuration (26). In our hands, exposure to  $BH_4$  of endothelial cells isolated from mouse basilar arteries did not favor an allosteric remodeling towards the homodimer configuration of eNOS proteins. This supports therefore the concept proposed by Rabelink and Lüscher (16) that eNOS uncoupling may occur physiologically.

Providing an excess of  $BH_4$  was not associated with a direct activation of eNOS: the myogenic tone was not decreased by the cofactor. On the other hand, L-NNA, PTIO and ODQ, unlike catalase, pyruvate and DETC, strongly increased myogenic tone supporting the current knowledge that in resting conditions, eNOS produces NO that regulates basal vascular tone (1).

The dilatory mechanisms of action of  $H_2O_2$  were first investigated by challenging the vessels with exogenous  $H_2O_2$ , which induced an endothelium-independent dilation as previously reported in human coronary arteries (4). In our hands, the dilation was initiated at low sub-nanomolar concentrations, while sub-micromolar concentrations are required in peripheral arteries (3,4). This further demonstrates the high sensitivity of mouse cerebral arteries to peroxide. This dilation was prevented by ODQ, the soluble guanylate cyclase inhibitor, suggesting that  $H_2O_2$  shares a similar dilatory pathway with NO (10). Likewise, ACh-induced dilation was prevented by ODQ.

The dilation induced by ACh was not completely blocked by catalase, suggesting the involvement of other endothelium-derived relaxing factors. Cyclooxygenase inhibition reduced significantly the efficacy of ACh likely by preventing the production of prostacyclin. In addition to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and prostacyclin, the involvement of a hyperpolarizing factor in cerebral arteries had to be expected (1). As reported by others in the cerebral circulation (27), we observed that inhibition of 11,12 EET receptors by EZEE (18) significantly impaired the dilation induced by ACh. Arachidonic acid-derived 11,12 EET hyperpolarizes smooth muscle cells by activating iberiotoxin-sensitive BK<sub>Ca</sub> channels as previously shown (20,28). Our data are therefore in line with the literature.

In conclusion, our results suggest that ACh-dependent eNOS activation leads to a dilation essentially triggered by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pressurized cerebral arteries isolated from C57Bl/6 mice. Like NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates the soluble guanylate cyclase. This “physiological eNOS uncoupling” can be overcome by providing an excess of BH<sub>4</sub> although eNOS produces NO in resting conditions. This eNOS-dependent pathway is not universally distributed in the vasculature but may be a key endothelium-dependent pathway of dilation in the brain.

## References

1. Faraci FM. Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone. *J Appl Physiol*. 2006;100:739-743.
2. Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res*. 2005;68:26-36.
3. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest*. 2000;106:1521-1530.
4. Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res*. 2003;92:e31-e40.
5. Matoba T, Shimokawa H. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Pharmacol Sci*. 2003;92:1-6.
6. Chaytor AT, Edwards DH, Bakker LM, Griffith TM. 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*. 2003;100:15212-15217.
7. Gluais P, Edwards G, Weston AH, Vanhoutte PM, Félétou M. Hydrogen peroxide and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *Eur J Pharmacol*. 2005;513:219-224.
8. Hatoum OA, Binion DG, Miura H, Telford G, Otterson MF, Gutterman DD. Role of hydrogen peroxide in ACh-induced dilation of human submucosal intestinal microvessels. *Am J Physiol*. 2004;288:H48-H54.
9. Iida Y, Katusic ZS. Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide. *Stroke*. 2000;31:2224-2230.
10. Iesaki T, Gupte SA, Kaminski PM, Wolin MS. Inhibition of guanylate cyclase stimulation by NO and bovine arterial relaxation to peroxynitrite and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Am J Physiol*. 1999;46:H978-H985.
11. Porasuphatana S, Tsai P, Rosen GM. The generation of free radicals by nitric oxide synthase. *Comp Biochem Phys Part C*. 2003;134:281-289.

12. Stroes E, Hijmering M, van Zandvoort M, Wever R, Rabelink TJ, Faassen EE. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Letters*. 1998; 438:161-164.
13. Alp NJ, Chanon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1-9.
14. Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:998-1005.
15. Katusic ZS, d'Uscio LV. Tetrahydrobiopterin: mediator of endothelial protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:397-398.
16. Rabelink TJ, Lüscher TF. Endothelial nitric oxide synthase. Host defense enzyme of the endothelium? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:267-271.
17. Faraci FM, Modrick ML, Lynch CM, Didion LA, Fegan PE, Didion SP. Selective cerebral vascular dysfunction in Mn-SOD deficient mice. *J Appl Physiol*. 2006; [Epub ahead of print].
18. Krummen S, Falck JR, Thorin E. Two distinct pathways account for EDHF-dependent dilatation in the gracilis artery of dyslipidaemic hApoB<sup>+/+</sup> mice. *Br J Pharmacol*. 2005;145:264-270.
19. Mallet RT, Sun J, Knott EM, Sharma AB, Olivencia-Yurvati AH. Metabolic cardioprotection by pyruvate: recent progress. *Exp Biol Med*. 2005;230:435-443.
20. Gauthier KM, Deeter C, Krishna UM, Reddy YK, Bondlela M, Falck JR, Campbell WB. 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid: a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries. *Circ Res*. 2002;90:1028-1036.
21. Hatoum OA, Otterson MF, Kopelman D, Miura H, Sukhotnik I, Larsen BT, Selle RM, Moulder JE, Gutterman DD. Radiation induces endothelial dysfunction in murine intestinal arterioles via enhanced production of reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:287-294.

22. Sylvester FA, Stepp DW, Frisbee JC, Lombard JH. High-salt diet depresses acetylcholine reactivity proximal to NOS activation in cerebral arteries. *Am J Physiol.* 2002;283:H353-H363.
23. Thorin E, Shatos MA, Shreeve SM, Walters CL, Bevan JA. Human vascular endothelium heterogeneity. A comparative study of cerebral and peripheral cultured vascular endothelial cells. *Stroke.* 1997;28:375-381.
24. Bevers LM, Braam B, Post JA, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ, Koomans HA, Verhaar MC, Joles JA. Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase. *Hypertension.* 2006;47:87-94.
25. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:9220-9225.
26. Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest.* 2002;109:817-826.
27. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.* 1996;78:415-423.
28. Archer SL, Gragasin FS, Wu X, Wang S, McMurtry S, Kim DH, Platonov M, Koshal A, Hashimoto K, Campbell WB, Falck JR, Michelakis ED. 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.* 2003;107:769-776.

**Table 1.** Myogenic tone (MT), efficacy ( $E_{\max}$ ) and potency ( $pD_2$ ) to acetylcholine of cerebral arteries isolated from C57Bl/6 and eNOS<sup>-/-</sup> male mice. Myogenic tone is expressed as the percentage of the maximal diameter. Vessels were equally pre-constricted with phenylephrine (10 or 30  $\mu$ M).  $E_{\max}$  are expressed as the percentage of the maximal diameter.

Groups	MT (%)	$E_{\max}$ (%)	$pD_2$	n
Control conditions	12 $\pm$ 5	45 $\pm$ 5	7.1 $\pm$ 0.5	8
+ L-NNA (10 $\mu$ M)	42 $\pm$ 6*	24 $\pm$ 2*	7.5 $\pm$ 0.2	8
+ catalase (100 U/mL)	15 $\pm$ 2	15 $\pm$ 2*	7.2 $\pm$ 0.1	6
+ catalase / L-NNA	33 $\pm$ 6*	16 $\pm$ 1*	8.1 $\pm$ 0.6	3
+ BH <sub>4</sub> (1 mM)	15 $\pm$ 2	37 $\pm$ 2	8.0 $\pm$ 0.2*	3
+ BH <sub>4</sub> / Catalase	14 $\pm$ 1	35 $\pm$ 1	8.0 $\pm$ 0.1	6
+ ODQ (1 $\mu$ M)	37 $\pm$ 6*	11 $\pm$ 1*	-	6
+ PTIO (100 $\mu$ M)	41 $\pm$ 6*	35 $\pm$ 3	7.3 $\pm$ 0.3	5
+ Pyruvate (3 mM)	10 $\pm$ 2	24 $\pm$ 2*	7.8 $\pm$ 0.3	3
+ PEG-catalase (50 U/mL)	20 $\pm$ 4	25 $\pm$ 1*	8.1 $\pm$ 0.4	3
+ DETC (1 mM)	22 $\pm$ 8	24 $\pm$ 5*	7.5 $\pm$ 0.2	3
+ indomethacin (10 $\mu$ M)	15 $\pm$ 2	26 $\pm$ 4*	8.0 $\pm$ 0.3	8
+ EZEE (1 $\mu$ M)	35 $\pm$ 5	25 $\pm$ 3*	8.1 $\pm$ 0.2	6
+ iberiotoxin (0.1 $\mu$ M)	25 $\pm$ 3	20 $\pm$ 3*	8.3 $\pm$ 0.5	6
+ apamin (1 $\mu$ M) / charybdotoxin (0.1 $\mu$ M)	23 $\pm$ 2	33 $\pm$ 2	8.7 $\pm$ 0.3	6
+ catalase / indomethacin / EZEE	22 $\pm$ 7	4 $\pm$ 1*	-	3
Control conditions in vessels from eNOS <sup>-/-</sup>	22 $\pm$ 4	41 $\pm$ 4	7.5 $\pm$ 0.9	6

Data are expressed as mean $\pm$ s.e.m. \*: P<0.05 compared to Control conditions.

**Figure 1.** ACh-induced endothelium-dependent dilations compared to denuded arteries (- endothelium) of C57Bl/6 pressurized cerebral arteries: (A) sensitivity to L-NNA (10  $\mu\text{mol/L}$ ) and catalase (100 U/ml) without synergism. (B) NO scavenging with PTIO (100  $\mu\text{mol/L}$ ) did not prevent ACh-induced dilation, while scavenging of  $\text{H}_2\text{O}_2$  by pyruvate (3 mmol/L) or PEG-catalase (50U/mL) or SOD inactivation by DETC (1 mmol/L) limited the dilation induced by ACh. \*:  $P < 0.05$  compared to control (“n” numbers are in Table 1).

**Figure 2.** Representative changes in fluorescence intensities induced by ACh in pressurized mouse cerebral arteries loaded with (A) DCF-DA (5  $\mu\text{mol/L}$ ) and (B) DAF-2 (10  $\mu\text{mol/L}$ ). Graphical representations of the increase in fluorescence intensities of DCF-DA (C) and DAF-2 (D) during ACh-induced dilation (n = 3 to 5 per group).

\*:  $P < 0.05$  compared to control; †:  $P < 0.05$  compared to  $\text{BH}_4$  or combined with catalase.

**Figure 3.** Effect of L-NNA (10  $\mu\text{mol/L}$ ) and catalase (100 U/ml) on ACh-induced dilation in (A) cerebral arteries isolated from  $\text{eNOS}^{-/-}$  mice (n = 6) and (B) *gracilis* arteries isolated from C57Bl/6 mice (n = 3). \*:  $P < 0.05$  compared to control.

**Figure 4.** Effects of  $\text{BH}_4$  alone or in combination with catalase on the endothelium-dependent dilation to ACh (A) (“n” numbers are in Table 1). In (B), representative Western blot and graphical representation showing the lack of influence of  $\text{BH}_4$  on the formation of monomers (140 Kd) and homodimers (280 Kd) of eNOS in reducing (R) and non-reducing (NR) conditions. \*:  $P < 0.05$  compared to control (experiments reproduced with 3 primary cultures).

**Figure 5.** Effects of catalase (100 U/ml) and ODQ (10  $\mu\text{mol/L}$ ) on the dilation induced (A) by ACh (n = 6 per group) and (B) by exogenous  $\text{H}_2\text{O}_2$  (with or without endothelium; n = 5 per group) in cerebral arteries from C57Bl/6 mice. \*:  $P < 0.05$  compared to control.

Figure 1

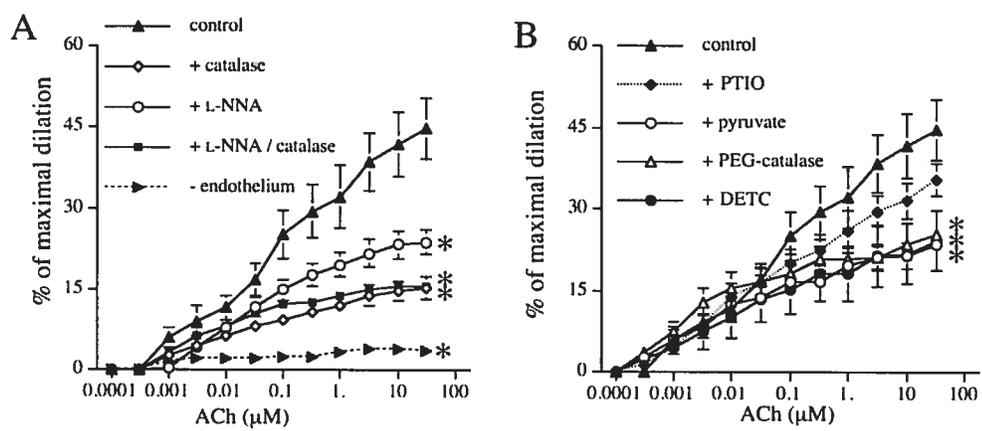


Figure 2

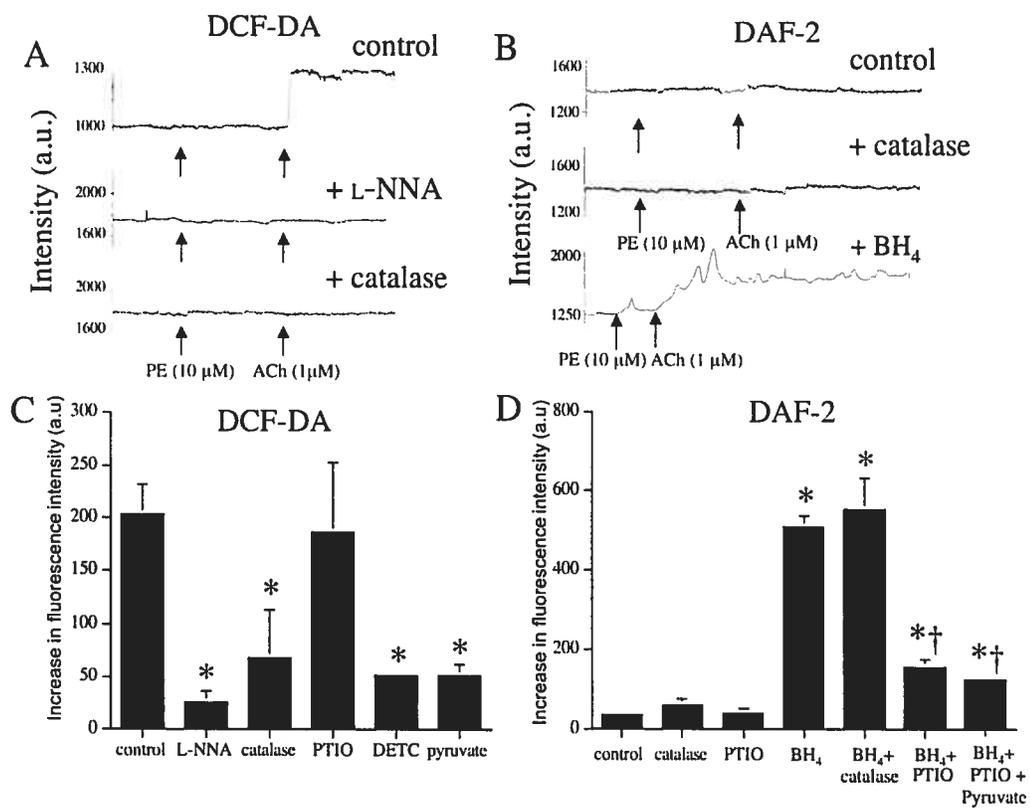


Figure 3

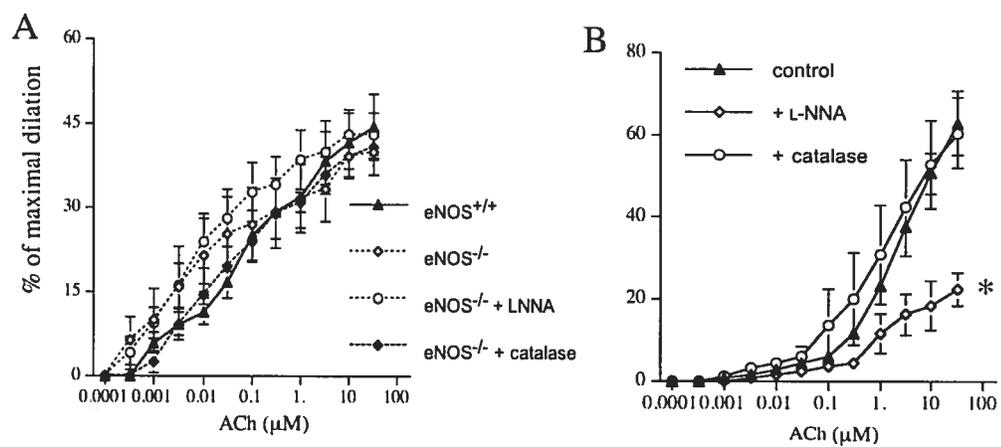


Figure 4

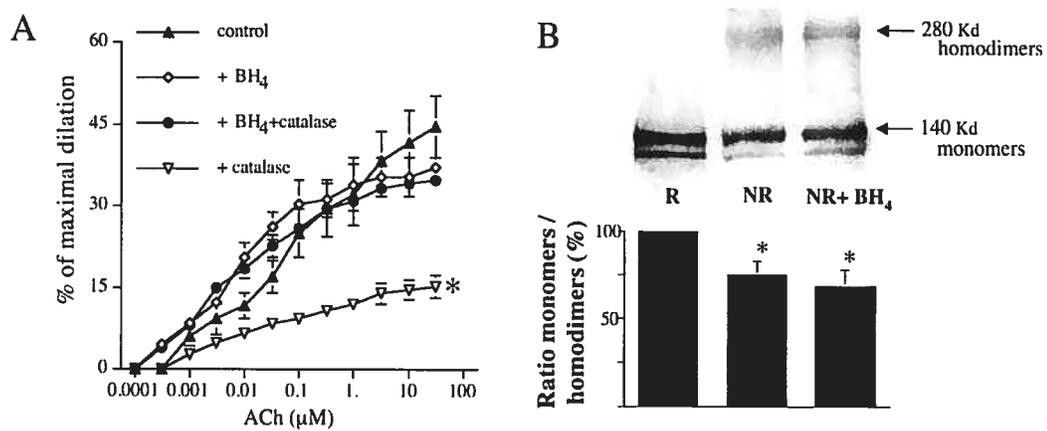
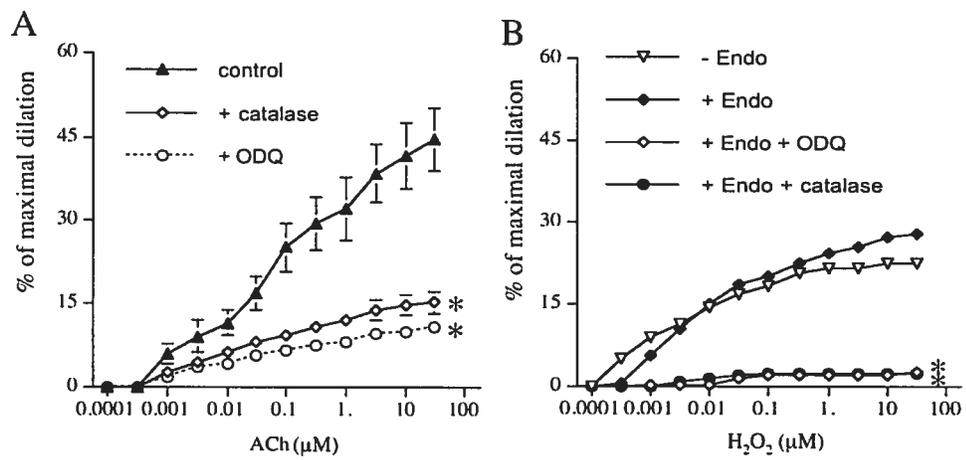


Figure 5



## 5 Discussion

Dans notre laboratoire, nous étudions l'évolution des fonctions endothéliales avec l'âge et les facteurs de risques cardiovasculaires. Tel qu'il a été mentionné précédemment, les artères cérébrales possèdent des caractéristiques uniques à travers les différents lits vasculaires. Ainsi leurs propriétés ne peuvent pas être extrapolées à partir des résultats obtenus de la circulation systémique. Le but de notre étude a été non seulement de caractériser les facteurs endothéliaux impliqués dans la dilatation des artères cérébrales mais aussi de déterminer l'implication du  $H_2O_2$  dans la dilatation dépendante de l'endothélium dans les artères cérébrales de souris.

Les résultats de cette recherche montrent que le  $H_2O_2$  provenant de l'activité de la eNOS est un EDRF dans les artères cérébrales pressurisées de souris C57Bl/6. Les premières expériences effectuées montrent que la dilatation induite par l'ACh est sensible à l'inhibition de la NOS et aux «piégeurs» du  $H_2O_2$  (soit la catalase, le DETC et le pyruvate). Cependant, aucun effet additif n'est observé lors de la combinaison de ces composés suggérant que la NOS et le  $H_2O_2$  ont une voie de dilatation similaire. De plus, lors des études de fluorescence, la dilatation muscarinique cérébrale a été associée avec une production de  $H_2O_2$  qui a été prévenue par l'addition de L-NNA, de catalase, de DETC ou de pyruvate. Ces évidences supportent le concept qu'en condition physiologique, dans les artères cérébrales de souris, la dilatation dépendante de l'activation de la eNOS dépend du  $H_2O_2$ .

Dans la littérature, il a été suggéré que la eNOS, aussi bien que la nNOS et la iNOS, est capable d'induire la production de l'anion superoxide et du  $H_2O_2$  par le biais de la SOD. Même si la formation d'anion superoxide par la NOS a été associé à différentes conditions pathologiques dans la littérature, dans cette étude, nous démontrons que la dilatation à l'ACh des artères cérébrales de souris C57Bl/6 est réduit par l'addition de L-NNA ou de catalase, suggérant que le  $H_2O_2$  impliqué dans la dilatation origine d'une production de  $O_2^-$  par la eNOS. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons utilisé des artères cérébrales de souris déficiente en

eNOS (eNOS<sup>-/-</sup>) dont la dilatation à l'ACh était insensible au L-NNA et la catalase, c'est-à-dire qu'elle n'implique pas le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la dilatation dépendante de l'endothélium. Cela est confirmée par l'absence d'augmentation de la fluorescence au DCFDA (sensible au ROS) chez les souris eNOS<sup>-/-</sup>. Il a cependant été suggéré dans la littérature que chez les eNOS<sup>-/-</sup>, la nNOS était capable de palier la production de NO. Cependant, lorsque nous avons enlevé l'endothélium de nos artères, la dilatation à l'ACh a été complètement abolie suggérant que, dans nos conditions expérimentales, la nNOS n'était pas impliquée et ne pouvait donc pas être la source de la production de l'anion superoxide et conséquemment du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

L'implication du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provenant de l'activité de la eNOS a précédemment été suggéré dans la vasodilatation des artères mésentériques de souris (3). Dans la littérature plusieurs autres sources d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> ont été rapportées dans la vasculature telles que la NADP(H) oxidase (72,99). Toutefois, il est peu probable que la NADP(H) oxidase soit la source d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans nos artères, car la production de O<sub>2</sub><sup>-</sup> par la NADPH oxidase n'est pas sensible à l'activation par l'ACh et ne s'est jamais révélé significative dans l'endothélium sain. Nous avons aussi testé la possibilité que l'anion superoxide provienne d'autres sources telles que la lipoxygénase et la cyclooxygénase. Parmi ces dernières, seule l'inhibition de la COX s'est avérée avoir un effet réducteur sur la dilatation dépendante de l'endothélium des artères cérébrales de souris. Cependant, celui-ci était additif avec celui du L-NNA et de la catalase, ne suggérant ainsi aucune implication de la COX dans la dilatation sensible au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans ces artères cérébrales.

L'hypothèse selon laquelle le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provient de l'activité de la eNOS suite à une stimulation muscarinique est confortée par l'absence d'augmentation de fluorescence au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de L-NNA et chez les souris déficiente en eNOS (eNOS<sup>-/-</sup>). Bien que la spécificité des agents fluorescent (DCFDA et DAF-2) utilisés dans cette étude ait été fortement contestée par certaines études (114) et plébiscitée par d'autres (84) les expériences effectuées lors de ce projet montrent leurs efficacités et leurs spécificités dans nos conditions expérimentales. Comme le montre la figure 2 de l'article, le DCFDA et le DAF-2 peuvent être utilisés afin de détecter respectivement l'augmentation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de NO dans les cellules

endothéliales. Le DCFDA étant sensible à la majorité des ROS, nous avons testé sa spécificité au  $H_2O_2$  dans nos conditions expérimentales. Alors que le signal au DCFDA était aboli par tous les «piégeurs» du  $H_2O_2$  utilisés, il était insensible au PTIO (un «piégeur» du NO) suggérant que le peroxy-nitrite ( $ONOO^-$ ) et le NO n'étaient pas impliqués dans la dilatation de nos artères (le peroxy-nitrite et le NO auraient été détectés par le DCFDA et abolis par l'addition de PTIO). Cependant, l'addition de la même concentration de PTIO a inhibé le signal fluorescent au DAF-2 alors que les «piégeurs» du  $H_2O_2$  n'ont eu aucun effet. Même si le DCFDA a été suggéré comme étant plus spécifique pour le  $ONOO^-$ , la littérature suggère que l'interaction entre  $O_2^-$  et le NO advient à des niveaux grandement supérieurs de stress oxydant qui ne semblent pas être atteints chez de jeunes souris en conditions physiologiques (71,74,75,85).

Dans la littérature, le  $H_2O_2$  est décrit comme une molécule de signalisation (73) dérivée de l'endothélium, reconnue pour avoir des effets vasodilatateurs dans les artères coronaires et intestinales humaines (4,115). Tel que suggéré par l'effet inhibiteur du DETC, la génération du  $H_2O_2$  à partir de l'anion superoxyde nécessite l'intervention de la superoxyde dismutase (SOD). Le rôle critique de la SOD dans cette voie de dilatation confirme les résultats déjà publiés sur les artères coronaires et intestinales humaines. De plus, chez la souris, il a récemment été rapporté que la dilatation muscarinique dépendante de l'endothélium est diminuée chez les souris déficientes en CuZn-SOD ( $Cu,Zn-SOD^{-/-}$ ), impliquant la SOD et le  $H_2O_2$  dans la dilatation dépendante de l'endothélium (116). De plus, des études *in vivo* publiés en mars 2006 par le groupe de Faraci ont montré que la vasodilatation des artérioles cérébrales à l'ACH était diminuée chez les souris déficientes en Mn-SOD ( $Mn-SOD^{-/-}$ ) (117). Même si chez la souris déficiente en SOD un excès de radicaux libres pourrait avoir endommagé l'endothélium et perturbé la biodisponibilité du NO, notre étude supporte le concept d'un rôle physiologique possible pour le  $H_2O_2$  puisqu'en condition physiologique, une partie significative de la dilatation dépendante de l'endothélium est diminuée par l'addition de «piégeur» du  $H_2O_2$  ou d'inhibiteur de la SOD.

La production de  $O_2^-$  par la eNOS est généralement associée au découplage de la NOS (74, 82) ainsi qu'à la présence de pathologie cardiovasculaire (73). Le découplage de la NOS est caractérisé par une prédominance de la NOS en configuration monomérique (118). Même si le découplage de la NOS semble être favorisé en condition pathologique, nos expériences supportent la possibilité que, dans les artères cérébrales de souris, le découplage de la eNOS survient en condition physiologique et conduise à la production de  $H_2O_2$ . Cette hypothèse est appuyée par les études de Rabelink et Lüscher qui proposent que le découplage de la eNOS est présent en condition physiologique afin de fournir un mécanisme de protection à l'organisme (82). Ainsi, la forme monomérique aussi bien que la forme dimérique pourrait être retrouvée dans les artères en condition physiologique.

Il a aussi été suggéré que le recouplage des sous-unités de la NOS est effectué par la présence du cofacteur tétrahydrobioptérine ( $BH_4$ ). Ce «couplage» de la NOS serait à la base de la régulation de la production de NO et de  $O_2^-$  par la NOS (119). Nous avons testé cette hypothèse par l'ajout d'un excès de  $BH_4$  sur les artères cérébrales. Bien que cette addition de  $BH_4$  n'ait eu aucun effet sur la dilatation basale, en présence de catalase, l'addition de  $BH_4$  a permis de rétablir la vasodilatation. L'addition de  $BH_4$  est également associée à une production de NO (études de fluorescence au DAF-2) inhibée par l'addition de PTIO, un «piégeur» du NO.

Certaines études ont soulevé l'hypothèse que la production de  $H_2O_2$  pouvait induire la production de NO *via* une stimulation de la NOS dans les cellules en culture. Or, en condition normale, l'addition de PTIO n'a eu aucun effet sur la dilatation maximale ainsi que sur la production de  $H_2O_2$  par l'artère contestant ainsi l'hypothèse selon laquelle le  $H_2O_2$  peut induire la stimulation de la NOS. Dans notre étude, nous n'avons pas été en mesure d'obtenir un signal protéique clair de la conformation de la NOS après l'isolation de tous les vaisseaux sanguins contenus dans le cerveau. Comme la fonction des cellules endothéliales *in vivo* peut être représentée par l'utilisation de cellules endothéliales en culture à passage 1 (120), nous avons utilisé des cellules endothéliales de l'artère basilaire en culture au premier passage. Toutefois, l'addition de  $BH_4$  sur ces cellules n'a pas favorisé la

dimérisation de la NOS suggérant que les formes monomériques et dimériques de la NOS sont présentes à l'état basal.

Nous avons suggéré dans cette étude que l'activation de la eNOS par l'ACh induit la production de  $O_2^-$ . Cependant, l'addition d'une grande quantité de  $BH_4$ , bien qu'associée avec une augmentation de la production de NO, n'a pas été associée avec une diminution du tonus myogénique dans les artères cérébrales. L'addition du cofacteur n'est donc pas associée à une activation directe de la eNOS. Le tonus myogénique est une caractéristique importante de l'autorégulation des vaisseaux cérébraux qui est principalement régulé par le NO. Nous avons évalué la capacité de la eNOS à produire du NO à l'état basal par la mesure du tonus myogénique. L'addition de L-NNA, de PTIO et d'ODQ, contrairement à l'addition de catalase, de pyruvate et de DETC ont augmenté significativement le tonus myogénique. Cela suggère, qu'en condition basale (dans l'autorégulation), la eNOS serait capable de produire du NO et que l'anion superoxide serait seulement produit lors de l'activation de la NOS par un agoniste tel que l'ACh. D'autres agonistes vasodilatateurs qui activent la NOS, tel que la bradykinine (BK), ont aussi été testés sur les artères cérébrales. L'addition de la catalase a significativement diminué la dilatation dépendante de l'endothélium à la BK suggérant que l'activation de la eNOS par un agoniste autre que l'ACh pourrait aussi mener à la production de  $H_2O_2$  plutôt que de NO.

Chez la souris, le  $H_2O_2$  dérivé de l'endothélium a premièrement été identifié dans les artères mésentériques comme un EDHF (3,121). Toutefois, comme plusieurs groupes n'ont pas réussi à montrer la nature hyperpolarisante du  $H_2O_2$ , l'homogénéité de ce mécanisme est encore controversée (107). Nous avons identifié le mécanisme d'action du  $H_2O_2$  par une stimulation directe du vaisseau avec du  $H_2O_2$  exogène induisant ainsi une vasodilatation indépendante de l'endothélium tel qu'il a été démontré ultérieurement dans les artères coronaires humaines (4). Alors que dans la circulation périphérique les dilatations au  $H_2O_2$  débutaient à des concentrations de l'ordre du micromolaire ( $\mu M$ ), dans nos artères, la dilatation au  $H_2O_2$  exogène a débuté à des concentrations légèrement sous le nanomolaire (nM) (3,4) suggérant une grande sensibilité des artères cérébrales de

souris au peroxyde d'hydrogène. La dilatation au  $H_2O_2$  exogène a été complètement inhibée par l'addition de l'ODQ, un inhibiteur spécifique de la guanylate cyclase soluble. Ceci suggère que le  $H_2O_2$  et le NO induisent une dilatation du muscle lisse vasculaire par des mécanismes similaires soit une augmentation de GMPc et une stimulation de la PKG. De plus, l'addition d'ODQ a significativement diminué la dilatation dépendante de l'ACh (avec une efficacité similaire à celle de la catalase) suggérant ainsi une activation de la GCs par le  $H_2O_2$  lors de la dilatation muscarinique.

Tel que suspecté à partir de la littérature, la production de  $H_2O_2$  *via* la eNOS n'est pas distribuée universellement dans la vasculature. Nous avons effectué des courbes concentrations-réponses à l'ACh sur des artères *gracilis*, qui sont des artères de résistances de diamètre similaire aux artères cérébrales utilisées. La stimulation de ces artères à l'ACh n'induisait pas la production de  $H_2O_2$ ; alors que le L-NNA diminuait significativement la dilatation dépendante de l'endothélium, la catalase n'avait aucun effet sur la dilatation. Contrairement aux artères cérébrales, la stimulation à l'ACh n'induisait pas une augmentation de fluorescence au DCFDA. La eNOS des artères *gracilis* induit donc une dilatation *via* une production de NO plutôt que de  $H_2O_2$  démontrant ainsi l'hétérogénéité de ce mécanisme à travers les différents lits vasculaires.

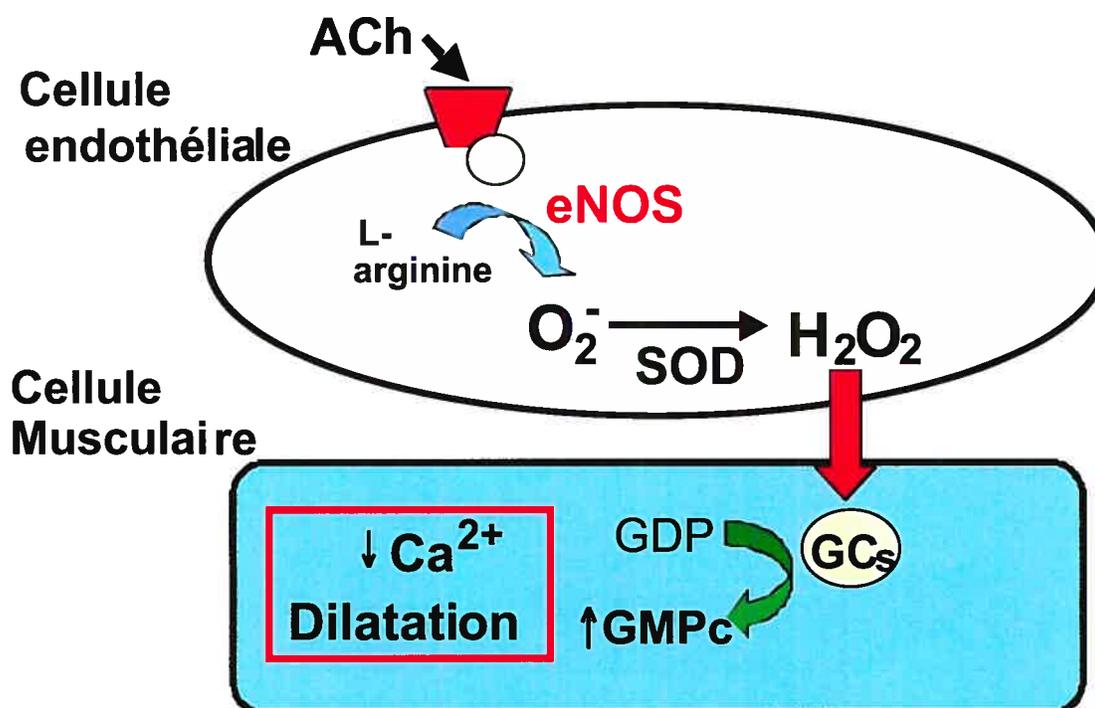
Dans nos artères, la dilatation dépendante de l'endothélium à l'ACh n'était pas complètement inhibée par l'addition de catalase, suggérant implication d'autres EDRF comme il a été suggéré dans la circulation systémique par la littérature (46). L'addition d'un inhibiteur de la cyclooxygénase a diminué significativement la dilatation maximale à l'ACh montrant l'implication d'un facteur tel que la prostacycline dans la dilatation dépendante de l'endothélium. En plus du  $H_2O_2$  et de la prostacycline, l'implication d'un facteur hyperpolarisant était à prévoir. Tel que rapporté par d'autres recherches dans la circulation cérébrale (93), nous avons observé que l'inhibition du récepteur du 11,12-EET par le EZEE (107) a diminué significativement la dilatation maximale à l'ACh. Le 11,12-EET est un produit dérivé de la cytochrome P450 époxygénase à partir de l'AA (110,122). Il a été suggéré que le 11,12-EET puisse induire une hyperpolarisation des CML par

l'activation des canaux BK<sub>Ca</sub>. Dans nos artères, l'inhibition des canaux BK<sub>Ca</sub> par l'ibériotoxine a aussi diminué significativement la dilatation à l'ACh montrant l'implication des EET et des BK<sub>Ca</sub> en tant que facteur hyperpolarisant (111). Cependant, le fait que la production de EET n'était pas associée à une activation initiale des canaux endothéliaux SK<sub>Ca</sub> et IK<sub>Ca</sub>, sensibles à l'APA et à la Chtx respectivement, était surprenant. Effectivement, dans la littérature, la séquence d'activation suivante: [agoniste → augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire → activation de SK<sub>Ca</sub> et IK<sub>Ca</sub> → hyperpolarisation endothéliale causée par un influx de Ca<sup>2+</sup> → activation des cytochromes P450 et relâche de EET] est reconnue comme un modèle de dilatation des EDHF (91,95). Toutefois, dans la vasodilatation, l'augmentation de Ca<sup>2+</sup> est aussi requise pour l'activation de la NOS et de la COX qui sont activées dans nos conditions expérimentales. Cette augmentation de Ca<sup>2+</sup> peut alors induire l'activation de la cytochrome P450 époxygénase par la même occasion. Finalement, l'addition simultanée de catalase, d'indométhacine (inhibiteur de la COX) et de EZEE a eu comme effet d'inhiber complètement la dilatation dépendante de l'endothélium à l'ACh, suggérant ainsi la présence de seulement trois facteurs relaxant dérivés de l'endothélium dans les artères cérébrales de souris.

Dans cette étude, nous n'avons pas évalué les mécanismes impliqués dans le maintien de la dilatation des artères cérébrales chez la souris eNOS<sup>-/-</sup>. Dans la littérature, il est suggéré par des études *in vivo* que la nNOS serait responsable du maintien de la dilatation chez les eNOS<sup>-/-</sup> (123,124). Toutefois, les études *in vitro* suggèrent que la COX ou les EDHF seraient les mécanismes privilégiés pour la compensation de la réponse vasodilatatrice. Une étude effectuée en 2000 par le groupe de Kaley indique que dans les artères de résistance provenant du muscle squelettique des souris eNOS<sup>-/-</sup>, le maintien de la dilatation est effectué par l'activation des canaux BK<sub>Ca</sub> par un dérivé des cytochromes P450 (125). Malgré le fait que la circulation cérébrale possède des caractéristiques particulières, cette hypothèse pourrait aussi être valable dans nos artères.

Cette étude nous a permis de déterminer l'implication des différents facteurs endothéliaux impliqués dans la dilatation des artères cérébrales et d'identifier, par une approche pharmacologique, une nouvelle voie de dilatation

impliquée dans la relaxation des artères cérébrales de souris suite à une stimulation muscarinique. Nos résultats suggèrent que l'activation de la eNOS par l'ACh induit une dilatation essentiellement régulée par le  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les artères cérébrales pressurisées de souris C57Bl/6. Tout comme le NO, le  $\text{H}_2\text{O}_2$  active la guanylate cyclase soluble au niveau du muscle lisse (voir figure 10). Le découplage physiologique de la eNOS peut être affecté par l'addition de  $\text{BH}_4$  et induire une production de NO. L'activation de la eNOS par l'ACh induit une production de  $\text{O}_2^-$  et de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; à l'état basal, toutefois, la NOS produirait du NO et non de  $\text{O}_2^-$  en absence de stimulation. Même si cette voie de dilatation dépendante de la eNOS n'est pas présente dans tous les lits vasculaires, elle pourrait s'avérer une voie de dilatation clé dans la vasorelaxation cérébrale dépendante de l'endothélium.



**Figure 10.** Schéma récapitulatif des travaux effectués montrant la voie de dilatation utilisée par le  $\text{H}_2\text{O}_2$  suite à une stimulation muscarinique dans les artères cérébrales de souris C57Bl/6.

## 5.1 Perspectives

Dans la circulation périphérique, de nombreuses études ont démontré que la fonction dilatatrice de l'endothélium était altérée non seulement par le vieillissement et les conditions pathologiques mais également par la simple présence de facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. La dyslipidémie (DL), l'hypertension et le diabète sont des facteurs de risque importants de l'accident vasculaire cérébral (AVC) et toutes ces conditions sont associées à une baisse du débit sanguin cérébral et des fonctions cognitives. Il a été démontré qu'en condition pathologique, dans les artères coronariennes, le  $H_2O_2$  devenait un EDRF important dans la régulation de la dilatation (106). La voie de dilatation suggérée par cette étude est d'autant plus importante puisqu'elle pourrait être très sensible aux facteurs de risque cardiovasculaires et aux effets du vieillissement que l'on sait être associés à une augmentation du stress oxydant. Cependant, nous possédons peu de donnée sur l'évolution de la fonction endothéliale cérébrovasculaire au cours du vieillissement, qu'elle soit associée ou non aux facteurs de risque cardiovasculaires.

Des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire montrent que les facteurs de risque pour les maladies cardiovasculaires tel que l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose diminuent la capacité des artères cérébrales de souris à maintenir le tonus myogénique pour des valeurs de pression élevées et perturbent l'élasticité de la paroi vasculaire. Les changements morphologiques et physiologiques de ces artères peuvent avoir des influences néfastes sur l'apport sanguin vasculaire. Ainsi, lors d'études ultérieures, il serait intéressant de vérifier si les facteurs de risque cardiovasculaires accélèrent le processus de vieillissement endothélial et conduisent à une baisse du débit sanguin cérébral ainsi qu'à une altération précoce des fonctions cognitives. L'identification de cette nouvelle voie de dilatation implique que l'augmentation du stress oxydant peut largement affecter la vasorelaxation des artères cérébrales et ainsi provoquer une altération des fonctions cognitives résultant d'une diminution de l'apport sanguin.

## 6 Bibliographie

---

1. Toda N. & Okamura T. Cerebral vasodilators. *Jpn. J. Pharmacol.* 1998;76:349-367.
2. Laufs U., Endres M., Stagliano N., Amin-Hanjani S., Chui DS., Yang SX., Simoncini T., Yamada M., Rabkin E., Allen PG., Huang PL., Bohm M., Schoen FJ., Moskowitz MA. & Liao JK. Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton. *J. Clin. Invest.* 2000;106:15-24.
3. Matoba T., Shimokawa H., Nakashima M., Hirakawa Y., Mukai Y., Hirano K., Kanaide H. & Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J. Clin. Invest.* 2000;106:1521-1530.
4. Miura H., Bosnjak JJ., Ning G., Saito T., Miura M. & Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ. Res.* 2003;92:e31-e40.
5. Herrmann J. & Lerman A. The endothelium:dysfunction and beyond. *J. Nucl. Cardiol.* 2001;8:197-206.
6. Université Laval. Collection Mémoires et thèses électroniques [en ligne]. Disponible sur: [www.theses.ulaval.ca](http://www.theses.ulaval.ca) (consulté le 28 avril 2006).
7. Garlanda C. & Dejana E. Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997;17(7):1193-202.
8. Thurston G., Baluk P. & McDonald DM. Determinants of endothelial cell phenotype in venules. *Microcirculation.* 2000;7(1):67-80.
9. Ghitescu L. & Robert M. Diversity in unity: the biochemical composition of the endothelial cell surface varies between the vascular beds. *Microsc. Res. Tech.* 2002;57(5):381-9.
10. Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Crit. Care. Med.* 2003;31(Suppl 4):S221-30.
11. Ge S., Song L. & Pachter JS. Where is the blood-brain barrier... really? *J. Neurosci. Res.* 2005;79:421-427.
12. Khurana G. Brain-aneurysm.com [en ligne]. Disponible sur: [www.brain-aneurysm.com](http://www.brain-aneurysm.com) (consulté le 5 mai 2006)

- 
13. Heistad D. What's new in the cerebral microcirculation? *Microcirculation*. 2001;8:365-375.
  14. Faraci FM. & Heistad DD. Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circ. Res.* 1990;66(1):8-17. Review.
  15. Baumbach GL., Walmsley JG. & Hart MN. Composition and mechanics of cerebral arterioles in hypertensive rats. *Am. J. pathol.* 1988;133(3):464-71.
  16. Folkow B., Hallback M., Lundgren Y. & Weiss L. Structurally based increase of flow resistance in spontaneously hypertensive rats. *Acta. physiol. scand.* 1970;79(3):373-8.
  17. Wolburg H. & Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vasc. Pharmacol.* 2002;28:323-337.
  18. Morita K., Sasaki H., Furuse M. & Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell. Biol* 1999;147(1):185-194.
  19. Ando-Akatsuka Y., Saitou M., Hirase T., Kishi M., Sakakibara A., Itoh M., Yonemura S., Furuse M. & Tsukita S. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA homologues. *J. Cell. Biol.* 1996;133(1):43-47.
  20. Furuse M., Sasaki H., Fujimoto K. & Tsukita S. Single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 1998;143(2):391-401.
  21. Tsukita S. & Furuse M. The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2000;915:129-135.
  22. Heiskala M., Peterson PA. & Yang Y. The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic.* 2001;2(2):93-98.
  23. Guyton AC. & JE. Hall. Textbook of Medical Physiology (10<sup>th</sup> Edition), Philadelphia, WB Saunders Co, Août 2000, 1064p.
  24. Mooradian AD. Effect of aging on the blood-brain barrier. *Neurobiol. Aging.* 1988;9(1):31-39.
  25. Bolton TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 1979;59(3):606-718. Review.

- 
26. Chapman RA. & Tunstall J. The calcium paradox of the heart. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1987;50(2):67-96. Review.
  27. Van Breemen C. & Saida K. Cellular mechanisms regulating  $[Ca^{2+}]_i$  smooth muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 1989;51:315-29. Review.
  28. Orallo F. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. *Pharmacol. Ther.* 1996;69(3):153-71. Review.
  29. Godfraind F. Calcium antagonists and vasodilatation. *Pharmacol. Ther.* 1994;64(1):37-75. Review.
  30. Kwan CY.  $Mg^{2+}$ - or  $Ca^{2+}$ - activated ATPase activities of plasma membranes isolated from vascular smooth muscle. *Enzyme.* 1982;28(4):317-27.
  31. Carafoli E. The calcium pumping ATPase of the plasma membrane. *Annu. Rev. Physiol.* 1991;53:531-47. Review.
  32. Carafoli E. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.* 1991;71(1):129-53. Review.
  33. Schubert R. & Mulvany MJ. The myogenic response: established facts and attractive hypotheses. *Clinical Science.* 1999;96:313-326.
  34. Bayliss WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J. Physiol.* 1902;28:220-231.
  35. Davis MJ. & Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol. Rev.* 1999;79:387-423.
  36. Geary GG. & Buchholz JN. Selected contribution: Effect of aging on cerebrovascular tone and  $[Ca^{2+}]_i$ . *J. Appl. Physiol.* 2003;95:1746-1754.
  37. Henrion D. Pressure and flow-dependent tone in resistance arteries. Role of myogenic tone. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 2005;98(9):913-921.
  38. Vigué B. & Ract C. Monitoring cerebral du traumatisé crânien. *Conférences d'actualisation.* 1998: 383-397.
  39. Thorin E., Shatos MA., Shreeve SM., Walters CL. & Bevan JA. Human vascular endothelium heterogeneity. A comparative study of cerebral and peripheral cultured vascular endothelial cells. *Stroke.* 1997;28(2):375-81.
  40. Bevan JJ. & Laher I. Pressure and flow-dependent vascular tone. *Faseb. J.* 1991;5:2267-2273.

- 
41. Thorin E. & Shreeve SM. Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. *Pharmacol. Ther.* 1998;78(3):155-66.
  42. Triggle CR., Hollenberg M., Anderson TJ., Ding H., Jiang Y., Ceroni L., Wiehler WB., Ng ES., Ellis A., Andrews K., McGuire JJ. & Pannirselvam M. The endothelium in health and disease-a target for therapeutic intervention. *J. Smooth. Muscle. Res.* 2003;39(6):249-67. Review.
  43. Li JM. & Shah AM. Endothelial cell superoxide generation:regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am. J. physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004;287:R1014-R1030.
  44. McGuire JJ., Ding H. & Triggle CR. Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2001;79(6):443-70.
  45. Vanhoutte PM. The other endothelium-derived vasoactive factor. *Circulation.* 1993;87(suppl V):V9-V17.
  46. De Mey JG. & Vanhoutte PM. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall:importance of the endothelium. *Circ. Res.* 1982;51:439-447.
  47. Kis B., Chen L., Ueta Y. & Busija DW. Autocrine peptide mediators of cerebral endothelial cells and their role in the regulation of blood-brain barrier. *Peptides.* 2006;27:211-222.
  48. Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K. & Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332:411-415.
  49. Ohlstein EH., Elliott JD., Feuerstein GZ. & Roffolo Jr RR. Endothelin receptors: receptor classification, novel receptor antagonists, and potential therapeutic targets. *Med. Res. Rev.* 1996;16:365-390.
  50. Andresen J., Shafi NI. & Bryan Jr RM. Endothelial influences on cerebrovascular tone. *J. Appl. Physiol.* 2006;100:318-327.
  51. Yamboliev IA., Hedges JC., Mutnick JLM., Adam LP. & Gerthoffer WT. Evidence for modulation of smooth muscle force by the p38 MAP kinase/HSP27 pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1899-H1907.

- 
52. Milan J., Charalambous C., Elhag R., Chen TC., Li W., Guan S., Hofman FM. & Zidovetzki R. Multiple signaling pathways are involved in endothelin-1 induced brain endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;291:C155-C164.
  53. Zubkov A., Miao L. & Zhang J. Signal transduction of ET-1 in contraction of cerebral arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;44 (suppl.1):24-26.
  54. Davisson RL. Physiological genomic analysis of the brain rennin-angiotensin system. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003;285:R498-R511.
  55. Ardailou R. Active fragments of angiotensin II: enzymatic pathways of synthesis and biological effects. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 1997;6:28-34.
  56. Feterik K., Smith L. & Katusic ZS. Angiotensin-(1-7) causes endothelium-dependent relaxation in canine middle cerebral artery. *Brain. Res.* 2000;873:75-82.
  57. Bogatcheva NV., Sergeeva MG., Dudek SM. & Verin AD. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvasc. Res.* 2005;69:107-127.
  58. Vanhoutte PM. Say NO to ET. *J. Auton. Nerv. Sys.* 2000;81:271-277.
  59. Vanhoutte PM. Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. *Circ. J.* 2003;67:572-575.
  60. Furchgott RF & Zawadzki JV. The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-376.
  61. Brandes RP., Fleming I. & Busse R. Endothelial aging. *Cardiovasc. Res.* 2005;66(2):286-94.
  62. Flemming I. & Busse R. NO: the primary EDRF. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1999;31:5-14.
  63. Benyo Z., Lacza Z., Hortobagyi T., Gorlach C. & Wahl M. Functional importance of neuronal nitric oxide synthase in the endothelium of rat basilar arteries. *Brain. Res.* 2000;877:79-84.
  64. Xia Y., Tsai AL., Berka V. & Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1998;273(40):25804-25808.

- 
65. Ardanaz N. & Pagano PJ. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Exp. Biol. Med.* 2006;231:237-251.
  66. Fleming I. & Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc. Res.* 1999;43:532-541.
  67. Michel JB., Feron O., Sacks D. & Michel T. Reciprocal regulation of endothelial nitric oxide synthase by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.* 1997;272:15583-15586.
  68. Pou S., Keaton L., Surichamorn W. & Rosen GM. Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1999;274:9573-9580.
  69. Pou S., Pou WS., Bredt DS., Snyder SH. & Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1992;267:24173-24176.
  70. Porasuphatana S., Tsai P. & Rosen GM. The generation of free radicals by nitric oxide synthase. *Comp. Biochem. Phys. Part. C.* 2003;134:281-289.
  71. Stroes E., Hijmering M., van Zandvoort M., Wever R., Rabelink TJ. & van Faassen EE. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS. Letters.* 1998;438:161-164.
  72. Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc. Res.* 2005;68:26-36.
  73. Alp NJ. & Chanon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24:1-9.
  74. Wever RMF., van Dam T., van Rijn HJM., de Groot F. & Rabelink TJ. Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1997;237:340-344.
  75. Shimizu S., Ishii M., Miyasaka Y., Wajima T., Negoro T., Hagiwara T. & Kiuchi Y. Possible involvement of hydroxyl radical on the stimulation of

- 
- tetrahydrobiopterin synthesis by hydrogen peroxide and peroxynitrite in vascular endothelial cells. *Int. J. Biochem. and Cell. Biol.* 2005;37:864-875.
76. Stroes E., Kastelein J., Cosentino F., Erkelens W., Wever R., Koomans H., Luscher T. & Rabelink T. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest.* 1997;99:41-46.
77. Rosen GM., Tsai P., Weaver J., Porasuphatana S., Roman LJ., Starkov AA., Fiskum G. & Pou S. The role of tetrahydrobiopterin in the regulation of neuronal nitric-oxide synthase-generated superoxide. *J. Biol. Chem.* 2002;277:40275-40280.
78. Kawashima S. Malfunction of vascular control in lifestyle-related disease: Endothelial nitric oxide (NO) synthase/NO system in atherosclerosis. *J. Pharmacol. Sci.* 2004;96:411-419.
79. Wyss CA., Koepfli P., Namdar M., Siegrist PT., Luscher TF., Camici PG. & Kaufmann PA. Tetrahydrobiopterin restores impaired coronary microvascular dysfunction in hypercholesterolaemia. *Eur. J. Nucl. Mol. Imag.* 2005;32:84-91.
80. Shinozaki K., Kashiwagi A., Masada M. & Okamura T. Stress and vascular responses: Oxidative stress and endothelial dysfunction in the insulin-resistant state. *J. Pharmacol. Sci.* 2003;91:187-191.
81. Kawashima S. & Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24:998-1005.
82. Katusic ZS. & d'Uscio LV. Tetrahydrobiopterin: mediator of endothelial protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24:397-398.
83. Bevers LM., Braam B., Post JA., van Zonneveld AJ., Rabelink TJ., Koomans HA., Verhaar MC. & Joles JA. Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decrease NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase. *Hypertension.* 2006;47:87-94.
84. Rabelink TJ. & Luscher TF. Endothelial nitric oxide synthase. Host defense enzyme of the endothelium? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26:267-271.

- 
85. Vásquez-Vivar J., Kalyanaraman B. & Martasek P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free. Radical. Research.* 2003;37(2);121-127.
86. Wever RMF., Lüscher TF., Cosentino F. & Rabelink TJ. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 1998;97:108-112.
87. Vásquez-Vivar J., Hoggs N., Martásek., Karoui H., Pritchard Jr. KA. & Kalyanaraman B. Tetrahydrobiopterin-dependent inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase. *Jour. Biol. Chem.* 1999;274(38):26736-26742.
88. Yakubu MA. & Leffler CW. Regulation of cerebral microvascular endothelial cell cyclooxygenase-2 message and activity by blood derived vasoactive agents. *Brain Research Bulletin.* 2005;68:150-156.
89. Parfenova H., Levine V., Gunther WM., Pourrycous M. & Leffler CW. COX-1 and COX-2 contributions to basal and IL-1 $\beta$ -stimulated prostanoid synthesis in human neonatal cerebral microvascular endothelial cells. *Pediatr Res.* 2002;52:342-348.
90. Smith WL., Garavito RM. & DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxidase H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 1996;271:33157-33160.
91. Golding EM., Marrelli SP., You J. & Bryan RM Jr. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in the brain: a new regulator of cerebral blood flow? *Stroke.* 2002;33:661-663.
92. Zhang Y., Oltman CL., Lu T., Lee HC., Dellsperger KC. & VanRollins M. EET homologs potently dilate coronary microvessels and activate BK(Ca) channels. *Am. J. Physiol.* 2001;280:H2430-H2440.
93. Campbell WB., Gebremedhin D., Pratt PF. & Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ. Res.* 1996;78:415-423.
94. Baron A., Frieden M. & Beny JL. Epoxyeicosatrienoic acids activate a high-conductance, Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channel on pig coronary artery endothelial cells. *J. Physiol.* 1997;504:537-543.

- 
95. Hu S. & Kim HS. Activation of K<sup>+</sup> channel in vascular smooth muscles by cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *Eur. J. Pharmacol.* 1993;230:215-221.
  96. Edwards G., Dora KA., Gardener MJ., Garland CJ. & Weston AH. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature.* 1998;396:269-272.
  97. Dong H., Jiang Y., Cole WC. & Triggle CR. Comparison of the pharmacological properties of EDHF-mediated vasorelaxation in guinea-pig cerebral and mesenteric resistance vessels. *Br. J. Pharmacol.* 2000;130:1983-1991.
  98. Faraci FM. Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone. *J. Appl. Physiol.* 2006;100:739-743.
  99. Rhee SG., Chang TS., Bae YS., Lee SR. & Kang SW. Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003;14:S211-S215.
  100. Nowicki PT., Flavahan S., Hassanain H., Mitra S., Holland S., Goldschmidt-Clermont PJ. & Flavahan NA. Redox signaling of the arteriolar myogenic response. *Circ. Res.* 2001;89:114-116.
  101. Paravicini TM., Drummond GR. & Sobey CG. Reactive oxygen species in the cerebral circulation: physiological roles and therapeutic implications for hypertension and stroke. *Drugs.* 2004;64(19):2143-2157.
  102. Johansen JS., Harris AK., Rychly DJ. & Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology.* 2005;4(1):5.
  103. Stuehr D., Pou S. & Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 2001;276:14533-14536.
  104. Morikawa K., Shimokawa H., Matoba T., Kubota H., Akaike T., Talukder MA., Hatanaka M., Fujiki T., Maeda H., Takahashi S. & Takeshita A.. Pivotal role of Cu,Zn-superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. *J. Clin. Invest.* 2003;112(12):1871-1879.
  105. Fujimoto S., Asano T., Sakai M., Sakurai K., Takagi D., Yoshimoto N. & Itoh T. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced relaxation in rabbit mesenteric small artery. *Eur. J. Pharmacol.* 2001;412:291-300.

- 
106. Sato A., Sakuma I. & Gutterman DD. Mechanism of dilation to reactive oxygen species in human coronary arterioles. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2003;285:H2345-H2354.
107. Krummen S., Falck JR. & Thorin E. Two distinct pathways account for EDHF-dependent dilatation in the gracilis artery of dyslipidaemic hApoB<sup>+/+</sup> mice. *Br. J. Pharmacol.* 2005;145:264-270.
108. Archer SL., Gragasin FS., Wu X., Wang S., McMurtry S., Kim DH., Platonov M., Koshal A., Hashimoto K., Campbell WB., Falck JR. & Michelakis ED. 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.* 2003;107(5):769-776.
109. Gauthier KM., Deeter C., Krishna UM., Reddy YK., Bondlela M., Falck JR. & Campbell WB. 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid: a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries. *Circ. Res.* 2002;90(9):1028-1036.
110. Queen's Printer for Ontario. Workplace Safety and Insurance Appeals Tribunal [en ligne]. Disponible sur: [www.wsiat.on.ca](http://www.wsiat.on.ca) (consulté le 15 Avril 2006).
111. Chaytor AT., Edwards DH., Bakker LM. & Griffith TM. 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. U.S.A.* 2003;100(25):15212-15217.
112. Sylvester FA. Stepp DW. Frisbee JC. & Lombard JH. High-salt diet depresses acetylcholine reactivity proximal to NOS activation in cerebral arteries. *Am. J. Physiol.* 2002;283(1):H353-363.
113. Suck RW. & Krupinska K. Repeated probing of western blots obtained from coomassie brilliant blue-stained or unstained polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1996;21(3):418-422.
114. Gomes A., Fernandes E. & Lima JL. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2005;65:45-80.

- 
115. Hatoum OA., Binion DG., Miura H., Telford G., Otterson MF. & Gutterman DD. Role of hydrogen peroxide in ACh-induced dilation of human submucosal intestinal microvessels. *Am. J. Physiol.* 2004;288:H48-H54.
116. Cooke CM. & Davidge ST. Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. *Cardiovasc. Res.* 2003;60:635-642.
117. Faraci FM., Modrick ML., Lynch CM., Didion LA., Fegan PE. & Didion SP. Selective cerebral vascular dysfunction in Mn-SOD deficient mice. *J. Appl. Physiol.* 2006;100(6):2089-93.
118. Zou MH., Shi C. & Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J. Clin. Invest.* 2002;109:817-826.
119. Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Martasek P., Hogg N., Masters BS., Karoui H., Tordo P. & Pritchard KA Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;95:9220-9225.
120. Nachman RL. & Jaffe EA. Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology. *J. Clin. Invest.* 2004;114:1037-1040.
121. Fujiki T., Shimokawa H., Morikawa K., Kubota H., Hatanaka M., Talukder MA., Matoba T., Takeshita A. & Sunagawa K. Endothelium-derived hydrogen peroxide accounts for the enhancing effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25:766-771.
122. Fisslthaler B., Popp R., Kiss L., Potente M., Harder DR., Fleming I. & Busse R. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature.* 1999; 401: 493-497.
123. Meng W., Ayata C., Waeber C., Huang PL. & Moskowitz MA. Neuronal NOS-cGMP-dependent ACh-induced relaxation in pial arterioles of endothelial NOS knockout mice. *Am. J. Physiol.* 1998;274:H411-H415.

- 
124. Lamping KG., Nuno DW., Shesely EG., Maeda N. & Faraci FM. Vasodilator mechanisms in the coronary circulation of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2000;279:H1906-H1912.
125. Huang A., Sun D., Smith CJ., Connetta JA., Shesely EG., Koller A. & Kalet G. In eNOS knockout mice skeletal muscle arteriolar dilation to acetylcholine is mediated by EDHF. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2000;278:H762-H768.

