

Université de Montréal

Effet du probucol sur la dysfonction endothéliale des artères  
coronaires épicaudiques en présence d'une hypertrophie ventriculaire  
gauche dans un modèle porcin

Par  
**Marie-Claude Aubin**

Département de Pharmacologie  
Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en pharmacologie

Juillet, 2005

© Marie-Claude Aubin, 2005



W

4

U58

2005

v. 182

## 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 :

Rôle du probucol dans la dysfonction endothéliale des artères coronaires  
épicardiques en présence d'une hypertrophie ventriculaire gauche dans un  
modèle porcin

Présenté par  
Marie-Claude Aubin

a été évalué par un jury composé des personnes  
suivantes :

Dr Chantal Lambert

Président-rapporteur

Dr Louis P Perrault

Directeur de recherche

Dr Éric Thorin

Membre du jury

## RÉSUMÉ

Le stress oxydatif contribue de façon importante au développement de la dysfonction endothéliale coronarienne associée à l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG). Une intervention thérapeutique avec l'antioxydant probucol pourrait être bénéfique afin de limiter le développement et la progression d'une HVG et de la dysfonction endothéliale associée des artères coronaires épicaudiques.

L'HVG est induite expérimentalement par un cerclage aortique (CA) chez des porcelets âgés de 2 mois. Le groupe témoin n'a pas été soumis au CA et le groupe avec CA non traité a reçu un placebo. Trois groupes avec CA ont reçu, à différents intervalles, un traitement de probucol de 1000 mg/jour *per os*. La progression de l'HVG a été suivie par échocardiographie et par l'hypertrophie des cardiomyocytes et la fibrose interstitielle par histologie. La réactivité vasculaire, la fonction endothéliale (nitrite/nitrate et GMPc) et le stress oxydatif (angiotensine II, hydroperoxydes et superoxyde dismutase) ont également été évalués.

Chez les trois groupes traités, il y a eu une diminution significative de l'HVG (masse ventricule gauche, hypertrophie des cardiomyocytes et fibrose) relativement au groupe non traité. Au niveau vasculaire, le traitement au probucol a significativement amélioré les relaxations dépendantes de l'endothélium et était associé à une augmentation de l'activité de la eNOS (nitrite/nitrate :  $2,33 \pm 0,31$  ;  $0,97 \pm 0,22$  ;  $3,23 \pm 0,39$  ;  $2,66 \pm 0,57$  ;  $1,00 \pm 0,11$  pour les groupes 1, 2, 3, 4 et 5 respectivement.  $p < 0,05$  pour le groupe 2 vs 1 et pour les groupes 3 et 4 vs 2) et de la biodisponibilité du NO• (GMPc :  $37,13 \pm 4,93$  ;  $16,46 \pm 2,72$  ;  $36,09 \pm 3,7$  ;  $35,40 \pm 3,45$  ;  $31,30 \pm 2,63$  pmol/mg de protéines pour les groupes 1, 2, 3, 4 et 5 respectivement.  $p < 0,01$  pour le groupe 2 vs 1 et pour les groupes 3, 4 et 5 vs 2). Au niveau du stress oxydatif, le probucol a diminué la peroxydation des lipides (hydroperoxydes ;  $2,96 \pm 0,58$  ;  $8,18 \pm 0,76$  ;  $3,80 \pm 0,62$  ;  $4,16 \pm 0,51$  ;  $4,55 \pm 0,54$  pg/ml pour les groupes 1, 2, 3, 4 et 5 respectivement.  $p < 0,001$  pour le groupe 2 vs 1 et pour les groupes 3, 4 et 5 vs 2) ainsi que les niveaux d'angiotensine II ( $5,41 \pm 2,81$  ;  $33,18 \pm 0,61$  ;  $6,08 \pm 0,80$  ;  $7,26 \pm 0,70$  ;  $13,78 \pm 2,87$  mM pour les groupes 1, 2, 3, 4 et 5 respectivement.  $p \leq 0,008$  pour le groupe 2 vs 1 et pour les groupes 3, 4 et 5 vs 2). Par contre, il n'a eu aucun effet sur la capacité antioxydante (SOD).

Dans un modèle porcin d'HVG secondaire à un CA, l'administration du probucol limite le développement et la progression d'une HVG et de la dysfonction endothéliale coronarienne associée.

**Mots clés :** Artère coronaire épicaudique — Dysfonction endothéliale — Hypertrophie ventriculaire gauche — Stress oxydatif — Probucol

## ABSTRACT

Oxidative stress plays an important role in the development of the endothelial dysfunction associated with left ventricular hypertrophy (LVH). A therapeutic intervention with the antioxidant drug probucol may be beneficial in order to limit the development and the progression of the LVH and of the associated epicardial coronary arteries endothelial dysfunction.

LVH was induced by performing an aortic banding (AB) on two month old swine. The control group was not submitted to AB whereas the untreated AB group received a placebo. Three groups with AB received, at different intervals, probucol 1000 mg/day *per os*. The degree of LVH was assessed by serial echocardiographic studies and cardiomyocyte transversal area as well as interstitial fibrosis with histological studies. Vascular reactivity, endothelial function (nitrites/nitrates and cGMP) and oxidative stress (angiotensin II, hydroperoxide and superoxide dismutase) were also assessed.

In the three treated AB groups, there was a significant decrease in LVH (left ventricle/body weight, cardiomyocyte hypertrophy and interstitial fibrosis) in comparison with the untreated AB group. Moreover, probucol significantly improved vascular endothelium-dependent relaxations, associated with an increased eNOS activity (nitrite/nitrate:  $2.33 \pm 0.31$  ;  $0.97 \pm 0.22$  ;  $3.23 \pm 0.39$  ;  $2.66 \pm 0.57$  ;  $1.00 \pm 0.11$  for groups 1, 2, 3, 4 and 5 respectively.  $p < 0.05$  for group 2 vs 1 and for groups 3 and 4 vs 2) and NO• bioavailability (cGMP:  $37.13 \pm 4.93$  ;  $16.46 \pm 2.72$  ;  $36.09 \pm 3.70$  ;  $35.40 \pm 3.45$  ;  $31.30 \pm 2.63$  pmol/mg proteins for groups 1, 2, 3, 4 and 5 respectively.  $p < 0.01$  for group 2 vs 1 and for groups 3, 4 and 5 vs 2). Lastly, probucol acted on oxidative stress, decreasing lipid peroxidation (hydroperoxides:  $2.96 \pm 0.58$  ;  $8.18 \pm 0.76$  ;  $3.80 \pm 0.62$  ;  $4.16 \pm 0.51$  ;  $4.55 \pm 0.54$  pg/ml for groups 1, 2, 3, 4 and 5 respectively.  $p < 0.001$  for group 2 vs 1 and for groups 3, 4 and 5 vs 2) and angiotensin II levels ( $5.41 \pm 2.81$  ;  $33.18 \pm 0.61$  ;  $6.08 \pm 0.80$  ;  $7.26 \pm 0.70$  ;  $13.78 \pm 2.87$  mM for groups 1, 2, 3, 4 and 5 respectively.  $p \leq 0.008$  for group 2 vs 1 and for groups 3, 4 and 5 vs 2).. On the other hand, probucol did not modify antioxidant capacity (superoxide dismutase activity).

In a porcine model of LVH secondary to AB, the antioxidant probucol limits the development and the progression of the LVH and of the associated coronary endothelial dysfunction.

**Key words :** Endothelial dysfunction — Epicardial coronary artery — Left ventricular hypertrophy — Oxidative stress — Probucol



## TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DES MEMBRES DU JURY	II
RÉSUMÉ .....	III
ABSTRACT .....	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VII
LISTE DES FIGURES .....	IX
LISTE DES ABBRÉVIATIONS .....	XI
REMERCIEMENTS .....	XV
CHAPITRE PREMIER .....	1
<i>INTRODUCTION</i> .....	1
CHAPITRE DEUXIÈME .....	4
<i>FONCTIONS DE L'ENDOTHÉLIUM SAIN</i> .....	4
<i>Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium</i> .....	6
Monoxyde d'azote.....	7
Prostacycline.....	12
Facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium/hyperpolarisation dépendante de l'endothélium (EDH(F)).....	13
<i>Facteurs contractants dérivés de l'endothélium</i> .....	15
Angiotensine II (Ang II).....	15
Endothéline-1 .....	17
Prostanoïdes vasoconstricteurs.....	19
CHAPITRE TROISIÈME .....	21
<i>ESPÈCES RÉACTIVES OXYGÉNÉES (ERO)</i> .....	21
<i>Molécules</i> .....	22
Anion superoxyde .....	22
Peroxyde d'hydrogène .....	23
Peroxynitrite.....	24
Radical hydroxyl.....	26
<i>Sources des ERO</i> .....	27
Mitochondrie.....	28
Xanthine Oxydoréductase .....	28
NOS .....	29
NAD(P)H oxydase .....	30
<i>Antioxydants endogènes</i> .....	34
Superoxyde dismutase.....	34
Catalase.....	35
Glutathion peroxydase .....	35
<i>Rôles des ERO</i> .....	36
CHAPITRE QUATRIÈME .....	39
<i>IMPLICATION DU STRESS OXYDATIF DANS LA DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE DE DIFFÉRENTES PATHOLOGIES</i>	
<i>CARDIOVASCULAIRES</i> .....	39
<i>Vieillessement et régénération de l'endothélium</i> .....	40
<i>Diabète</i> .....	41
<i>Ischémie/reperfusion</i> .....	42
<i>Hypertension artérielle (HTA) systémique</i> .....	43
<i>Hypertension pulmonaire (HTP)</i> .....	45
<i>Athérosclérose</i> .....	46

<i>Hypertrophie ventriculaire gauche</i> .....	48
<i>Insuffisance cardiaque (IC)</i> .....	50
<b>CHAPITRE CINQUIÈME</b> .....	<b>53</b>
<i>TRAITEMENT ET APPROCHE THÉRAPEUTIQUE DE LA DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE ASSOCIÉE AU STRESS</i>	
<i>OXYDATIF</i> .....	53
<i>Inhibition de l'activité prooxydante</i> .....	54
Restauration de l'activité physiologique de la eNOS .....	54
Inhibition de l'activité de la NAD(P)H oxydase .....	56
Inhibition de l'activité de la cyclooxygénase et de la xanthine oxydase .....	57
<i>Augmentation de l'activité antioxydante</i> .....	58
Supplément d'antioxydants endogènes (SOD, CAT et GPx) .....	58
Vitamines C et E .....	59
Autres approches thérapeutiques .....	61
<i>Statines</i> .....	62
<i>Probucol</i> .....	64
<b>HYPOTHÈSES ET BUTS</b> .....	<b>68</b>
<b>CONTRIBUTION ORIGINALE</b> .....	<b>70</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>98</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>106</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>108</b>

## LISTE DES FIGURES

### Chapitre Deuxième

**Figure 1 :** Synthèse endothéliale et actions au niveau du muscle lisse vasculaire sous-jacent des facteurs relaxants dépendants de l'endothélium. AC : adénylate cyclase, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, ATP : adénosine triphosphate, BH<sub>4</sub> : tétrahydrobioptérine, BK<sub>ca</sub> : canal potassique de grande conductance dépendant du calcium, Ca<sup>++</sup> : calcium, CaM : calmoduline, CNP : peptide natriurétique de type C, COX : cyclooxygénase, EDHF : facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium, EET : acide époxiécossatriénoïque, eNOS : synthétase endothéliale de l'oxyde nitrique, FAD : flavine adénine dinucléotide, FMN : flavine mononucléotide, GCs : guanylate cyclase soluble, GMPc : guanosine monophosphate cyclique, GTP : guanosine triphosphate, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène, IK<sub>ca</sub> : canal potassique de conductance intermédiaire dépendant du calcium, K<sup>+</sup> : ions potassiques, K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> : canal potassique dépendant de l'ATP, NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, NO• : monoxyde d'azote, PGI<sub>2</sub> : prostacycline, PKG : protéine kinase dépendante du GMPc, PLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub>, R : récepteur de la prostacycline, SK<sub>ca</sub> : canal potassique de petite conductance dépendant du calcium. 7

**Figure 2 :** Dépendance des cavéoles dans le mécanisme d'activation de la eNOS. B<sub>2</sub> : récepteur de la bradykinine, BK : bradykinine, Ca<sup>2+</sup> : calcium, CaM : calmoduline, Cav-1 : cavéoline-1, DAG : diacylglycérol, eNOS : monoxyde d'azote synthétase endothéliale, Hsp90 : heat shock protein 90, IP<sub>3</sub> : 1,4,5-inositol triphosphate, NO• : monoxyde d'azote, PLCγ<sub>1</sub> : phospholipase C γ<sub>1</sub>, RS : réticulum sarcoplasmique. 10

**Figure 3 :** Multiples effets du monoxyde d'azote au niveau de la lumière vasculaire, des cellules musculaires sous-jacentes et des cellules endothéliales. 5-HT<sub>1D</sub> : récepteur sérotoninergique, α<sub>2</sub> : récepteur α<sub>2</sub>-adrénergique, B<sub>2</sub> : récepteur de la bradykinine, ET<sub>B</sub> : récepteur de l'endothéline, LDL : lipoprotéine de faible densité, NO• : monoxyde d'azote, P<sub>2Y</sub> : récepteur purinergique. 11

**Figure 4 :** Signalisation intracellulaire suite à la liaison de l'endothéline-1 à ses deux récepteurs. ADN : acide désoxyribonucléique, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, ARN<sub>m</sub> : acide ribonucléique messenger, Ca<sup>++</sup> : calcium, COX : cyclooxygénase, DAG : diacylglycérol, ECE 1a : enzyme de conversion de l'endothéline 1a, eNOS : synthétase du monoxyde d'azote endothéliale, ET-1 : endothéline-1, ET<sub>A</sub> : récepteur à l'endothéline de type A, ET<sub>B</sub> : récepteur à l'endothéline de type B, GMPc : guanosine monophosphate cyclique, IP<sub>3</sub> : 1,4,5-Inositol triphosphate, NO• : monoxyde d'azote, PGI<sub>2</sub> : prostacycline, PKC : protéine kinase cyclique, R : récepteurs, RS : réticulum sarcoplasmique, VOC : canal voltage dépendant. 18

### Chapitre Troisième

**Figure 5 :** Formation et conversion de l'anion superoxyde. e<sup>-</sup> : électron, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : perpxyde d'hydrogène, NO• : monoxyde d'azote, O<sub>2</sub> : oxygène, •O<sub>2</sub><sup>-</sup> : anion superoxyde, ONOO<sup>-</sup> : peroxydinitrite, SOD : superoxyde dismutase. 23

**Figure 6 :** Formation et conversion du peroxyde d'hydrogène. CAT : catalase, GPx : glutathion peroxydase, GSSG : glutathion oxydé, H<sub>2</sub>O : eau, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : perpxyde d'hydrogène, O<sub>2</sub> : oxygène, •O<sub>2</sub><sup>-</sup> : anion superoxyde, SOD : superoxyde dismutase, XO : xanthine oxydase. 24

**Figure 7 :** NAD(P)H oxydase endothéliale et phagocytaire. 31

**Figure 8 :** Action de la glutathion peroxydase. GPx : glutathion peroxydase, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, H<sub>2</sub>O : eau, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène, NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit. 36

### Chapitre Cinquième

**Figure 9 :** Structure moléculaire du probucol. 65

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

- 5-HT : Sérotonine  
AB : Aortic banding  
AC : Adénylate cyclase  
ACh : Acétylcholine  
ADMA : Diméthylarginine asymétrique  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADP : Adénosine diphosphate  
AEBSF : Aminoéthyl benzènesulfono fluoride  
Akt : Protéine kinase  $\alpha$ -sérine/thréonine  
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique  
Ang : Angiotensine  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
AAS : Acide acétylsalicylique  
AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub> : Récepteur de type 1 et 2 à l'angiotensine II  
ATP : Adénosine triphosphate  
BH<sub>4</sub> : Tétrahydrobioptérine  
BK : Bradykinine  
Ca<sup>++</sup> : Calcium  
CA : Cerclage aortique  
CaM : Calmoduline  
CAT : Catalase  
CaV-1 : Cavéoline-1  
CE : Cellules endothéliales  
CNP : Peptide natriurétique de type C  
CML : Cellules musculaires lisses  
COX : Cyclooxygénase  
DAG : Diacylglycérol  
DPI : Diphénylène iodonium  
ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine

ECE : Enzyme de conversion de l'endothéline  
EDCFs : Facteurs contractants dépendants de l'endothélium  
EDH(F) : Facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium/hyperpolarisation dépendante de l'endothélium  
EDRFs : Facteurs relaxants dépendants de l'endothélium  
EET : Acide époxyéicosatriénoïque  
eNOS : Monoxyde d'azote synthétase endothéliale  
ERO : Espèces réactives oxygénées  
ET-1 : Endothéline-1  
ET<sub>A</sub> : Récepteur de type A de l'endothéline  
ET<sub>B</sub> : Récepteur de type B de l'endothéline  
FAD : Flavine adénine dinucléotide  
FMN : Flavine mononucléotide  
GCs : Guanylate cyclase soluble  
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique  
GPx : Glutathion peroxydase  
GR : Glutathion réductase  
GSH : Glutathion réduit  
GSSG : Glutathion oxydé  
GTP : Guanosine triphosphate  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène  
HDL : Lipoprotéine de haute densité  
HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A  
HTA : Hypertension artérielle  
HTP : Hypertension pulmonaire  
HVG : Hypertrophie ventriculaire gauche  
IC : Insuffisance cardiaque  
iNOS : Monoxyde d'azote synthétase inductible  
IP : Récepteur de la prostacycline  
I/R : Ischémie/reperfusion  
K<sub>ca</sub> : Canal potassique sensible au calcium

L-arg : L-arginine  
LDL : Lipoprotéine de faible densité  
LVH : Left ventricular hypertrophy  
NAC : N-acétyl-L-cystéine  
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide  
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit  
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit  
NEP : Endopeptidase neutre  
nNOS : Monoxyde d'azote synthétase neuronale  
NOS : Monoxyde d'azote synthétase  
NO• : Monoxyde d'azote  
•O<sub>2</sub><sup>-</sup> : Anion superoxyde  
OH• : Radical hydroxyl  
ONOO<sup>-</sup> : Peroxynitrite  
ONOOH : Acide peroxynitrique  
PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes  
PGH<sub>2</sub> : Prostaglandine H<sub>2</sub>  
PGI<sub>2</sub> : Prostacycline  
PKC : Protéine kinase C  
SHR : Rat spontanément hypertendu  
SOD : Superoxyde dismutase  
SRA : Système rénine-angiotensine  
TXA<sub>2</sub> : Thromboxane A<sub>2</sub>  
VCAM-1 : Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire  
XDH : Xanthine déshydrogénase  
XO : Xanthine oxydase

« C'est là, dans l'inconnu,  
que les sensations et les expériences  
sont grandes. Tellement plus que  
dans le monde du connu »

R Messner



## REMERCIEMENTS

Les défis accomplis représentent une réalisation en soi. Que ces défis soient personnels ou qu'ils constituent un même point de convergence pour un certain nombre de personnes, l'atteinte s'appuie rarement sur la participation d'un seul et unique être. Certains n'y voient que la participation active d'autrui, négligeant trop souvent l'essence même du support et de l'implication : ne serait-ce qu'un réconfort verbal ou une oreille attentive, un sourire d'encouragement témoignant une confiance profonde ou une pensée positive en présence de tension constante... La manifestation de ces gestes passifs porte en effet un impact plus lourd de sens envers l'accomplissement d'une lutte acharnée.

Je désire tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Perrault, de m'avoir donné la chance, il y a de cela deux ans, de m'impliquer activement dans le monde de la science. Au cours de cette période, j'ai constaté que la vie est constituée de deux chemins majoritaires : celui monotone et sans embûches, ainsi que celui parsemé de petits anicroches qui te font grandir et épanouir, tout en te rendant davantage responsable et indépendant pour surmonter ces obstacles. Dr Perrault représente ce mentor qui m'a engagé dans cette voie, initialement difficile mais profitable à ce jour. Me voilà maintenant mieux armée pour affronter la vie.

À mes compatriotes du laboratoire, citant Dr Steve, j'ai trois mots clés en tête afin de vous les décrire: In-croy-ables. Merci à toi Marie d'être aussi parfaitement dévouée et compétente et d'avoir été une si fantastique partenaire. Sache que je serais toujours là pour parler 'tendon court' ! Steve, tu es vraiment une personne qu'on gagne tellement à connaître. Tu avais totalement raison d'affirmer qu'on a oublié de profiter de ces merveilleux moments où nous étions tous ensemble. Bientôt, si tu veux, on ira souper au restaurant coin St-Denis et St-Laurent pour se rappeler ce bon vieux temps ! Olivier, malgré le fait que tu sois français, tu représentes beaucoup pour moi et tu es mon rayon de soleil matinal. Pour une seconde fois dans ma vie, tu me feras vivre la tristesse profonde que cause la distance lorsque tu retourneras de l'autre côté de l'océan. À toi Émile, malgré le fait que ton arrivée soit récente dans le laboratoire, tu a compté dans le dernier droit de mon projet, et ce non seulement côté technique. Simon, le petit dernier arrivé avec qui je n'ai pas eu la chance de travailler abondamment, mais qui a quand même trouvé le temps d'envahir mon bureau, j'ai eu bien du plaisir avec toi.

On dit qu'avec le temps et l'âge qui avancent, seules quelques personnes nous apportent toujours autant, sinon plus, et restent fidèles à notre amitié. Isa X 2, Val, Ka, Jess, et Eve, je vous remercie infiniment de m'avoir écoutée, supportée, encouragée, changé les idées et surtout, d'être entrées dans ma vie. Toutes vos attentions afin de me remonter le moral et d'assurer mon bonheur sont bien gravées dans mon cœur.

Envers vous chers Parents, Ninou, Dave et Annick, je serai éternellement reconnaissante pour votre support et votre amour inconditionnel. Vous représentez les personnes les plus chères à mon âme et la vie sans vous n'aurait jamais cette beauté. La force de notre union, même malgré la distance, a constitué ma bouée de sauvetage au cours des tempêtes survenues lors des deux dernières années. La confiance que vous me témoignez m'a toujours donné un second souffle et me le donnera à jamais. Un merci du plus profond de mon cœur.

**Chapitre Premier**  
*Introduction*

L'augmentation de la post-charge cardiaque, principalement causée par une sténose aortique ou une hypertension artérielle systémique, induit une série d'évènements cellulaires et moléculaires menant à une hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) adaptative (Fareh *et al.*, 1996). La principale cause de développement de la sténose aortique chez l'adulte constitue un processus dégénératif menant à la calcification de la valve aortique, entraînant une immobilisation progressive des feuillets valvulaires. Puisque l'obstruction est graduelle, le ventricule gauche s'adapte à la surcharge de pression systolique en augmentant l'épaisseur de ses parois afin de préserver sa fonction systolique (Kováková *et al.*, 2000). L'HVG, affecte 23% des hommes et 33% des femmes après l'âge de 59 ans (Savage *et al.*, 1987) et augmente de trois fois le risque de développer des maladies cardiovasculaires. Elle est en fait associée à des évènements cardiaques incluant la mort subite, l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque, les accidents vasculo-cérébraux et la maladie coronarienne (Brown *et al.*, 2000).

Des altérations au niveau de la relaxation dépendante de l'endothélium induite par l'acétylcholine (ACh), l'adénosine et la substance P ont été rapportées dans l'HVG lors d'études cliniques et expérimentales (Grieve *et al.*, 2001 ; Lüscher *et al.*, 1994 ; Treasure *et al.*, 1993). L'atteinte des relaxations dépendantes de l'endothélium induites par le monoxyde d'azote (NO•) chez les animaux avec une HVG a été attribuée à une diminution de la synthèse et/ou de la biodisponibilité du NO• et à la libération concomitante de facteurs contractants dérivés de l'endothélium (EDCFs), tels l'endothéline (ET) et les prostanoïdes (Wattanapitayakul *et al.*, 2000). Le stress oxydatif, principalement via l'action de l'anion superoxyde ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), joue également un rôle important dans le développement d'une dysfonction endothéliale lors de nombreuses pathologies cardiovasculaires, telle l'HVG (Cai *et al.*, 2000). Le stress oxydatif représente un état dans lequel l'excès d'espèces réactives oxygénées (ERO) surpasse la capacité du système endogène antioxydant.

Une dysfonction endothéliale des artères coronaires épicaudiques a été démontrée dans l'HVG secondaire à un cerclage aortique dans un modèle porcin (Malo *et al.*, 2003). Les altérations des mécanismes de signalisation au niveau des cellules endothéliales (CE)

impliquent préférentiellement les relaxations induites par les protéines Gi, et modérément celles par les protéines Gq. Ces observations, combinées à une baisse du taux basal de guanosine-3'5'-monophosphate cyclique (GMPc) au niveau de la paroi vasculaire et à une réduction du rapport plasmatique nitrites/nitrates, reflètent une diminution de la production et/ou biodisponibilité du NO• dans ce modèle (Malo et al., 2003). De plus, en présence d'une HVG secondaire à un cerclage aortique, il y a une augmentation des concentrations circulantes d'ET-1 et une diminution de la densité du sous-type de récepteur ET<sub>B</sub> au niveau endothélial, expliquant en partie la vasoconstriction accrue dans la dysfonction endothéliale (Desjardins et al., 2005). Finalement, une présence significativement augmentée des concentrations plasmatiques de peroxyde d'azote (ONOO-) confirme un état de stress oxydatif dans l'HVG (Malo et al., 2003<sup>1</sup>).

Malo et al (2003) ont démontré qu'un traitement aigu avec la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>) ou qu'un supplément d'antioxydants avec la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) améliore la réactivité vasculaire en présence d'une dysfonction endothéliale (Malo et al., 2003<sup>1</sup>). Ces observations impliquent que, dans ce modèle, il y a une diminution de l'activité antioxydante endogène et/ou une augmentation des niveaux des ERO, plus spécifiquement de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> et du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Puisque les ERO sont à la source de plusieurs modifications néfastes au niveau de l'organisme, entre autres au niveau des CE et du myocarde, il serait intéressant d'évaluer les effets d'une intervention thérapeutique chronique à l'aide d'une substance antioxydante, le probucol, sur l'initiation, la progression et/ou le renversement de la dysfonction endothéliale ainsi que de l'HVG.

**Chapitre Deuxième**  
***Fonctions de l'endothélium sain***

La découverte au 19<sup>e</sup> siècle par Von Recklinghausen d'une couche cellulaire interne au niveau de la paroi vasculaire ne représentait qu'une description plus détaillée de celle rapportée par Malphigi au 17<sup>e</sup> siècle. Ce dernier stipulait que cette barrière physique entre le sang et les tissus ne possédant aucune fonction substantielle (*Fishman AP*, 1982). Cette vision prit un nouveau tournant vers le début des années 80 alors que Furchgott et Zawadzki (1980) découvraient un puissant potentiel vasoactif à cette couche cellulaire, soit l'endothélium.

L'endothélium est localisé stratégiquement entre la circulation sanguine et les cellules musculaires lisses (CML) de la paroi vasculaire (*Schiffrin EL*, 1994). Cet emplacement lui confère la possibilité de contrôler sélectivement la perméabilité et le transport des solutés et macromolécules, afin d'aider au métabolisme de plusieurs facteurs circulants dans le sang ou générés localement (*Schiffrin EL*, 1994 ; *Flavahan et Vanhoutte*, 1995 ; *Vanhoutte et al.*, 1997). D'une manière passive, l'endothélium participe à la régulation des niveaux de ces facteurs par l'expression d'enzymes métaboliques extracellulaires telles les enzymes de conversion (*Flavahan et Vanhoutte*, 1995). De plus, au niveau de la lumière vasculaire, l'endothélium sain possède une action anti-plaquettaire (synthèse de NO• et de prostacycline [PGI<sub>2</sub>]), anti-coagulante (expression de glycosaminoglycans et de thrombomoduline), fibrinolytique (libération de l'activateur du plasminogène tissulaire) et maintient une surface non thrombogénique par l'inhibition de l'adhésion et de l'extravasation des cellules pro-inflammatoires tels les neutrophiles, monocytes et lymphocytes (*Fishman AP*, 1982 ; *Schiffrin EL*, 1994 ; *Boulanger et Vanhoutte*, 1997 ; *Rubanyi GM*, 1993). Au niveau de la paroi vasculaire, les CE sont impliquées dans le processus d'angiogénèse ; plus précisément, elles possèdent la capacité de migrer, de proliférer et de former les tubules. De plus, les CE possèdent un rôle vasculaire de modulation de la contraction, de la croissance et de la migration des cellules musculaires lisses vasculaires sous-jacentes (par la sécrétion de facteurs, tel le NO•) (*Rubanyi GM*, 1993 ; *Mombouli et Vanhoutte*, 1999). Ces différentes propriétés sont dues à la capacité des CE de percevoir les stimuli humoraux et hémodynamiques (grâce à la présence de récepteurs à la surface membranaire, de

molécules d'adhésion et d'enzymes), de changer de morphologie et de sécréter des facteurs (*Vanhoutte et al.*, 1997).

Les CE peuvent être activées par plusieurs stimuli incluant les forces de cisaillement et une variété de substances vasoactives endogènes qui sont produites de façon systémique ou générées localement par le tissu vasculaire ou les cellules sanguines circulantes. Ces substances proviennent du système nerveux autonome (ACh, adénosine triphosphate [ATP], substance P), des hormones circulantes (catécholamines, vasopressine, angiotensine II [Ang II], insuline), des dérivés de la coagulation et des produits plaquettaires (sérotonine [5-HT], adénosine diphosphate [ADP], thrombine) ainsi que des CE et des CML directement (bradykinine [BK], ADP/ATP, angiotensines, histamine et ET-1) (*Mombouli et Vanhoutte*, 1999).

## **Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium**

En condition normale, il existe une nette prédominance de la libération basale des EDRFs alors que les EDCFs n'apportent qu'une contribution mineure, favorisant ainsi la relaxation vasculaire (*Boulanger et Vanhoutte*, 1997). Trois facteurs générés par l'endothélium participent à cette vasorelaxation : le NO•, la PGI<sub>2</sub> et le facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium/hyperpolarisation dépendante de l'endothélium (EDH(F)) (Figure 1)

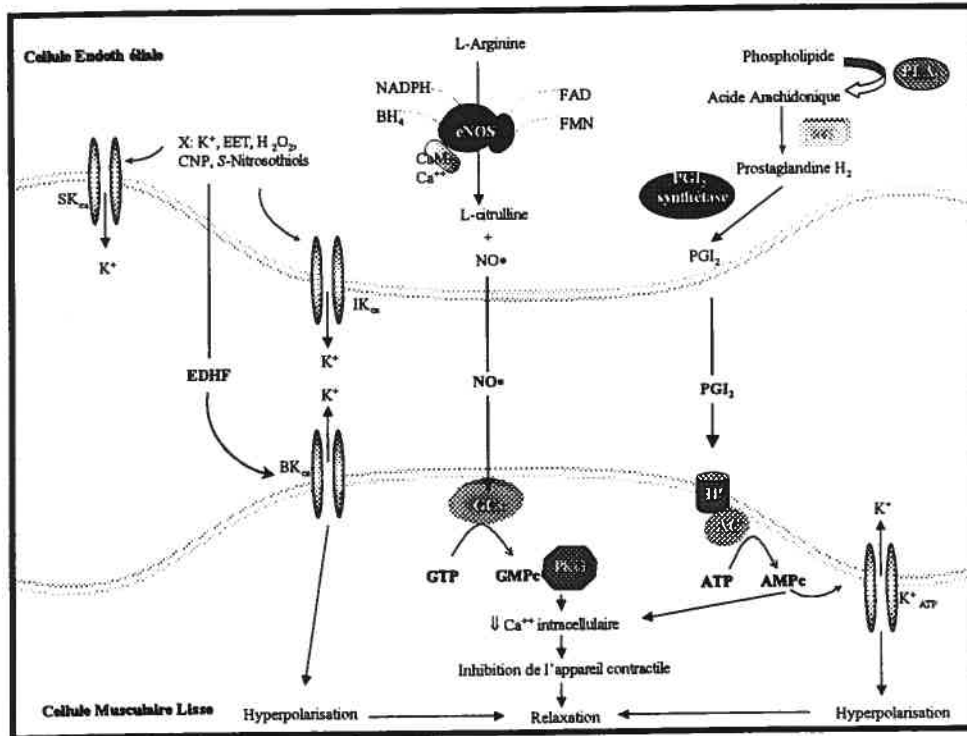


Figure 1 : Synthèse et actions au niveau du muscle lisse vasculaire sous-jacent des facteurs relaxants dépendants de l'endothélium.

## Monoxyde d'azote

Le médiateur primaire des relaxations dépendantes de l'endothélium, découvert en 1980 par Furchgott et Zawadzki suite à une stimulation des CE par l'ACh (*Furchgott et Zawadzki*, 1980), est une substance diffusible possédant une demi-vie de quelques secondes (*Martin et al.*, 1985), identifiée comme étant le NO• (*Palmer et al.*, 1998). Ce radical libre non prostanoloïde contribue de manière prédominante aux relaxations dépendantes de l'endothélium dans les artères de grand calibre, soient coronaires, systémiques, cérébrales, mésentériques et pulmonaires (*Vanhouette et al.*, 1997).

La synthèse du NO implique l'oxydation de la portion terminale guanidine-azote de son précurseur, la L-arginine (*Palmer et al.*, 1998), par une famille d'enzymes appelées monoxyde d'azote synthétase (NOS). Trois isoformes de cette enzyme ont été identifiées, chacun encodé par un gène différent. L'isoforme NOS 2 (ou inductible NOS



[iNOS]), indépendant du calcium, fut la première forme caractérisée (*Bredt et al.*, 1991). iNOS a initialement été découverte au niveau des macrophages, alors qu'il est maintenant prouvé qu'elle peut être exprimée au niveau de presque tous les types cellulaires suite à une stimulation appropriée : cellules inflammatoires infiltrantes, cellules endothéliales des microvaisseaux coronaires et de l'endocarde, CML vasculaires coronariennes et fibroblastes (*Schulz et al.*, 1992 ; *Smith et al.*, 1993 ; *Shindo et al.*, 1994 ; *Balligand et al.*, 1994 ; *Balligand et al.*, 1995). Cet isoforme de l'enzyme est biosynthétisé seulement après une stimulation par des médiateurs inflammatoires, tels les cytokines et les lipopolysaccharides (*Berges et al.*, 2003). Son expression dans les macrophages mène à la suppression de la réplication virale ainsi qu'à sa réactivation (*Karupiah et al.*, 1993), en plus de favoriser l'activité bactéricide (*Pacelli et al.*, 1995). D'autres actions bénéfiques relatives à l'activation de la iNOS, induites par l'action du NO•, incluent la cytoprotection, la diminution de l'adhésion leucocytaire, de l'activité anti-plaquettaire et de la perméabilité vasculaire ainsi que l'activité antioxydante (*Shah et MacCarthy*, 2000).

Étant constitutivement exprimés et régulés par la présence de calcium cytosolique, les isoformes NOS 1 (ou neuronale NOS [nNOS]) et NOS 3 (ou endothéliale NOS [eNOS]) ont initialement été trouvés dans les tissus nerveux et dans l'endothélium respectivement, et ensuite dans différents types cellulaires (*Shah et MacCarthy*, 2000). La nNOS est présente majoritairement dans les nerfs, les cellules ganglionnaires et dans les tissus de conduction (*Andries et al.*, 1998). La eNOS est exprimée dans l'endothélium au niveau du système cardiovasculaire (*Ursell et Mayes*, 1995) et de manière hétérogène quant à sa localisation subcellulaire (*Schulz et al.*, 1991).

L'activation de la eNOS peut survenir selon deux mécanismes bien distincts dépendant du mode d'activation des cellules endothéliales. Suite à une augmentation des forces de cisaillement, provoquée par l'écoulement de sang le long des parois vasculaires, un processus de phosphorylation dépendant de la protéine kinase  $\alpha$ -sérine/thréonine (Akt) est responsable de l'activation de la eNOS et subséquemment de l'augmentation de NO• (*Dimmler et al.*, 1999). D'un autre côté, une variété de substances endogènes peuvent interagir avec leur récepteur respectif situé à la surface des CE. Ces agonistes se lient aux

récepteurs couplés aux protéines Gi (récepteurs 5-HT<sub>1D</sub>, ET<sub>B</sub>,  $\alpha_2$  adrénergique) qui sont sensibles à la toxine de la coqueluche ou aux récepteurs couplés aux protéines Gq (récepteurs des kinines et purinergiques) et ils provoquent une augmentation des concentrations cytosoliques de calcium (*Boulanger et Vanhoutte, 1997*).

La liaison à la calmoduline (CaM) par les NOS endothéliale et neuronale est dépendante de la concentration intracellulaire de calcium (Ca<sup>++</sup>). La production de NO• par la forme endothéliale est négativement régulée par l'interaction de cette dernière avec les protéines membranaires des cavéoles, les cavéolines 1 et 3 (CaV-1 et -3), retrouvées respectivement dans les cellules endothéliales et les cardiomyocytes (*Feron et al., 1996*). Dans les CE, lorsque la concentration de Ca<sup>++</sup> intracellulaire augmente suite à la liaison d'un agoniste à son récepteur, un cycle de régulation est initié : 1) la liaison du complexe Ca<sup>++</sup>/CaM à la eNOS active cette dernière et lui permet de se dissocier du complexe hétérodimérique qu'elle forme avec la CaV-1 ; 2) la eNOS activée est transportée hors des cavéoles où elle forme le NO• ; 3) lorsque la concentration de Ca<sup>++</sup> retourne aux valeurs de base, la eNOS peut s'associer de nouveau avec la CaV-1 ; 4) le complexe inhibiteur retourne finalement vers les cavéoles (*Feron et al., 1998*). À l'opposé des cavéolines, la protéine chaperonne Hsp90 s'associe avec la eNOS et elle stimule les fonctions catalytiques de l'enzyme en stabilisant la liaison à la CaM par le changement des sites de phosphorylation, ce qui augmente la production de NO• (Figure 2) (*Garcia-Cardena et al., 1998*).

Pour l'activation complète de la eNOS, qui permet la catalyse de l'acide aminé L-arginine en L-citrulline et NO•, la présence d'oxygène, de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) ainsi que des cofacteurs flavine adéninedinucléotide (FAD), flavine mononucléotide (FMN) et BH<sub>4</sub> est nécessaire (*Boulanger et Vanhoutte, 1997*) (Figure 1). De plus, la BH<sub>4</sub> n'agit pas seulement à titre de cofacteur pour la eNOS, mais elle est requise pour le maintien de la stabilité structurelle et fonctionnelle de l'enzyme (*Shah et MacCarthy, 2000*).

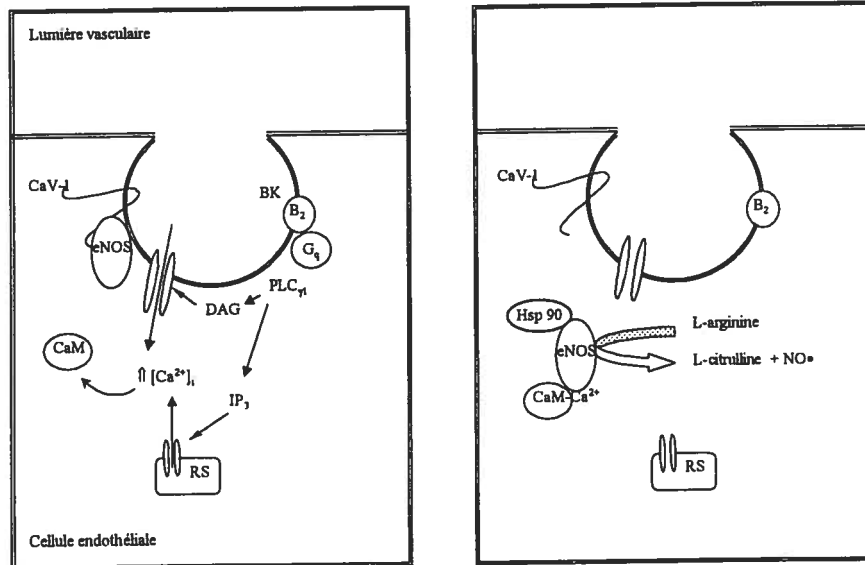


Figure 2 : Dépendance des cavéoles dans le mécanisme d'activation de la eNOS

La relaxation des CML vasculaires par le NO• implique la stimulation de la GCs, et conséquemment, l'augmentation de la formation de GMPc à partir du GTP (guanosine-3'5-triphosphate) (*Rapoport et Murad*, 1983). Le GMPc active une protéine kinase dépendante du GMPc qui induit l'augmentation de la sortie de calcium du cytosol des CML, de la capture de calcium dans les réservoirs intracellulaires et de la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine, menant à l'inhibition de l'appareil contractile (*Küng et Lüscher*, 1995 ; *Küng et al.*, 1995). De plus, la protéine kinase dépendante du GMPc phosphoryle les canaux potassiques pour induire une hyperpolarisation et ainsi inhiber la vasoconstriction (*Lincoln et al.*, 1994).

Le NO• est libéré majoritairement vers le muscle lisse vasculaire sous-jacent pour induire la relaxation mais également l'inhibition de la prolifération et la migration des CML (*Scott-Burden et Vanhoutte*, 1993 ; *Scott-Burden et Vanhoutte*, 1994). Une faible partie de cet EDRF migre vers la circulation sanguine, où il interagit avec certains composants circulants. Ainsi, le NO• est responsable de l'inhibition de l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (*Vanhoutte et al.*, 1997) et, au niveau des plaquettes,

l'augmentation de GMPc est associée à une diminution de l'adhésion et de l'agrégation (Ruschitzka *et al.*, 1997). Finalement, l'inhibition de la synthèse d'endothéline et de l'expression des molécules d'adhésion à la surface endothéliale est aussi régie par le NO• (Figure 3) (Vanhoutte *et al.*, 1997).

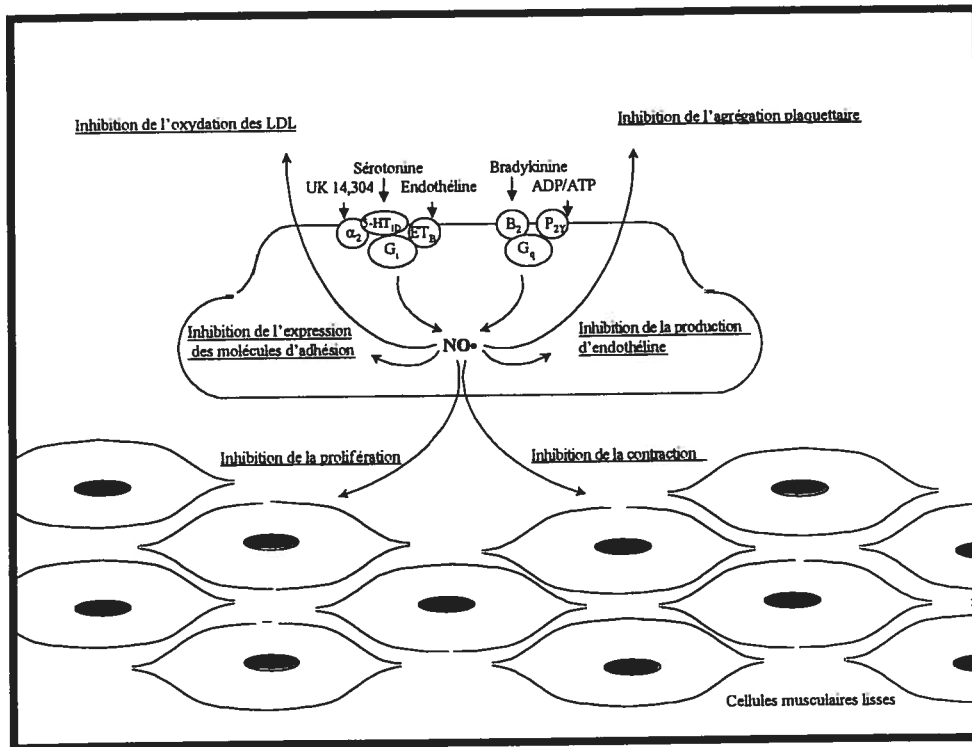


Figure 3 : Multiples effets du monoxyde d'azote au niveau de la lumière vasculaire, des cellules musculaires sous-jacentes et des cellules endothéliales.

La dysfonction endothéliale des artères coronaires épicaudiques en présence d'une HVG, se manifeste par une altération de la relaxation induite par une augmentation de la vasoconstriction et/ou une diminution de la biodisponibilité du NO• malgré la préservation de l'expression de la eNOS (Malo *et al.*, 2003). Deux mécanismes impliquant une augmentation des ERO peuvent expliquer la diminution de l'action du NO• : 1) le découplage de la eNOS par diminution de la disponibilité de la BH<sub>4</sub> et/ou de la L-arginine, induisant ainsi une génération des ERO plutôt que du NO•, et 2) l'augmentation de l'expression de la NADPH oxydase endothéliale non phagocytaire, enzyme impliquée dans la formation des ERO, tel •O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Harrison DG, 1997). MacCarthy

et al (2001) ont démontré que la génération de  $\bullet\text{O}_2^-$  par la NADPH oxydase contribue à la dysfonction endothéliale cardiaque observée dans le myocarde hypertrophié de cobayes avec un cerclage aortique abdominal suprarénal (MacCarthy et al., 2001). De plus, Malo et al (2003) ont prouvé qu'un traitement antioxydant combiné à un supplément de  $\text{BH}_4$  renverse la dysfonction endothéliale des artères coronaires épicaudiques dans un modèle porcin d'HVG, suggérant également la participation des ERO au niveau vasculaire (Malo et al., 2003<sup>1</sup>). Ainsi, l'augmentation de la formation de  $\bullet\text{O}_2^-$  augmente la concentration du puissant oxydant  $\text{ONOO}^-$ , formé par l'interaction extrêmement rapide et irréversible entre le  $\text{NO}\bullet$  et  $\bullet\text{O}_2^-$ , inhibant ainsi le rôle physiologique du  $\text{NO}\bullet$ . De plus, l'augmentation des ERO peut causer un découplage fonctionnel du complexe protéine G-récepteur menant à une perturbation de la transduction normale de la signalisation dans les CE (Flavahan et Vanhoutte, 1995) et contribuant ainsi à la dysfonction endothéliale.

### Prostacycline

La synthèse de la  $\text{PGI}_2$  dépend d'une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Parsaee et al., 1992 ; White et Martin, 1989), survenant subséquemment à une stimulation endothéliale par les forces de cisaillement, par l'hypoxie et par plusieurs médiateurs communs au  $\text{NO}\bullet$  (Vanhoutte et al., 1997). Le prostanoïde vasodilatateur est formé suite à l'activation chronologique de la phospholipase  $\text{A}_2$ , de la cyclooxygénase (COX ; également nommée prostaglandine  $\text{H}_2$  [ $\text{PGH}_2$ ] synthétase) et de la prostacycline synthétase (Figure 1). La  $\text{PGI}_2$  est générée de manière prédominante au niveau des CE (de 10 à 20 fois davantage) (Eldor et al., 1981) et de façon moindre dans la média et l'adventice (Moncada et Vane, 1979). L'augmentation de la synthèse endothéliale est due à la capacité de l'endothélium de générer une quantité 20 fois supérieure de  $\text{PGH}_2$  (le précurseur de la  $\text{PGI}_2$ ), alors que les concentrations de  $\text{PGI}_2$  synthétase sont identiques dans les CE et CML (De Witt et al., 1983). Cette augmentation est liée à une concentration plus élevée de  $\text{PGH}_2$  synthétase au niveau des CE (Eldor et al., 1981).

L'action de la prostacycline au niveau des CML sous-jacentes dépend d'un récepteur spécifique (IP), contrairement au NO• qui lui diffuse à travers la bicouche lipidique sans la participation d'une protéine membranaire. Ainsi, le potentiel vasoactif de ce dérivé de l'acide arachidonique est limité au niveau des lits vasculaires qui expriment ce récepteur (*Halushka et al.*, 1989 ; *Coleman et al.*, 1994). Ce dernier est couplé à l'adénylate cyclase (AC), une enzyme responsable de la conversion de l'ATP en adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (*Kukovetz et al.*, 1979). Ce second messenger agit en ouvrant les canaux potassiques sensibles à l'ATP (*Ribalet et al.*, 1989), entraînant ainsi une hyperpolarisation de la membrane et une relaxation subséquente du muscle lisse vasculaire. De plus, l'AMPC est responsable de la sortie de Ca<sup>++</sup> du cytosol dans les CML, inhibant ainsi la machine contractile (*Bukoski et al.*, 1989 ; *Abe et Karakci*, 1992). L'induction d'une vasorelaxation ne représente cependant pas l'action biologique de prime importance de la PGI<sub>2</sub>. De fait, dans la plupart des vaisseaux sanguins, la contribution de la prostacycline aux relaxations dépendantes de l'endothélium est négligeable et son effet est essentiellement synergique à celui du NO•.

La PGI<sub>2</sub> possède deux actions prédominantes : l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (en synergie avec le NO•) (*Radomski et al.*, 1987) et la stimulation de la libération de NO• des CE (*Shimokawa et al.*, 1988). D'une manière complémentaire, le NO• potentialise l'action de la PGI<sub>2</sub> dans les CML (*Delpy et al.*, 1996). De fait, l'augmentation de GMPc au niveau des cellules cibles inhibe la phosphodiesterase III qui dégrade l'AMPC (*Weigert et al.*, 1994). Ainsi, le NO• prolonge indirectement la demi-vie du second messenger de la PGI<sub>2</sub>.

### **Facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium/hyperpolarisation dépendante de l'endothélium (EDH(F))**

Dans de nombreuses artères de calibre moyen et de résistance, des études électrophysiologiques ont établi que l'hyperpolarisation dépendante de l'endothélium des CML est résistante à la combinaison de l'inhibition de la eNOS et de la COX (*Feletou et Vanhoutte*, 1996). Cette induction de la relaxation peut alors être attribuée à deux

mécanismes généraux bien distincts : un mécanisme de contact et un de diffusion (Sandow SL, 2004). En fait, les bases moléculaires de cette relaxation restent obscures car leur nature et leurs mécanismes semblent varier selon les lits vasculaires étudiés, ainsi qu'entre les espèces, races, sexes et durant le développement, le vieillissement et la maladie (McGuire et al., 2001 ; Campbell et Gauthier, 2002 ; Ding et Triggle, 2003).

Indépendamment du mécanisme impliqué dans l'activité du EDH(F), physique ou électrique, il est établi que son action est dépendante de la libération de  $Ca^{++}$  intracellulaire. Ainsi, l'activation de récepteurs et/ou l'application d'un stimulus physique, telles les forces de cisaillement, résulte en une augmentation de  $Ca^{++}$  à l'intérieur des CE (McGuire et al., 2001 ; Griffith TM, 2004 ; Ellis et Triggle, 2004). Subséquemment, il en résulte une activation des canaux potassiques sensibles au  $Ca^{++}$  ( $K_{Ca}$ ), de conductance faible et intermédiaire, localisés au niveau des CE (McGuire et al., 2001). Cette activation des canaux conduit à l'hyperpolarisation de l'endothélium, ensuite transmise aux CML sous-jacentes par des jonctions hétérocellulaires (McGuire et al., 2001). D'un autre côté, cette augmentation intracellulaire calcique peut mener à la libération d'un EDHF, transmis vers les CML par un mécanisme de diffusion (Campbell et Gauthier, 2002).

Les facteurs diffusibles proposés à ce jour incluent les ions potassiques (hypothèse du nuage de potassium) (Busse et al., 2002), l'acide époxyéicosatriénoïque (11,12-EET ; un métabolite du cytochrome P450 2C8/9) (Fissthaler et al., 1999), le  $H_2O_2$  (McGuire et al., 2001 ; Campbell et Gauthier, 2002), le peptide natriurétique de type C (CNP) (Chauhan et al., 2003), ainsi que les S-nitrosothiols (Batenburg et al., 2004) (Figure 1). Plusieurs études appuient ou contredisent tour à tour chacun de ces facteurs mentionnés pour candidat au titre de EDHF. Par contre, chacun pourrait participer à la modulation des jonctions hétérocellulaires, favorisant ainsi la transmission d'une hyperpolarisation dépendante de l'endothélium vers les CML sous-jacentes (Sandow SL, 2004). Bien que l'hypothèse de l'implication des jonctions hétérocellulaires entre les CE et les CML semble être favorisée, elle demeure toutefois une spéculation.

La contribution de l'hyperpolarisation aux relaxations dépendantes de l'endothélium varie selon le diamètre des artères (*Nagao et al.*, 1992) et elle semble être plus marquée au niveau des artères de résistance. Dans les vaisseaux de conductance, les médiateurs NO• et EDH(F) peuvent contribuer aux relaxations dépendantes de l'endothélium ; par contre le rôle du NO• prédomine lors de conditions normales. Lorsque la synthèse de NO• est inhibée dans ces artères, l'EDH(F) a la capacité d'induire des relaxations pratiquement normales (*Komozi et Vanhoutte*, 1990).

## **Facteurs contractants dérivés de l'endothélium**

Lors de certaines conditions, l'endothélium peut initier une vasoconstriction du muscle vasculaire lisse sous-jacent ; celle-ci s'explique par le retrait des EDRFs ou par la diffusion d'EDCFs. Ainsi, selon le stimulus, l'endothélium peut être la source de substances diffusibles qui induisent une vasoconstriction. Celles-ci incluent les composantes du système rénine-angiotensine (SRA), l'endothéline-1, les prostanoides vasoconstricteurs comme la thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) et la prostaglandine H<sub>2</sub> ainsi que les radicaux libres.

### **Angiotensine II (Ang II)**

L'Ang II, composante active du SRA, est produite par le système classique ou rénal ou localement par la voie tissulaire. Dans la voie classique, la rénine circulante dérivée des reins clive l'angiotensinogène hépatique à son extrémité N-terminale afin de former l'angiotensine I. Cette dernière est convertie, au niveau des poumons, en Ang II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) (*Skeggs et al.*, 1967 ; *Dorer et al.*, 1972). L'Ang I peut également être transformée en l'heptapeptide Ang-(1-7) par un mécanisme indépendant de l'ECA, soit par l'action de trois endopeptidases tissulaires neutres (NEP) : NEP 24.11, NEP 24.15 et NEP 24.26 (*Ferrario et al.*, 1997). La découverte de tous les composés du SRA au niveau vasculaire, à l'exception de la rénine qui provient probablement de la circulation, a réorienté la vision du système classique vers un système tissulaire propre. L'ECA se trouve en grande concentration au niveau de l'adventice, aussi bien que dans les CML et CE en culture (*Dzau J*, 1989 ; *Ekker et al.*,



1989 ; *Naftilan AJ*, 1994). Cette enzyme contribue également à la vasorégulation au niveau endothélial par la dégradation de la bradykinine en un fragment inactif (*Dzau VJ*, 1989<sup>1</sup> ; *Caldwell et al.*, 1976)). Les NEP sont également retrouvées au niveau endothélial et du muscle lisse vasculaire (*Roques et al.*, 1993).

Quatre sous-types de récepteurs ont été identifiés pour l'Ang II, les deux principaux étant les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>. Le troisième, AT<sub>3</sub> ou non-AT<sub>1</sub> et non-AT<sub>2</sub>, a été identifié dans les cellules neuronales en culture mais son existence demeure controversée (*Wright et Harding*, 1994). Finalement, le sous-type AT<sub>4</sub> a été identifié dans le cerveau et les reins, et est absent des tissus cardiovasculaires, à l'exception des cellules endothéliales bovines (*Wagenaar et al.*, 2002 ; *Hall et al.*, 1995).

Les récepteurs de l'Ang II sont présents au niveau endothélial dans plusieurs lits vasculaires. L'activation du récepteur endothélial de type 1 (AT<sub>1</sub>), couplé à la phospholipase C, induit une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca<sup>++</sup> menant à la synthèse et à la sécrétion de NO• et de PGI<sub>2</sub>. Ainsi, ces deux facteurs vasodilatateurs antagonisent l'action vasoconstrictrice directe du peptide (*Pueyo et al.*, 1998). L'activation des récepteurs de type 2 (AT<sub>2</sub>) et de l'Ang (1-7) mène aux relaxations dépendantes de l'endothélium dues à la BK (*Seyedi et al.*, 1995 ; *Li et al.*, 1997 ; *Gohlke et al.*, 1998). Les récepteurs AT<sub>2</sub> sont sollicités par une augmentation prononcée d'Ang II, suite à une inhibition pharmacologique du sous-type AT<sub>1</sub> (*Gohlke et al.*, 1998).

L'Ang II est un peptide qui exerce de nombreuses actions sur le muscle lisse vasculaire, majoritairement par la stimulation des récepteurs AT<sub>1</sub> qui jouent sur la modulation du tonus vasomoteur (vasoconstriction), la régulation de la croissance cellulaire, la migration cellulaire, la déposition de matrice extracellulaire et la stimulation de l'inflammation (*Allen et al.*, 2000). L'Ang II induit l'expression de facteurs de croissance tels le facteur de croissance dérivé des plaquettes et le facteur de croissance basique des fibroblastes et elle stimule la production du facteur de transformation de la croissance β1 qui module la prolifération des CML (*Gibbons GH*, 1997). Le sous-type

AT<sub>2</sub>, exprimé au niveau des CML, inhibe l'effet de promotion de la prolifération et de l'hypertrophie induit par le sous-type 1 et il favorise l'apoptose (*Siragy HM, 2000*).

L'Ang II joue donc un rôle fondamental dans le contrôle de l'intégrité fonctionnelle et structurelle de la paroi artérielle et elle peut être importante dans les processus physiologiques de régulation de la pression sanguine et dans les mécanismes pathologiques impliqués dans le développement de maladies vasculaires (*Touyz et Schiffrin, 2000*). De fait, l'Ang II contribue à la pathogénèse de différentes formes d'hypertension, elle est un facteur important de l'athérogénèse et elle contribue aux pathologies cardiovasculaires en induisant le stress oxydatif et la dysfonction endothéliale (*Farmer et Torre-Amione, 2001*). En fait, l'activité de la NAD(P)H oxydase endothéliale (*Rey et al., 2002*) et musculaire (*Touyz et al., 2002*), sources importantes de  $\bullet\text{O}_2^-$ , est augmentée par l'Ang II via l'activation du récepteur AT<sub>1</sub> (*Griendling et al., 1994*) et ce, à des concentrations qui augmentent ou non la pression sanguine (*Rajagopalan et al., 1996*). Ceci a été démontré *in vitro* (*Griendling et al., 1994*) ainsi qu'*in vivo* suite à un cerclage aortique chez le rat Sprague-Dawley (*Bouloumié et al., 1997*). L'anion superoxyde interagit rapidement avec le NO $\bullet$ , réduisant ainsi sa biodisponibilité et les relaxations dépendantes de l'endothélium qui en découlent, menant à la dysfonction endothéliale.

### **Endothéline-1**

L'endothéline-1, peptide constitué de 21 acides aminés, provient d'une famille qui compte trois membres: ET-1, ET-2 et ET-3. Chaque isoforme est le produit de gènes différents qui codent l'ARNm du précurseur protéinique. L'expression de l'ARNm (acide ribonucléique messenger) du peptide ET-1 est stimulée par l'hypoxie, la thrombine, l'interleukine-1, les facteurs de croissance, l'Ang II, les produits plaquettaires et les neurohormones telles la vasopressine et les catécolamines. Tous ces facteurs provoquent une augmentation de la concentration intracellulaire endothéliale de Ca<sup>++</sup>, favorisant le processus de synthèse du peptide (*Lüscher et al., 1996*). La transcription de l'ARNm génère la pré-pro-ET, qui est par la suite convertie en big-ET par des endopeptidases; la

conversion de la big-ET en un peptide mature par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) est nécessaire pour le développement d'une activité vasculaire complète de l'ET-1 (Levin ER, 1995).

L'ET-1 est la seule forme produite au niveau endothélial, via la participation de l'ECE 1a (Levin ER, 1995). Deux récepteurs distincts de l'ET-1, couplés aux protéines G, ont été identifiés: ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. Puisque ce dernier sous-type est exprimé à la surface endothéliale et qu'il est impliqué dans la formation de NO• et de PGI<sub>2</sub>, l'ET-1 peut induire une vasodilatation à de faibles concentrations. En revanche, cette induction de la relaxation est contrebalancée à de hautes concentrations tissulaires, par la stimulation des deux sous-types de récepteurs sur les CML et par l'accumulation musculaire subséquente de Ca<sup>++</sup> intracellulaire (Figure 4) (Lüscher et Barton, 1997). L'ET-1 est le plus puissant vasoconstricteur connu à ce jour et sa production relativement lente suggère une implication dans la régulation du tonus à long terme plutôt que lors d'une réponse aiguë. En plus de cet effet vasoactif, la liaison de l'ET-1 aux récepteurs des CML est responsable de la prolifération de ces cellules par l'action de la protéine kinase C (Hirata et al., 1989).

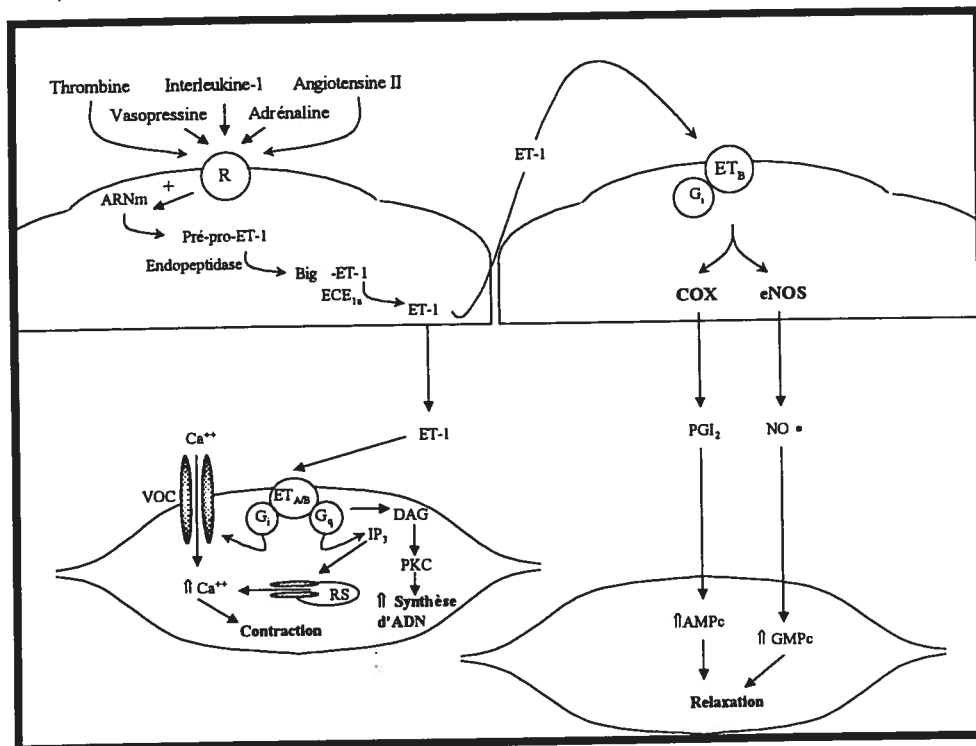


Figure 4 : Signalisation intracellulaire suite à la liaison de l'endothéline-1 à ses deux récepteurs

Au niveau endothélial, la production de l'ET-1 est inhibée par la production basale et stimulée de NO• (*Lüscher et al.*, 1996 ; *Levin ER*, 1995 ; *Lüscher et Barton*, 1997 ; *Hirata et al.*, 1989 ; *Mazaki T*, 1995) . Ainsi, la participation de l'ET-1 dans le maintien de l'homéostasie vasculaire en condition normale est mineure, suggérant plutôt un rôle lors de pathologies (*Vanhoutte PM*, 1994). De fait, l'ET-1 est présente en faible concentration chez les sujets sains alors que sa concentration est augmentée dans l'hypertension pulmonaire, l'insuffisance cardiaque et les maladies des artères coronaires. Ainsi, lorsque l'endothélium perd sa capacité de générer des EDRFs tel le NO•, ce peptide peut être produit en quantités suffisantes pour contribuer à la progression des maladies cardiovasculaires (*Vanhoutte PM*, 2000). Ceci a été démontré dans un modèle d'HVG secondaire à un cerclage aortique chez le porc, alors que la dysfonction endothéliale s'accompagne d'une diminution de la quantité de NO• (*Malo et al.*, 2003), d'une augmentation de la concentration d'ET-1 circulante et d'une augmentation de la contraction engendrée par l'ET-1 au niveau des artères coronaires épocardiques (*Desjardins et al.*, 2005).

### **Prostanoïdes vasoconstricteurs**

L'endothélium est la source de deux prostanoïdes vasoconstricteurs, la TXA<sub>2</sub> et la PGH<sub>2</sub>. Cette dernière, précurseur de tous les prostanoïdes, dérive de l'acide arachidonique suite à l'action de la COX-1 (expression constitutive) et de la COX-2 (expression induite). Par la suite, la thromboxane synthétase métabolise la prostaglandine en TXA<sub>2</sub> ; cette voie est active principalement au niveau des plaquettes et de façon moindre au niveau des CE (*Moncada et Vane*, 1979). Les deux molécules exercent leur action vasoconstrictrice sur les CML par leur liaison aux récepteurs thromboxane/endoperoxyde, entraînant une diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc. Ainsi, les prostanoïdes antagonisent l'action vasodilatatrice de la PGI<sub>2</sub> (*Halushka et al.*, 1989). En plus de cette voie de modulation du tonus vasculaire, la COX représente la source d'un second mécanisme de contraction. Les •O<sub>2</sub><sup>-</sup> sont produits en partie par un mécanisme dépendant de la COX et ils agissent au niveau des CML en induisant une contraction directe ou indirecte en inactivant le NO• (*Katusic et Vanhoutte*, 1989) (voir page 22).

En condition normale, la prostacycline constitue le métabolite principal de l'acide arachidonique qui est généré par la voie dépendante de la COX (*Moncada et Vane, 1979*). Ainsi, l'influence des petites quantités de prostanoïdes vasoconstricteurs libérés par l'endothélium est masquée par la production de NO•, de PGI<sub>2</sub> et d'EDH(F) (*Mombouli et Vanhoutte, 1999*). Par contre, au niveau de l'aorte des rats spontanément hypertendus, les relaxations dépendantes de l'endothélium induites par l'ACh sont diminuées par la libération concomitante des facteurs contractants dépendants de la COX (*Lüscher et Vanhoutte, 1986*). Cette altération de la vasodilatation à l'ACh est aussi observée au niveau de l'avant-bras des patients qui souffrent d'une hypertension essentielle, chez qui l'administration d'un inhibiteur de la COX restaure une réponse normale (*Taddei et al., 1993*).

**Chapitre Troisième**  
***Espèces réactives oxygénées (ERO)***

Au cours du métabolisme aérobie normal, l'oxygène est soumis à une série de processus d'oxydo-réduction menant à la production de l'eau (*Kodja et Harrison, 1999*). Au cours de cette conversion, il y a constitution d'intermédiaires appelés espèces réactives oxygénées ; leur formation implique un mécanisme fondamental de retrait (oxydation) ou d'ajout d'un électron (réduction) suite à la participation d'un des multiples systèmes enzymatiques prooxydants. Ces molécules réactives d'oxygène existent en faibles concentrations en condition physiologique puisqu'elles sont hautement contrôlées par des systèmes antioxydants, enzymatiques ou non-enzymatiques (*Berges et al., 2003*). Le stress oxydatif, observé dans de nombreuses pathologies, survient lorsque les concentrations excessives des ERO générées surpassent la capacité de neutralisation des antioxydants. Les ERO, participants de l'homéostasie vasculaire, sont des entités chimiques divisées en deux groupes : les radicaux libres qui possèdent un électron libre au niveau de leur orbite externe ( $\bullet\text{O}_2^-$ , radical hydroxyl  $[\text{OH}\bullet]$  et  $\text{NO}\bullet$  [voir le chapitre deuxième]) et les dérivés non-radicalaires ( $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{ONOO}^-$ ) (*Berges et al., 2003 ; Kodja et Harrison, 1999*).

## Molécules

### Anion superoxyde

L'anion superoxyde est formé au niveau de toutes les couches de la paroi vasculaire (*Griendling et al., 1994 ; Touyz et Schiffrin, 1999 ; Pagano et al., 1997 ; Rueckschloss et al., 2002*) et il constitue le précurseur commun des autres ERO. La principale source vasculaire de ce radical est une oxydase liée à la membrane qui utilise le NADH (nicotinamide adénine dinucléotide réduit) ou le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit) comme substrat pour le don d'un électron à l'oxygène moléculaire (*Mohazzab et al., 1994*) (voir page 30). L'anion possède une solubilité lipidique très limitée due à sa charge négative, rendant son passage possible vers les autres cellules seulement par la participation de canaux anioniques ; il agit ainsi de manière presque exclusive au niveau des cibles proximales situées dans le compartiment où il est généré (*Cai et al., 2003*). Le  $\bullet\text{O}_2^-$  est une molécule très instable

qui est convertie en l'espace de quelques nanosecondes en  $H_2O_2$  par l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase (SOD ; voir page 34) ou en  $ONOO^-$  suite à une interaction avec le  $NO\bullet$  (Figure 5). En condition physiologique, la réaction prédominante est l'inactivation par la SOD; lorsque le  $NO\bullet$  et le  $\bullet O_2^-$  sont en excès, dans certaines conditions pathologiques, une quantité significative de  $\bullet O_2^-$  peut être utilisée pour générer le puissant oxydant  $ONOO^-$  (Hayashi et al., 2001).

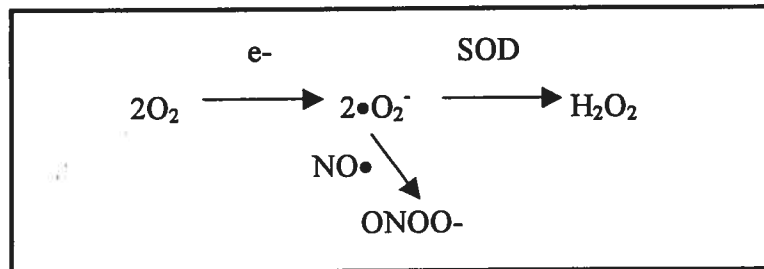


Figure 5: Formation et conversion de l'anion superoxyde

### Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène provient majoritairement de la réaction de catalyse de  $\bullet O_2^-$  par la SOD ; cette voie est favorisée en condition physiologique lorsque la concentration de  $\bullet O_2^-$  est faible et celle de la SOD est normale, c'est-à-dire élevée. Par ailleurs, le  $H_2O_2$  peut également être généré spontanément par la xanthine oxydase (XO) et la glucose oxydase, via un processus de don direct de deux électrons à l'oxygène sans formation intermédiaire de  $\bullet O_2^-$  (Cai et al., 2003) (Figure 6). Le  $H_2O_2$  est une espèce réactive oxygénée non chargée qui, contrairement à l'anion superoxyde et au peroxydinitrite, est suffisamment stable pour diffuser d'une cellule à l'autre et initier des événements spécifiques de signalisation (Cai et al., 2003). À titre d'exemple, il a récemment été suggéré que le  $H_2O_2$  pouvait agir en tant que EDHF, libéré par les CE pour porter son action sur les CML vasculaires au niveau des canaux de large conductance dépendants du calcium (McGuire et al., 2001 ; Campbell et Gauthier, 2002). De plus, grâce à son action paracrine, le  $H_2O_2$  peut réguler l'activité de plusieurs enzymes essentielles pour la libération de calcium, la croissance des CML vasculaires (à de faibles concentrations,  $\approx 40$  nM) et l'apoptose (à de fortes concentrations) (Griendling et al., 2000).



Dans les systèmes biologiques, le  $H_2O_2$  peut être neutralisé par deux systèmes enzymatiques distincts, la CAT et la glutathion peroxydase (GPx). La GPx utilise le glutathion réduit pour convertir  $H_2O_2$  en eau, alors que la CAT agit sans la présence de cofacteur pour former également de l'eau (*Hamilton et al.*, 2004). D'un autre côté, le  $H_2O_2$  peut également être métabolisé par les myéloperoxydases pour former l'acide hypochlorique ou il peut interagir avec des métaux de transition réduits afin d'être converti en  $\bullet OH$ , un radical libre hautement réactif (*Taniyama et Griending*, 2003).

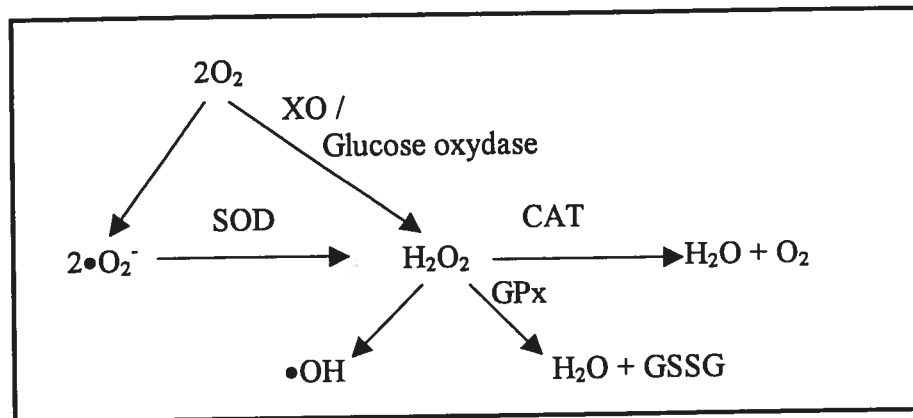
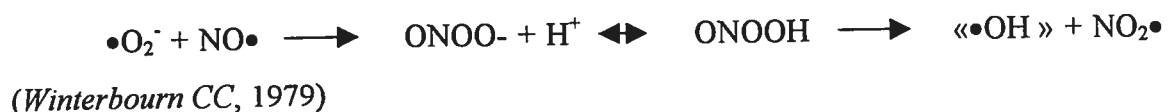


Figure 6: Formation et conversion du peroxyde d'hydrogène

### Peroxynitrite

La formation biologique du  $ONOO^-$  est principalement due à la réaction excessivement rapide ( $6,7 \times 10^9 \cdot M/sec$ ) de deux radicaux, le  $NO\bullet$  et le  $\bullet O_2^-$  (*Goldstein et Czapski*, 1995). Cette réaction survient selon un ratio 1 : 1 et elle génère une espèce réactive azotée non radicalaire puisque l'interaction des deux électrons libres induit la formation d'un pont et donc, leur neutralisation (*Pryor et Squadrito*, 1995). À pH physiologique,  $ONOO^-$  peut gagner un proton pour former l'acide peroxynitrique ( $ONOOH$ ). Cette molécule instable possède une demi-vie inférieure à 1 seconde (*Beckman et al.*, 1990) et elle est décomposée en un puissant oxydant, similaire à l' $\bullet OH$  d'un point de vue réactivité ainsi qu'en dioxyde d'azote qui possède également un puissant potentiel cytotoxique (*Beckman et al.*, 1990 ; *Yang et al.*, 1992).



Ainsi, le ONOO<sup>-</sup> exerce ses effets par différents types de réaction qui peuvent être classifiés en trois principaux groupes : 1) suite au clivage homolytique de ONOOH, par la génération de puissants oxydants, 2) en réagissant avec le dioxyde de carbone, pour former davantage de radicaux libres nocifs (*Squadrito et Pryor, 1998*) et, 3) en agissant directement au niveau de ses cibles. De fait, le ONOO<sup>-</sup> est reconnu principalement pour son puissant pouvoir oxydant, caractéristique associée à des effets délétères lorsqu'il est en concentration élevée. Par contre, l'oxydation par le ONOO<sup>-</sup> peut également être bénéfique lorsqu'il est généré par les neutrophiles, les macrophages et les cellules infectées lors de la défense de l'hôte contre une invasion bactérienne (*McGafferty DM, 2000*). Cependant, la plupart des effets causés par cette ERO sont néfastes pour la cellule et ses constituants. Entre autres, le peroxy-nitrite est toxique lors de processus inflammatoires en oxydant divers composants biologiques, incluant les lipides, les acides aminés et les nucléotides (*Hamilton et al., 2004 ; Beckman et Koppenol, 1996*). De plus, il peut causer le bris des brins d'ADN (acide désoxyribonucléique), est génotoxique ainsi que mutagénique (*Salgo et Pryor, 1996*). Le peroxy-nitrite peut également oxyder rapidement plusieurs composés qui possèdent des propriétés antioxydantes, incluant le glutathion, la cystéine et la méthionine (*Squadrito et Pryor, 1998*<sup>1</sup>). Finalement, au niveau de la membrane cellulaire, la peroxydation des lipides peut augmenter la fluidité de la membrane, facilitant le passage des phospholipides entre les couches lipidiques externe et interne, augmentant ainsi la fragilité de la membrane en plus d'inactiver les enzymes liées à celle-ci (*Vergnani et al., 2000*).

Le ONOO<sup>-</sup> possède également une action importante au niveau de la régulation du tonus vasculaire, étant responsable de l'oxydation de la BH<sub>4</sub> qui est un cofacteur nécessaire pour l'activité de la eNOS (*Milstien et Katusic, 1999*). Un cercle vicieux se trouve créé puisque, suite à la diminution de la biodisponibilité du cofacteur, la eNOS est fonctionnellement découplée : l'enzyme génère davantage de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> et ultérieurement de ONOO<sup>-</sup>, aux dépens du NO•. Ainsi, la production de ONOO<sup>-</sup> est associée à une diminution majeure de la production de NO• par une oxydation de la BH<sub>4</sub> et de sa biodisponibilité par une interaction avec le •O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Il en résulte donc une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium ainsi qu'une augmentation de l'agrégation

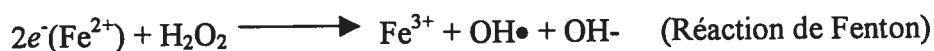
plaquettaire et de la prolifération des CML vasculaires (*White et al.*, 1994). Le ONOO- inactive également la prostacycline synthétase, diminuant la vasorelaxation par ce troisième mécanisme (*Zou et al.*, 1997 ; *Zou et al.*, 2002). De plus, puisque la PGH<sub>2</sub> non métabolisée en PGI<sub>2</sub> peut agir au niveau des récepteurs TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> des CML, il se produit une augmentation de la vasoconstriction (*Hink et al.*, 2003).

La réaction entre le •O<sub>2</sub><sup>-</sup> et le NO• en condition physiologique n'induit pas la formation d'une quantité suffisante de ONOO- pour exercer un effet significatif au niveau vasculaire : 1) la concentration circulante de NO• en condition basale est relativement basse, 2) une concentration équimolaire de superoxyde est requise pour la génération du ONOO- et 3) la courte demi-vie du ONOO- à pH physiologique prévient l'accumulation tissulaire, limite la distance de diffusion et réduit l'interaction avec les molécules biologiques (*Nossuli et al.*, 1997). Par contre, en condition de stress oxydatif, tel que dans l'hypertension, l'hypercholestérolémie et les moments précoces de reperfusion suite à une ischémie, le •O<sub>2</sub><sup>-</sup> et le NO• sont générés en quantité supérieure aux niveaux de base, favorisant ainsi la production significative de ONOO- et l'induction des effets oxydatifs mentionnés précédemment (*Ronson et al.*, 1999).

### Radical hydroxyl

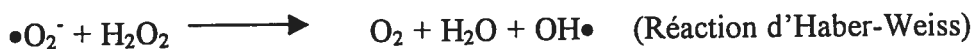
Le OH•, molécule extrêmement réactive et hautement instable, peut être formé à partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon deux réactions bien distinctes :

1) En présence de métaux de transition divalents, spécialement le fer et le cuivre



(*Fenton H*, 1894)

2) En entrant en contact avec l'anion superoxyde



(*Haber et Weiss*, 1934)

En condition physiologique, cette puissante ERO est produite en quantité négligeable (*Josephson et al.*, 1991). Par contre, le OH• est généré significativement lors d'un état pathologique où les deux substrats sont présents en grande quantité. Il contribue alors

localement à l'oxydation des chaînes d'acide gras insaturées et au dommage cellulaire par la peroxydation des lipides et le bris des brins d'ADN (*Imlay et al.*, 1988). De plus, au niveau vasculaire, le radical  $\text{OH}\bullet$  peut catalyser la production de prostanoïdes vasoconstricteurs (*Auch-Schwelk et al.*, 1989).

En présence d'HVG, une augmentation de la production des ERO est responsable d'une dysfonction endothéliale du ventricule gauche (*MacCarthy et al.*, 2001). Suite à cette observation, Nakagami et al. (2003) ont démontré que, conséquemment à l'activation de la NAD(P)H oxydase par l'Ang II, l'hypertrophie cardiaque est le résultat de l'action de  $\bullet\text{O}_2^-$  plutôt que de celle de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (*Nakagami et al.*, 2003). Au niveau vasculaire, des expériences faites sur un modèle d'HVG secondaire à un cerclage aortique suprarrénal ont démontré qu'une augmentation seule de  $\bullet\text{O}_2^-$  n'est pas associée à une diminution de la réponse endothéliale. De fait, ce serait plutôt le ONOO-, produit d'interaction du  $\bullet\text{O}_2^-$  et du  $\bullet\text{NO}$ , qui serait la source de la diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium (*Bouloumié et al.*, 1997).

## Sources des ERO

Les cellules inflammatoires, tels les macrophages et les neutrophiles, utilisent la production des ERO pour la défense de l'hôte. Ces cellules génèrent et libèrent de grandes quantités toxiques de  $\bullet\text{O}_2^-$  et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  via leurs myéloperoxydases en réponse aux organismes envahisseurs (*McGafferty DM*, 2000). Ce système leucocytaire, en plus des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'AA (COX, PGH<sub>2</sub> synthétase et lipoxygénase) (*Kukreja et al.*, 1986) représente des sources additionnelles bien que minoritaires de génération des ERO dans le système cardiovasculaire. Les principales sources enzymatiques des ERO sont localisées au niveau de la mitochondrie (cytochromes de la chaîne respiratoire et monoamines oxydases mitochondriales) ou dans les différentes couches constituant la paroi vasculaire (xanthine oxydase [XO], NOS et NAD(P)H oxydase).

## Mitochondrie

Les espèces réactives oxygénées sont produites en condition basale au niveau des mitochondries, par la chaîne mitochondriale de transport d'électrons qui est formée d'une série d'enzymes contenant un cytochrome (*Sorescu et Griendling, 2002*). Cette chaîne, située dans la matrice interne, est responsable de la production d'ATP en condition aérobie, où environ 2% de la quantité totale d'oxygène impliquée est convertie en  $\bullet\text{O}_2^-$  plutôt qu'en eau (*Ambrosio et al., 1993*). Ainsi, approximativement 2 % des électrons sont perdus dans la chaîne respiratoire pour générer le  $\bullet\text{O}_2^-$  qui est libéré vers le côté cytosolique, où une concentration élevée de MnSOD est présente pour le neutraliser (*Sorescu et Griendling, 2002*). Le peroxyde d'hydrogène ensuite généré, qui est perméable à la membrane mitochondriale, peut être dégradé par la glutathion peroxydase située sur la membrane interne de la mitochondrie (voir page 23) ou traverser la bicouche et agir au niveau des cellules avoisinantes (*Phung et al., 1994*). Finalement, la mitochondrie possède également la capacité de générer des ERO à l'extérieur de la mitochondrie, par l'oxydation des monoamines par la monoamine oxydase membranaire mitochondriale (*Ellis et Triggle, 2003*).

En condition de réoxygénation suite à une hypoxie ou suivant un traitement avec l'antimycine, qui découple spécifiquement le complexe I (NADH oxydase) ou III (cytochrome b-c<sub>1</sub>) de la chaîne respiratoire, les électrons libres entrent en contact de manière inappropriée avec l'oxygène. Il en résulte la formation de grande quantité de  $\bullet\text{O}_2^-$ , surpassant la capacité de neutralisation de la SOD (*Auch-Schwelk et al., 1989*) (voir page 34).

## Xanthine Oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase est ubiquitaire et elle catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine, générant la xanthine et l'acide urique au cours du métabolisme des purines (*Bray CA, 1975*). L'enzyme existe sous deux formes interchangeables, fonctionnellement distinctes : la xanthine déshydrogénase (XDH) et la

XO (Harrison R, 2002). La XDH réduit préférentiellement la  $\text{NAD}^+$  alors que la XO réduit l'oxygène moléculaire formant ainsi le  $\bullet\text{O}_2^-$  et le  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sanders et al., 1997).

Les ERO générées par la XO sont impliquées dans une variété de pathologies incluant l'hypercholestérolémie et la dysfonction endothéliale qui est présente dans l'insuffisance cardiaque chronique et l'I/R (Harrison R, 2002 ; Landmesser et al, 2002). À titre d'exemple, lors d'une période d'ischémie, il se produit une conversion protéolytique de la XDH en XO accompagnée d'une décomposition de l'ATP et de l'ADP en hypoxanthine. Cette dernière s'accumule dans les tissus et elle sert, lors de la reperfusion, de substrat à la XO nouvellement générée. La XO réduit par la suite l'oxygène moléculaire pour former le  $\bullet\text{O}_2^-$  et le  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sanders et al., 1997).

## NOS

En condition normale, tel que mentionné dans les chapitres précédents, la eNOS est source du plus important facteur relaxant dépendant de l'endothélium, le  $\text{NO}\bullet$ . Par contre, lors de certaines circonstances, l'enzyme peut également être source de  $\bullet\text{O}_2^-$  ainsi que de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La eNOS, tout comme les deux autres isoformes de la NOS, utilise la L-arginine comme substrat pour synthétiser le  $\text{NO}\bullet$  d'une manière dépendante de la  $\text{BH}_4$ . Si la biodisponibilité de la L-arginine ou de la  $\text{BH}_4$  est faible, ou si la  $\text{BH}_4$  est oxydée, la eNOS devient découplée et elle transfère les électrons à l'oxygène moléculaire, générant ainsi des quantités significatives de  $\bullet\text{O}_2^-$  et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Stuehr et al., 2001).

La destruction de la  $\text{BH}_4$  par le peroxy-nitrite contribue à diminuer l'activité de la eNOS. Il en résulte alors une augmentation de la génération de  $\bullet\text{O}_2^-$ , une diminution de la biodisponibilité du  $\text{NO}\bullet$  et une dysfonction endothéliale subséquente. La présence de cette seconde voie utilisée par la eNOS est retrouvée dans l'hypertension, où il y a une activation de la NAD(P)H oxydase (Landmesser et al., 2003) et elle est également décrite dans l'athérosclérose et le diabète (Milstien et Katusic, 1999).

## NAD(P)H oxydase

Comme il a été démontré ci-haut, plusieurs enzymes sont impliquées dans la génération des ERO. Par contre, au niveau vasculaire, la source primaire est un complexe enzymatique lié à la membrane appelé NAD(P)H oxydase. La production de  $\bullet\text{O}_2^-$  survient lorsque l'oxygène est réduit par un électron provenant du substrat NADH et/ou NADPH (*Griendling et al.*, 2000).



La NAD(P)H oxydase fût initialement identifiée dans les neutrophiles, où un rôle de destruction bactérienne lui est attribué (*Leusen et al.*, 1996). Par la suite, il est devenu évident que les différentes sous-unités de la NAD(P)H oxydase leucocytaire sont également exprimées au niveau des cellules non phagocytaires, incluant les cellules vasculaires telles les CE, les CML et les fibroblastes de l'adventice (*Rey et al.*, 2002 ; *Wang et al.*, 1998 ; *Görlach et al.*, 2000). La structure et la fonction de la NAD(P)H oxydase entre les cellules phagocytaires et non phagocytaires présentent certaines ressemblances, mais plusieurs différences existent.

La NAD(P)H oxydase vasculaire est constituée de trois sous-unités cytosoliques régulatrices (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> et la petite protéine G Rac-1) et d'un domaine cytochrome b558 hétérodimérique qui est responsable de la liaison du substrat et du transfert d'électron (*Griendling et al.*, 2000). Ce dernier est composé d'une sous-unité  $\alpha$  (p22<sup>phox</sup>) et d'une sous-unité  $\beta$  contenant une flavine (gp91<sup>phox</sup> [glycoprotéine 91 oxydase phagocytaire]) ou nox1 [oxydase non phagocytaire] ou nox4 ou nox5) (*Griendling et al.*, 2000). La nature de la sous-unité  $\beta$  dépend du type cellulaire : au niveau de la paroi vasculaire, gp91<sup>phox</sup> est associée à l'isoforme endothéliale (*Görlach et al.*, 2000) (Figure 7a) alors que la nox1 est impliquée dans la production de  $\bullet\text{O}_2^-$  par les CML (*Griendling et al.*, 2000 ; *Lassègue et al.*, 2001). De plus, la sous-unité p67<sup>phox</sup> est absente au niveau des CML (*Patterson et al.*, 1999). La composition de la NAD(P)H oxydase des fibroblastes reste controversée. Dans quelque cas, toutes les sous-unités ont été découvertes (*Pagano et al.*, 1997) alors que d'autres études démontrent seulement la présence de p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> (*Jones OTG*, 1994 ; *Meier et al.*, 1993). Du côté des NAD(P)H oxydases leucocytaires, la composante p60<sup>phox</sup> est additionnelle au

complexe cytosolique. De plus, contrairement aux oxydases vasculaires, la petite protéine G est Rac-2 et la composante impliquée dans le transfert de l'électron est gp91<sup>phox</sup> (Jones OTG, 1994) (Figure 7b).

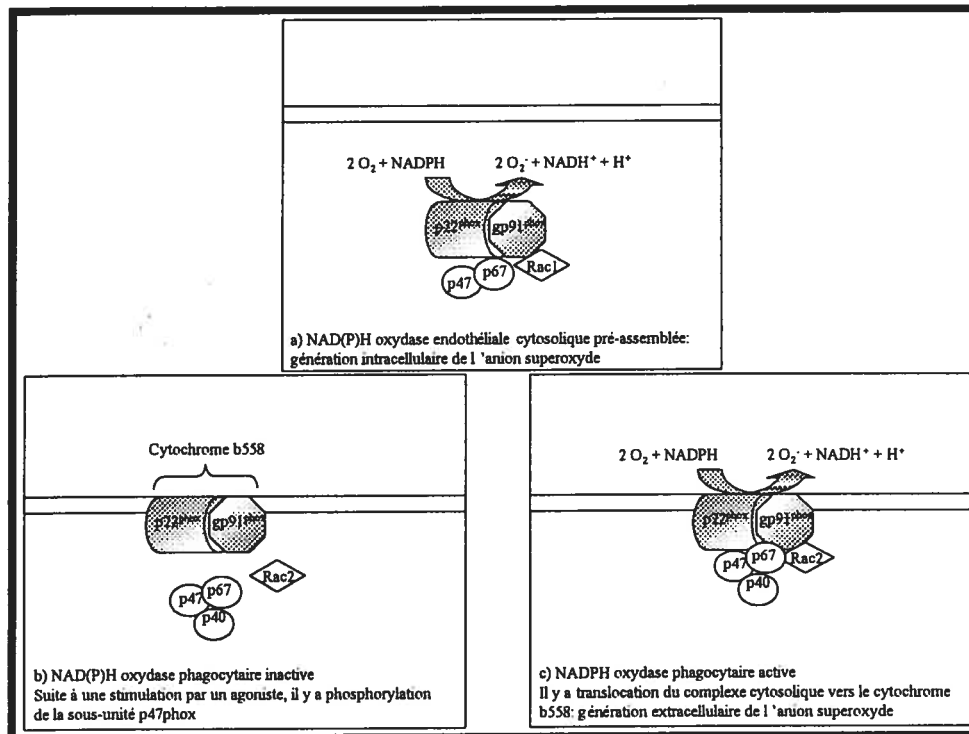


Figure 7 : NAD(P)H oxydase endothéliale et phagocytaire

Les oxydases des neutrophiles libèrent rapidement de grandes quantités de  $\bullet\text{O}_2^-$  en réponse à une stimulation alors que l'enzyme vasculaire en produit continuellement en quantité de 10 à 100 fois moins importante (Griendling *et al*, 2000). Ceci peut être expliqué par le fait que, au niveau des CE, les sous-unités gp91<sup>phox</sup> et p22<sup>phox</sup> sont principalement intracellulaires et colocalisées avec p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> en condition basale. Ainsi, ce complexe intracellulaire pré-assemblé semble être responsable de la faible quantité de ERO générée dans les CE non stimulées (Li *et Shah*, 2002). Au niveau phagocytaire, l'activation de l'enzyme ne survient que lorsque les facteurs cytosoliques sont recrutés à la membrane et associés avec le cytochrome b558 ; ce n'est que suite à une stimulation qu'il y a phosphorylation de p47<sup>phox</sup> et translocation du complexe cytosolique (Fontayne *et al.*, 2002) (Figure 5b,c). La cinétique d'activation est relativement lente pour les cellules vasculaires (minutes à heures), comparativement à



quasi instantanée pour les neutrophiles (*Shi et al.*, 2001). De plus, les deux types d'oxydases possèdent une affinité différente pour le substrat, étant supérieure pour le NADH relativement au NADPH dans les CE et unique pour NADPH dans les leucocytes (*Guzik et al.*, 2000). Malgré ces nombreuses différences, les deux types d'oxydases sont inhibées par le DPI (diphénylène iodonium), un inhibiteur des oxydases contenant une flavine.

L'importance de la NAD(P)H au niveau vasculaire est liée à sa capacité de répondre à une grande variété d'agonistes, tel Ang II (via le sous-type de récepteur AT<sub>1</sub>), PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes), thrombine, glucocorticoïdes, forces de cisaillement et LDL (lipoprotéine de faible densité) (*Griendling et al.*, 1994 ; *Holland et al.*, 1998 ; *De Keulenaer et al.*, 1998). L'activation de l'enzyme survient à court terme par la stimulation de signaux intracellulaires spécifiques (*Lassègue et Clempus*, 2003) ou à long terme par la régulation positive des sous-unités de l'enzyme (*Touyz et al.*, 2002 ; *Lassègue et al.*, 2001). À titre d'exemple, en culture cellulaire, l'Ang II régule à la hausse l'expression des sous-unités gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> dans les CML isolées d'artères de résistance humaines (*Touyz et al.*, 2002).

La NAD(P)H oxydase cardiovasculaire est constitutivement active mais sa fonction exacte en condition physiologique n'est pas connue (*Pagano et al.*, 2002). Il est reconnu que les ERO fonctionnent comme des molécules de signalisation pour des réponses cellulaires spécifiques, tel que l'apoptose et la vasodilatation/vasoconstriction (voir page 36), mais les mécanismes de condition physiologique versus pathologiques restent à déterminer (*Sorescu et Griendling*, 2002 ; *Bengtsson et al.*, 2003). Une activité à la hausse de la NAD(P)H oxydase est associée à plusieurs pathologies incluant l'hypertension (*Landmesser et al.*, 2003), les maladies vasculaires diabétiques (*Guzik et al.*, 2000), l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques (*Bauersachs et al.*, 1999 ; *Li et al.*, 2002), ainsi que l'athérosclérose. Il a été démontré qu'une augmentation de l'expression des sous-unités p22<sup>phox</sup> et gp91<sup>phox</sup> existe au niveau des lésions athérosclérotiques humaines (*Azumi et al.*, 1999 ; *Sorescu et al.*, 2002). Ainsi, tout comme les enzymes

précédentes, la surproduction de  $\bullet\text{O}_2^-$  par cette enzyme est associée à une diminution de la biodisponibilité de  $\text{NO}\bullet$  et aux conséquences relatives à la diminution de cet EDRF.

La libération chronique des ERO associée à l'HVG semble être un mécanisme dépendant de la NAD(P)H oxydase. De fait, l'activité de l'enzyme au niveau du myocarde est élevée et l'expression des sous-unités  $\text{p}22^{\text{phox}}$ ,  $\text{gp}91^{\text{phox}}$ ,  $\text{p}67^{\text{phox}}$  et  $\text{p}47^{\text{phox}}$  est augmentée dans le ventricule gauche des cobayes suite à un cerclage aortique (*Li et al.*, 2002). L'augmentation de la génération des ERO représente également une conséquence de l'activation anormale des NAD(P)H oxydases, en réponse à l'Ang II, dans un modèle d'augmentation de la post-charge cardiaque par cerclage aortique suprarénal d'une durée de 14 jours chez le rat (*Bouloumié et al.*, 1997). Dans ce même modèle expérimental, subséquemment à l'augmentation de la génération de  $\bullet\text{O}_2^-$ , il se produit une augmentation de l'expression de la eNOS aux niveaux aortique et cardiaque (*Bouloumié et al.*, 1997). De manière contradictoire, en présence d'un cerclage aortique suprarénal chez le cobaye, aucune différence significative de l'expression de la eNOS cardiaque n'est détectée après 21 jours (*MacCarthy et Shah*, 2000).

L'activation de la NAD(P)H oxydase est associée à l'HVG : cette enzyme constitue ainsi les sources cardiaque et vasculaire de  $\bullet\text{O}_2^-$  (*Harrison et al.*, 2003). Par ailleurs, dans un modèle porcin d'HVG secondaire à un cerclage de l'aorte ascendante d'une durée de 60 jours, une pré-incubation des artères coronaires épicaudiques avec un supplément de  $\text{BH}_4$  améliore la dysfonction endothéliale. Puisque l'ajout de ce cofacteur nécessaire à l'activité de la eNOS améliore la relaxation dépendante de l'endothélium induite par les protéines  $\text{G}_i$ , un découplage fonctionnel de l'enzyme est probablement présent dans ce modèle d'HVG, ce qui suggère que la eNOS constituerait également une source de  $\bullet\text{O}_2^-$  (*Malo et al.*, 2003<sup>1</sup>).

## Antioxydants endogènes

Le statut oxydatif est contrôlé des antioxydants endogènes enzymatiques tels SOD, GPx et CAT ainsi que par un large spectre d'antioxydants non enzymatiques, tels que  $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), acide ascorbique (vitamine C), caroténoïde ( $\beta$ -carotène), flavonoïde, bilirubine, acide urique et glutathion (*Flavahan et Vanhoutte, 1995*).

### Superoxyde dismutase

La SOD est impliquée dans la neutralisation de l'anion superoxyde, réaction catalysée par l'ajout d'un électron et de deux protons afin de former le  $H_2O_2$ . Trois isoformes ont été identifiées chez les mammifères. La SOD cuivre/zinc (Cu,Zn-SOD ou SOD1) est localisée au niveau du cytosol et du noyau et minoritairement, dans la mitochondrie de presque tous les types cellulaires (*Okado-Matsumoto et Fridovich, 2001*). Cette enzyme est impliquée dans la dismutation du  $\bullet O_2^-$  dérivé de la eNOS au cours de la synthèse de  $NO\bullet$  (*Stuehr et al, 2001*), prolongeant ainsi la demi-vie du facteur relaxant. La SOD-manganèse (MnSOD ou SOD2) est située dans la matrice mitochondriale et constitue la première enzyme qui neutralise le  $\bullet O_2^-$  généré par la chaîne respiratoire (*McIntyre et al., 1999*). La SOD extracellulaire (ecSOD ou SOD3) est sécrétée de manière extracellulaire et est liée aux polysaccharides sulfatés, tel l'héparan sulfate, à la surface des cellules (*McIntyre et al., 1999*).

La Cu,Zn-SOD constitue l'isoforme vasculaire majoritaire, exerçant approximativement 50-80% de l'activité SOD totale (*Didion et al., 2002*). Par contre, chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires, l'activité de l'enzyme est diminuée (*Landmesser et al., 2000*), entraînant ainsi une accumulation de  $\bullet O_2^-$  et une augmentation de ses effets délétères.

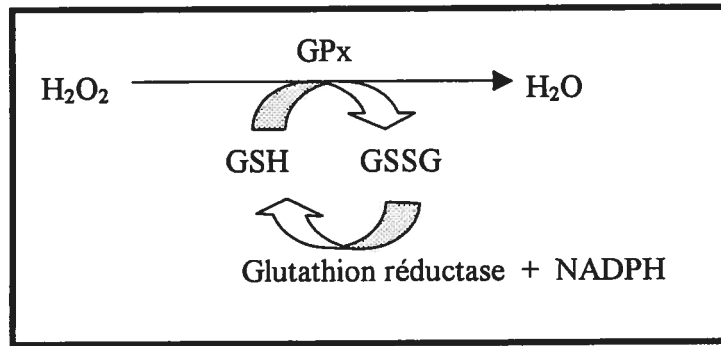
## **Catalase**

La CAT représente une des plus efficaces enzymes connues puisque aucune concentration de  $H_2O_2$  ne peut la saturer (*Lledias et al.*, 1998). Ainsi, l'enzyme protège la cellule du  $H_2O_2$  qu'elle génère par sa conversion en eau plus en une molécule d'oxygène. La CAT n'est pas essentielle pour certains types cellulaires en condition physiologique ; par contre, suite à une exposition chronique au stress oxydatif, son activité est augmentée lui permettant ainsi de jouer son rôle antioxydant (*Hunt et al.*, 1998).

## **Glutathion peroxydase**

Le système glutathion constitue un second mécanisme important de défense de l'organisme contre les ERO. Le NADPH, substrat des enzymes prooxydantes, est également utilisé en tant qu'équivalent réducteur afin de maintenir les réserves de glutathion réduit (GSH), molécule impliquée dans la neutralisation des ERO. Ainsi, les ERO sont tamponnés à l'intracellulaire par la conversion du GSH en sa forme oxydée (GSSG), réaction catalysée par la GPx. Le GSSG est par la suite recyclé en GSH par l'action de la glutathion réductase (*Leopold et al.*, 2003).

Il existe au moins cinq isoformes de GPx chez les mammifères (GPx1 à GPx5). Celle impliquée dans la réduction du  $H_2O_2$  est la GPx cytosolique et mitochondriale (cGPx ou GPx1). Cette isoforme est exprimée dans la majorité des tissus mais de manière prédominante au niveau des érythrocytes, des reins et du foie (*Matés and Fsanchez-Jiménez*, 1999). Le processus antioxydant impliquant le glutathion représente une source majeure de protection contre de faibles niveaux de stress oxydatif, contrairement à la CAT qui est plus efficace en présence d'un stress oxydatif sévère (*Yan et Harding*, 1996). Finalement, au niveau des érythrocytes humains, la GPx est considérée comme étant la principale enzyme impliquée dans la détoxification du  $H_2O_2$  puisque cette dernière possède une affinité supérieure au substrat relativement à la CAT (*Izawa et al.*, 1993).



**Figure 8 :** Action de la glutathion peroxydase

L'HVG secondaire à un cerclage de l'aorte transverse dans un modèle murin est associée à une augmentation de l'activité antioxydante cardiaque, démontrée par une élévation de l'activité de la SOD et de la CAT. Ainsi, l'augmentation de l'activité de ces deux enzymes semble représenter un mécanisme compensatoire à la présence du stress oxydatif dans l'hypertrophie cardiaque (*Dates et al., 2002*). Du côté vasculaire, Malo et al. (2003<sup>1</sup>) ont démontré qu'une pré-incubation d'anneaux d'artères coronaires épiscopardiques, provenant d'un cœur hypertrophié suite à un cerclage de l'aorte ascendante, avec un supplément de SOD et de CAT améliore la dysfonction endothéliale.

## Rôles des ERO

La pensée conventionnelle décrit les ERO comme étant des molécules aux effets délétères au niveau de la paroi vasculaire, menant à des processus pathologiques. Par contre, les ERO sont également impliquées physiologiquement dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. Voici les principales catégories englobant les divers effets physiopathologiques des ERO.

En premier lieu, les ERO stimulent la prolifération, l'hypertrophie et la survie cellulaires dans différents types cellulaires tels les cardiomyocytes et les CML (*Griendling et al., 2000 ; Shi et al., 2001 ; Irani K, 2000*). De plus, les ERO possèdent la capacité de supprimer la croissance et de mener à la mort cellulaire programmée, apoptose ou anoikis, dépendamment du niveau de stress oxydatif. L'exposition de courte

durée à de relativement faibles quantités de ERO induit la croissance alors qu'une exposition prolongée à une plus forte concentration mène à la mort cellulaire (*Irani K, 2000*). Les effets opposés peuvent également être dus au type de ERO présent (*Shi et al., 2001*). Du côté pathologique, les ERO en concentration trop élevée induisent des dommages et des dysfonctions au niveau mitochondrial qui perpétuent un cycle catastrophique de dysfonction cellulaire, davantage de génération de ERO, un déclin mitochondrial et une mort cellulaire. Ceci affecte éventuellement la fonction vasculaire et contribue au développement de maladies vasculaires chroniques (*Ballinger et al., 2000*).

Les ERO peuvent aussi servir de seconds messagers. Plusieurs effecteurs des facteurs de risque des maladies vasculaires, tels les LDL oxydés et l'Ang II, favorisent la dysfonction endothéliale et la mort cellulaire via des mécanismes oxydatifs (*Griendling et al., 2000 ; Meyer et Schmitt, 2000 ; Kunsch et Medford, 1999*). En d'autres termes, ils stimulent ou sensibilisent les cellules vasculaires à générer des ERO, ces derniers servant de seconds messagers dans l'activation de la production de molécules d'adhésion et/ou d'autres produits de gènes inflammatoires vasculaires. L'induction de l'expression de ces molécules favorise l'infiltration des monocytes dans la paroi vasculaire et la libération de signaux pro-inflammatoires additionnels (*Berges et al., 2003*).

Les ERO sont également impliquées dans le processus d'angiogénèse. De fait, les ERO agissent au niveau de trois événements clés de l'angiogénèse, en induisant la prolifération et la migration des CE et la formation d'une tubulure par activation des lymphocytes (*Maulik et Das, 2002*). Cette formation de nouveaux vaisseaux est essentielle pour le développement embryonnaire et pour la réparation tissulaire. Par contre, l'angiogénèse est également impliquée dans des processus pathologiques tels le cancer, la rétinopathie diabétique et l'athérosclérose (*Taniyama et Griendling, 2003*).

Finalement, les ERO générées en grande quantité et qui échappent au contrôle des antioxydants endogènes ont une action sur le tonus vasomoteur. Au niveau des CML, la diffusion des ERO agit directement sur la production des vasoconstricteurs tels les endoperoxydes et les prostanoïdes. Du côté endothélial, les ERO affectent la

biodisponibilité du NO• et ainsi, les relaxations dépendantes de l'endothélium. Cette dysfonction endothéliale causée par le stress oxydatif est présente dans de nombreuses pathologies, incluant l'HVG, la maladie vasculaire associée au diabète de type 2, l'hypertension et l'athérosclérose.

## **Chapitre Quatrième**

### ***Implication du stress oxydatif dans la dysfonction endothéliale de différentes pathologies cardiovasculaires***



Le stress oxydatif, principalement via l'action de  $\bullet\text{O}_2^-$ , possède un rôle majeur dans la perturbation de l'homéostasie cardiovasculaire, affectant entre autres la fonction vasomotrice endothéliale. Cette dysfonction peut se manifester par une diminution de la sécrétion ou de l'action des EDRFs (principalement le  $\text{NO}\bullet$ ) et/ou une augmentation de la libération des EDCF ou une hypersensibilité des CML vasculaires à ceux-ci. Ainsi, un déséquilibre entre les mécanismes prooxydants et antioxydants au niveau de la paroi vasculaire constitue une source de développement de nombreuses pathologies cardiovasculaires.

## **Vieillesse et régénération de l'endothélium**

Le processus physiologique de vieillissement de l'endothélium implique une mort cellulaire par apoptose, résultant en une desquamation des cellules suivie d'une régénération. Ce remplacement endothélial survient chez l'homme vers l'âge de 30 ans et se caractérise par une régénération par des cellules dysfonctionnelles quant à leur capacité d'induire des relaxations dépendantes de l'endothélium. De manière plus concise, les CE perdent leur capacité de libérer le  $\text{NO}\bullet$ , plus particulièrement en réponse à l'agrégation plaquettaire, à la thrombine, à la sérotonine et aux agonistes des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques (*Shimokawa et al.*, 1987). Il s'agit donc d'une atteinte sélective de la réponse impliquant les protéines G sensibles à la toxine de la coqueluche qui sont normalement exprimées alors que leur activité est diminuée. Par ailleurs, la réponse des complexes agonistes-récepteurs utilisant la voie des protéines  $G_q$  est intacte durant la phase précoce de la dysfonction endothéliale, c'est-à-dire avant la survenue d'une dysfonction généralisée tardive qui implique alors les mécanismes de signalisation des protéines  $G_i$  et  $G_q$  (*Lüscher et Noll*, 1994).

La prédominance de la vasoconstriction sur la vasodilatation induite par les CE régénérées s'explique également par une augmentation de la production d'endoperoxydes (*Mombouli et Vanhoutte*, 1993), par une absence de libération de  $\text{NO}\bullet$  et d'EDH(F) suite à la liaison de l'ET-1 à ses récepteurs endothéliaux (*Nakashima et Vanhoutte*, 1993) et

par une augmentation de la production de  $\bullet\text{O}_2^-$  par le processus dépendant de la COX (*Shimokawa H, 1999*). De plus, au niveau des artérioles coronaires de rats âgés de 80 semaines, l'expression de la iNOS ainsi que l'activité de la NAD(P)H oxydase sont augmentées, contribuant à la formation du puissant oxydant ONOO-, suite à une neutralisation du NO• par le  $\bullet\text{O}_2^-$ , et ainsi au développement d'une dysfonction de l'endothélium vieillissant (*Csiszar et al., 2002*).

## Diabète

La perturbation de la fonction endothéliale constitue une caractéristique précoce du diabète, démontrée dans des modèles expérimentaux (*Hink et al., 2001*) ainsi que chez l'humain (*Guzik et al., 2002*) par une diminution significative de la production et de la biodisponibilité du NO•. Ce déficit de NO• s'explique en premier lieu par une neutralisation par le  $\bullet\text{O}_2^-$ . Cet anion dérive de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que de l'activation de la NAD(P)H oxydase suite à une stimulation par l'hyperglycémie et par l'augmentation des acides gras libres circulants, deux phénomènes majeurs du diabète (*Evans et al., 2002*). L'interaction du NO• et du  $\bullet\text{O}_2^-$  mène à la formation vasculaire de ONOO- qui oxyde la BH<sub>4</sub> en une biophtérine inactive pour stimuler la eNOS, ce qui entraîne un découplage fonctionnel de l'enzyme (*Hink et al., 2001*). Par cette deuxième voie, il y a diminution de la production du NO• et conséquemment des relaxations dépendantes de l'endothélium.

Le mécanisme diacylglycérol-protéine kinase C (DAG-PKC) serait directement impliqué dans l'induction de la dysfonction endothéliale associée à l'hyperglycémie. De fait, l'incubation des CE et des CML avec de fortes concentrations de glucose induit une augmentation intracellulaire des niveaux de DAG, menant à l'activation de la PKC et à une dysfonction endothéliale ultérieure (*Ishii et al., 1998*). Plus spécifiquement, la PKC possède la capacité d'augmenter l'expression de la eNOS (*Li et al., 1998*) ; cette eNOS qui est découplée fonctionnellement par la biophtérine inactive formera ainsi davantage d'anion superoxyde et de ONOO-.

## Ischémie/reperfusion

L'ischémie implique une diminution de l'apport sanguin au myocarde relativement à la demande (*Sorescu et Griending, 2002*). Lors d'une période ischémique prolongée, plusieurs changements surviennent au niveau du myocarde, incluant une augmentation de la génération de NO• ainsi qu'une diminution des niveaux d'ATP. En premier lieu, le cœur mobilise les eNOS immédiatement disponibles afin de produire rapidement une grande quantité de NO•. De manière concomitante, le cœur modifie son phénotype en type défensif par l'augmentation de l'expression des iNOS. Ces enzymes servent au maintien des niveaux de NO• dans le myocarde pour une période soutenue afin de protéger le cœur contre une période ischémique éventuelle (*Berges et al., 2003*).

La reperfusion du myocarde ischémique, par recirculation sanguine, constitue le traitement définitif afin d'atténuer les dommages. Par contre, la reperfusion peut provoquer des dommages myocardiques additionnels par la participation du  $\bullet\text{O}_2^-$  (*Cronstein et al., 1983*), du  $\text{H}_2\text{O}_2$  (*Crostein et al., 1985*) et du  $\bullet\text{OH}$  (*Cronstein et al., 1983*). Ces ERO sont produites en grande quantité au cours de la reperfusion, principalement par les neutrophiles activés (*Zulueta et al., 1995*). Ces ERO peuvent également provenir de la NAD(P)H oxydase (*Turrens et al., 1991*), de la chaîne respiratoire mitochondriale (*Turrens et al., 1991*) et de la XO nouvellement générée à partir de la XDH. En effet, au cours d'une période ischémique prolongée, il se produit une conversion protéolytique de XDH en XO, accompagnée d'une diminution significative de la production d'ATP et d'une décomposition de l'ATP et de l'ADP en hypoxanthine (*Sauders et al., 1997*). Ainsi, au cours de la reperfusion, la XO utilise l'hypoxanthine accumulée dans les tissus lors de l'ischémie, comme substrat afin de réduire l'oxygène moléculaire en  $\bullet\text{O}_2^-$  (*Sauders et al., 1997*). Ainsi, lors de la période de reperfusion, il y a interaction du NO• et du  $\bullet\text{O}_2^-$  qui mène à une diminution de la biodisponibilité de NO• et à la génération de ONOO- et de ses métabolites qui possèdent de puissants effets délétères au niveau du myocarde. Cette interaction possède ainsi

l'effet néfaste de la diminution du facteur relaxant NO• accompagné de l'effet bénéfique de la neutralisation de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> (*Wink et al.*, 1993).

Au niveau vasculaire, l'I/R induit une dysfonction endothéliale des artères coronaires, démontrée par une augmentation initiale de la production de NO•, suivie d'une réduction prolongée. Il se produit ainsi une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium suite à une stimulation par des agonistes de la eNOS (*Ronson et al.*, 1999). Un traitement à l'aide de BH<sub>4</sub> (*Tiefenbacher et al.*, 1996) et de L-arginine (*Hein et al.*, 2003) restaure la fonction endothéliale, suggérant que ces deux cofacteurs de la eNOS ont une biodisponibilité réduite et/ou une fonctionnalité altérée suite à une I/R. En dernier lieu, la réponse contractile sélective à l'ET-1 est augmentée dans les artères coronaires de conductance suite à un épisode d'I/R (*Saito et al.*, 1992).

## Hypertension artérielle (HTA) systémique

La caractéristique hémodynamique primaire de l'hypertension systémique est l'augmentation de la résistance vasculaire périphérique associée à des altérations structurelles, mécaniques et fonctionnelles (*Folkow et al.*, 1990). Le changement structurel majeur constitue le remodelage vasculaire démontré par une diminution du diamètre de la lumière ainsi que par un épaississement de la média. Plus précisément, au niveau cellulaire, il se produit une hyperplasie, une hypertrophie et une élongation des CML, une réorganisation des cellules autour de la lumière de l'artère et/ou une altération de la composition de la matrice extracellulaire (*Intengan et al.*, 1999). L'hypertension est caractérisée par une atteinte de la fonction endothéliale de relaxation ainsi que par une augmentation de la réponse des CML aux facteurs contractants dérivés de l'endothélium (*Schiffrin EL.* 1992).

Plusieurs modèles expérimentaux d'hypertension existent, ayant pour dénominateur commun une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium ; par contre, le mécanisme exact impliqué dans cette dysfonction peut différer d'un modèle

à l'autre. Le modèle de rat spontanément hypertendu (SHR) est le plus couramment utilisé pour tenter d'expliquer les mécanismes impliqués dans l'hypertension essentielle, grâce à sa correspondance avec des événements cliniques. La grande majorité des études expérimentales, mis à part le modèle d'hypertension induite par la noradrénaline (*Laursen et al.*, 1997), implique une hausse du stress oxydatif (*Lassègue et Griendling*, 2004). Une augmentation de  $\bullet\text{O}_2^-$  a également été démontrée dans des études cliniques d'hypertension essentielle, où elle contribue à la dérégulation de plusieurs processus physiologiques menant à des altérations structurelles et fonctionnelles aux niveaux cardiaque, hépatique, vasculaire (*Lassègue et Griendling*, 2004) incluant les artères coronaires épicaudiques (*Treasure et al.*, 1992), ainsi qu'au niveau du système nerveux central (*Lassègue et Griendling*, 2004).

Selon le modèle expérimental SHR, la diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium n'est pas seulement due à une diminution de la libération de facteur relaxant mais bien à une libération concomitante d'un facteur contractant (*Lüscher et Vanhoutte*, 1986). Parallèlement, dans l'hypertension essentielle chez l'homme, la dysfonction endothéliale est associée à une prédisposition de l'endothélium à libérer des facteurs contractants tel que le radical  $\bullet\text{O}_2^-$  qui diffuse vers les CML et qui active la COX-1 surexprimée. Cette enzyme génère alors les endoperoxydes responsables de la contraction vasculaire (*Vanhoutte PM*, 1996). L'augmentation endothéliale de  $\bullet\text{O}_2^-$  s'explique alors par une augmentation de sa génération mais également par une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes SOD et CAT ainsi que des neutralisateurs non-enzymatiques des ERO, tels la vitamine E et le glutathion (*Redon et al.*, 2003).

Les relaxations dépendantes de l'endothélium chez les patients souffrants d'hypertension essentielle peuvent également être modulées par la présence simultanée d'autres facteurs de risque, tel l'hyperhomocystéinémie. De fait, la présence d'une augmentation des niveaux plasmatiques d'homocystéine induit une diminution de la biodisponibilité du  $\text{NO}\bullet$  et des relaxations dépendantes de l'endothélium par une exacerbation du stress oxydatif (*Virdis et al.*, 2001).

## Hypertension pulmonaire (HTP)

Deux mécanismes de base sont impliqués dans l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire dans l'HTP : la vasoconstriction et le remodelage structurel des vaisseaux pulmonaires périphériques. Ce dernier est caractérisé par une prolifération et une hypertrophie des CML des artères pulmonaires périphériques ainsi que par une production des protéines matricielles dans la paroi vasculaire. La génération pulmonaire des ERO est impliquée dans ce remodelage vasculaire et dans le développement de l'hypertension pulmonaire suite à un épisode d'ischémie/reperfusion (*Angdin et al.*, 2003), d'hyperoxie (*Nozik-Grayck et al.*, 1997), ainsi que d'hypoxie chronique (*Jefferson et al.*, 2004).

Plusieurs études ont démontré qu'une exposition à des pressions partielles réduites d'oxygène induit de rapides changements de la composition des lipides membranaires par un mécanisme de peroxydation par les ERO et ce, au niveau d'une variété de lignées cellulaires de mammifères incluant les cellules endothéliales pulmonaires (*Block et al.*, 1989). Les dommages oxydatifs peuvent être d'étiologie multifactorielle et impliquer divers processus de formation des ERO en présence d'une hypoxie chronique : 1) une libération de superoxyde par la chaîne respiratoire mitochondriale (*Cadenas et al.*, 1977), 2) une augmentation de la production de superoxyde par certaines enzymes qui nécessitent l'oxygène pour une activité complète (*Misra et Fridovich*, 1972), 3) une augmentation de l'expression de la XO ainsi que de son substrat hypoxanthine (*Fried et al.*, 1973) et, 4) une activation de la NAD(P)H oxydase des phagocytes (*Marshall et al.*, 1996).

Le développement d'une hypertension pulmonaire hypoxique est inhibée par un traitement antioxydant adéquat. L'administration de diméthylthioure chez des rats exposés à 10% d'oxygène pour une période de 10 jours, inhibe la reconstruction structurelle des vaisseaux sanguins périphériques ainsi que le développement de l'hypertrophie ventriculaire droite, deux conséquences de l'hypertension pulmonaire (*Langleben et al.*, 1989). Un traitement antioxydant avec la N-acétyl-L-cystéine (NAC)

atténuée également l'hypertension pulmonaire au cours d'une exposition à l'hypoxie (*Hoshikawa et al.*, 1995). Plus précisément, la NAC est rapidement hydrolysée en cystéine, précurseur du glutathion réduit (*Sochman J*, 2002) qui est impliqué dans la neutralisation des ERO. Tel que mentionné précédemment, les ERO sont tamponnés à l'intracellulaire par la conversion de GSH en sa forme oxydée (GSSG), réaction catalysée par la GPx.

## Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie systémique chronique des vaisseaux, liée à des phénomènes inflammatoires, qui constitue la cause majeure de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés (*Ross R*, 1986). Les mécanismes étiologiques de l'athérogenèse causent des altérations délétères au niveau de la physiologie endothéliale, induites par la synergie de plusieurs facteurs de risque tels que l'hypercholestérolémie, le vieillissement, le diabète, l'obésité, l'hypertension, le tabagisme et la déficience en œstrogène (*Barton et Haudenschild*, 2001). La dysfonction endothéliale constitue un événement clé précoce dans le développement de l'athérosclérose et elle est également impliquée dans la progression de la plaque athéromateuse ainsi que dans les complications athérosclérotiques (*Kinlay et Ganz*, 1997). L'altération de la fonction vasoactive des CE se retrouve aussi bien au niveau des vaisseaux de conductance, tels les artères coronaires épicaudiques qui constituent des sites privilégiés des lésions athérosclérotiques, qu'au niveau des vaisseaux de résistance qui ne démontrent aucun signe visible d'athérosclérose (*Britten et al.*, 1999).

Les stades précoces de l'athérosclérose sont associés à une dysfonction sélective de la voie dépendante des protéines G<sub>i</sub>, fait appuyé par la diminution de l'expression de ces protéines dans les artères coronaires humaines athérosclérotiques (*Tsutsui et al.*, 1994). En plus de la diminution de la synthèse du NO•, les CE expriment une quantité diminuée de la eNOS (*Liao et al.*, 1995) concomitante à une augmentation de la production d'ET-1 (*Boulangier et al.*, 1992). Ces différentes altérations sont la

conséquence de l'action des LDL oxydées (*Liao et al.*, 1995 ; *Boulanger et al.*, 1992), oxydation causée par les importants médiateurs de l'initiation et de la progression de l'athérosclérose que sont les ERO. Ces dernières sont présentes en grande quantité dans les artères athérosclérotiques humaines (*Navalkar et al.*, 2001) et elles induisent plusieurs réponses cellulaires proathérogéniques *in vitro* dont l'inactivation du NO•, l'induction de l'apoptose des CE, la surexpression des molécules d'adhésion à la surface des CE, l'oxydation des LDL ainsi que la migration et la prolifération des CML (*Paravacini et al.*, 2002).

La surexpression de molécules d'adhésion telle que VCAM-1 (molécule d'adhésion cellulaire vasculaire) à la surface endothéliale, produit une augmentation de l'attachement et de la migration des monocytes dans l'espace sous-endothélial. À ce site, l'athérogenèse est perpétuée par une série d'interactions entre les cellules inflammatoires (les macrophages suite à leur passage trans-endothélial), les CML et les fibroblastes dans un milieu saturé de LDL oxydées (*Molavi et Mahta*, 2004). Les macrophages sont responsables de la phagocytose des LDL oxydées dont les récepteurs ne sont pas soumis à une inhibition rétrograde, conservant leur expression. Ainsi, les macrophages s'engorgent de lipides, devenant des cellules spumeuses athérosclérotiques (*Schwartz et al.*, 1991) qui produisent de grandes quantités de protéases digestives, les myéloperoxydases, qui affaiblissent la matrice extracellulaire sous-endothéliale et augmentent la production des ERO (*Molavi et Mehta*, 2004).

La dégradation de la matrice en réponse aux protéases ainsi que l'augmentation de la production des ERO sont à l'origine du recrutement et de la prolifération des CML (*Molavi et Mehta*, 2004) ; ceci mène ultérieurement à un épaissement et à une augmentation de la rigidité de la paroi vasculaire (*Vanhoutte et al.*, 1997). Ainsi, le facteur relaxant NO• libéré de l'endothélium doit traverser de grandes distances avant d'atteindre les CML (*Vanhoutte et al.*, 1997), en plus d'être synthétisé en quantité moindre et d'avoir une biodisponibilité diminuée suite à une neutralisation par le •O<sub>2</sub>.



Il existe différentes enzymes, autres que les myéloperoxydases, à la source de l'augmentation des niveaux des ERO. La XO (*Patetsios et al.*, 2001) ainsi que la NAD(P)H oxydase, identifiées par l'augmentation de l'expression des sous-unités p22<sup>phox</sup> et gp91<sup>phox</sup> dans les lésions athérosclérotiques humaines (*Azumi et al.*, 1999 ; *Sorescu et al.*, 2002), constituent deux enzymes clés dans la production des ERO. De plus, l'interaction entre le NO• et le •O<sub>2</sub><sup>-</sup> mène à la formation de ONOO- et à l'oxydation de la BH<sub>4</sub>; le découplage subséquent de la eNOS fait de cette dernière une tierce source de ERO (*Laurson et al.*, 2001). L'activité de la GPx est augmentée dans les macrophages (*Mattsson Hulten et al.*, 2005) ainsi qu'au niveau de la paroi artérielle de lapins avec une diète riche en cholestérol (*Del Biccio et al.*, 1990). De plus, les LDL oxydées provoquent une augmentation des défenses antioxydantes telle que la CAT dans les macrophages humains (*Mattsson Hulten et al.*, 2005). Bien que les macrophages augmentent leur activité endogène antioxydante en réponse au stress oxydatif, ceci semble insuffisant pour prévenir les dommages cellulaires. Ils jouent ainsi un double rôle dans l'athérogenèse, par la promotion et la limitation de l'oxydation des LDL (*Mattsson Hulten et al.*, 2005).

## Hypertrophie ventriculaire gauche

Une augmentation chronique du volume sanguin ou de la pression, causée par une augmentation de la post-charge et par l'hypertension artérielle systémique principalement, est à l'origine d'une série d'évènements cellulaires et moléculaires menant à une hypertrophie cardiaque adaptative (*Chien et al.*, 1991). Cette réponse hypertrophique est caractérisée par une augmentation du volume cellulaire des cardiomyocytes, une prolifération des cellules non-cardiomyocytes (principalement des fibroblastes), une activation de l'expression des gènes foetaux (ANP, BNP) et des proto-oncogènes, une organisation des protéines contractiles dans les unités des sarcomères<sup>1</sup> et une altération de la concentration intracellulaire de Ca<sup>++</sup> (*Marban et Koretsune*, 1990). La synthèse des mitochondries représente également un évènement cellulaire précoce suite à l'initiation de l'hypertrophie, potentiellement afin de compenser la demande d'énergie des cardiomyocytes hypertrophiés (*Braunwald E*, 1997). Par contre, en cas

d'une surcharge de pression prolongée, il survient un déficit relatif de mitochondrie, et donc d'énergie (ATP), par rapport au nombre de myofibrilles, ce qui compromet la fonction cardiaque (*Braunwald E, 1997*).

Cette phase compensatrice du cœur, pour contrer la disproportion entre l'augmentation nécessaire du travail du ventricule gauche et la masse cardiaque disponible, est initialement bénéfique. Par contre, à long terme, l'augmentation de la dépense énergétique et l'apparition d'une dysfonction diastolique (manifestée par une diminution de la capacité de relaxation du ventricule gauche) deviennent néfastes (*Braunwald E, 1997*) et conduisent vers l'insuffisance cardiaque (*Braunwald E, 1997*). Cette dysfonction diastolique est en partie attribuable à l'augmentation de la fibrose interstitielle et à l'augmentation passive de la rigidité de la chambre mais elle implique également des anomalies intrinsèques de la fonction contractile, de la structure (hypertrophie et réorganisation des filaments contractiles) et du nombre de cellules cardiaques (*Swynghedauw B, 1999*).

Différents modèles expérimentaux animaux ont documenté que les ERO sont à la source du développement de l'hypertrophie cardiaque ainsi que de la dysfonction endothéliale. En premier lieu, au niveau des cardiomyocytes hypertrophiés de rat, suite à une perfusion d'Ang II, l'hypertrophie cardiaque et la fibrose surviennent suite à la formation de  $\bullet\text{O}_2^-$ , et à une hausse de l'activité de la NAD(P)H oxydase (*Nakagami et al, 2003*). Dans un modèle d'HVG secondaire à une augmentation de la post-charge chez le cobaye, la fonction endothéliale de l'endocarde du ventricule gauche, suite à une stimulation par la substance P et la bradykinine, est altérée alors que la réponse au NO exogène est préservée (*MacCarthy et Shah, 2003*). L'expression et la fonction de la eNOS cardiaque ne sont pas altérées dans ce modèle (*MacCarthy et Shah, 2003*), excluant cette enzyme comme responsable de la diminution de la biodisponibilité du NO $\bullet$  et comme source potentielle des ERO. La dysfonction endothéliale est une conséquence d'une situation de stress oxydatif augmenté, appuyée par l'augmentation significative de l'activité de la NAD(P)H oxydase dans les cœurs hypertrophiés (*MacCarthy et al, 2001*).

Une dysfonction endothéliale des artères coronaires épocardiques survient également dans l'HVG secondaire à une surcharge de pression chez le cobaye. Cette dysfonction se manifeste par une altération des relaxations dépendantes de l'endothélium alors que les relaxations aux donneurs de NO• sont intactes (*MacCarthy et Shah, 2003*). Les altérations des mécanismes de signalisation au niveau des CE impliquent préférentiellement les relaxations induites par les protéines Gi et modérément celles par les protéines Gq. Plus précisément, la voie de l'EDHF est préservée alors que les relaxations induites par le NO• sont diminuées dans les artères épocardiques de porcs avec une HVG secondaire à 60 jours de cerclage aortique (*Malo et al., 2003*). Dans ce cas, la biodisponibilité réduite du NO• s'explique par une diminution de la synthèse par sa eNOS découplée, malgré une expression conservée (*Bouloumié et al., 1997*), et par sa neutralisation par les ERO.

Le ONOO- serait responsable de la dysfonction endothéliale dans un modèle de cerclage aortique chez le rat (*Bouloumié et al., 1997*). Une augmentation de la concentration de ONOO- a également été démontrée dans les artères coronaires épocardiques porcines dans un modèle d'HVG secondaire à un cerclage aortique d'une durée de 60 jours (*Malo et al., 2003*). De plus, l'ajout d'un analogue de la BH<sub>4</sub> améliore la fonction endothéliale, suggérant que ce cofacteur endogène de la eNOS est oxydé et inactivé par le ONOO-. En absence de BH<sub>4</sub>, la eNOS découplée contribue à la synthèse de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> (*Milstien et Katusic, 1999*). Ainsi, dans l'HVG, la neutralisation du NO• par le •O<sub>2</sub><sup>-</sup> et la diminution de sa synthèse expliquent la diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium. Finalement, l'amélioration de la fonction endothéliale par un supplément antioxydant avec la SOD et la CAT confirme l'augmentation du stress oxydatif dans l'HVG (*Malo et al., 2003*<sup>1</sup>).

## **Insuffisance cardiaque (IC)**

L'IC est un état pathologique résultant d'une incapacité du cœur à assurer un débit adéquat afin de subvenir aux demandes métaboliques des tissus à une pression de

remplissage normale (*Braunwald E, 1997*). L'IC représente un point de convergence de plusieurs processus pathologiques, principalement de l'hypertension et de la maladie ischémique (*Vasan et Levy, 1996*). En présence d'un trouble primaire de la contractilité cardiaque et/ou d'une charge excessive du ventricule, le cœur dépend de plusieurs mécanismes pour maintenir sa fonction contractile : la vasoconstriction, la rétention d'eau, la stimulation sympathique et l'hypertrophie du myocarde avec ou sans dilatation des chambres cardiaques. Cependant, ces mécanismes compensatoires à court terme ne peuvent compenser les nombreuses modifications qui surviennent sur une plus longue période, tel que l'augmentation de la dépense énergétique et l'apparition d'une dysfonction diastolique: le cœur évolue ainsi de manière défavorable vers une IC (*Braunwald E, 1997*).

Des altérations des relaxations dépendantes de l'endothélium sont présentes au niveau de la micro- et macrocirculation coronaires dans l'IC, démontrées dans une étude sur les artères fémorales canines suite à une surstimulation électrique du ventricule (*Kaiser et al., 1989*). Par contre, cette dysfonction varie selon le lit vasculaire étudié, l'espèce et le temps auquel elle est étudiée après le diagnostic clinique ou l'induction expérimentale de l'IC. De plus, l'impact sur l'altération de la relaxation dépend du mode d'induction de l'IC ainsi que de la région vasculaire étudiée (*Vanhoutte PM, 1996<sup>1</sup>*). L'IC est associée à une réponse neurohumorale et hormonale, caractérisée par une augmentation de la concentration d'agents vasoconstricteurs, tel que l'Ang II, l'ET-1 et la vasopressine, ainsi que par une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique. Il en résulte une augmentation de la résistance périphérique vasculaire et de la post-charge (*Schiffrin EL, 1994*). De plus, un facteur contractant dépendant de la COX est impliqué dans l'augmentation de la vasoconstriction dans l'IC, puisqu'une inhibition de cette enzyme par l'indométhacine augmente la vasorelaxation en réponse à l'ACh chez les humains (*Katz S, 1994*).

Une composante également importante de l'IC est une diminution de la relaxation par la voie de la eNOS. Cette altération est reliée à une diminution de l'expression de la eNOS aux niveaux périphérique et coronaire (*Smith et al., 1996*) et à une diminution de

la biodisponibilité du NO• dû au stress oxydatif (*Arimura et al.*, 2001). Par contre, la libération basale de NO• est préservée et parfois même augmentée chez les patients avec une IC chronique, tel que suggéré par une augmentation des niveaux de nitrates plasmatiques (*Winlay et al.*, 1994). Une augmentation de la iNOS pourrait expliquer la préservation de la production de NO• dans le cœur insuffisant et ses vaisseaux. De fait, une augmentation de l'activité de la iNOS, de son expression protéique et de l'ARNm a été démontrée dans les tissus cardiaques de patients insuffisants (*Drexler et al.*, 1998) ainsi que dans les CE et les CML vasculaires (*Vejlstrup et al.*, 1998). Finalement, une diminution de la réponse vasodilatatrice aux donneurs de NO• est également présente chez les patients avec IC chronique sévère, suggérant une diminution de la réponse des CML à la vasodilatation induite par le GMPc (*Katz S*, 1994).

L'IC, peu importe l'étiologie, est associée à une augmentation du stress oxydatif myocardique, indiquée par une diminution de sa capacité antioxydante (SOD, GPx, CAT), une diminution de l'état d'oxydation-réduction et une augmentation de la peroxydation des lipides (*Dhalla et Singal*, 1994). La dysfonction endothéliale coronaire est également due à une augmentation de la production des ERO dans les CE et/ou les CML, diminuant la biodisponibilité du NO• (*Arimura et al.*, 2001). De fait, le •O<sub>2</sub><sup>-</sup> est impliqué dans la vasoconstriction associée à l'IC, probablement suite à une activation de la NAD(P)H oxydase. Cette dernière serait sollicitée suite à l'activation neurohormonale chronique retrouvée dans cette pathologie, principalement par l'Ang II (*Sorescu et Griending*, 2002). L'augmentation de l'état de stress oxydatif dans l'IC chronique serait également la conséquence d'une hausse de l'activité de l'enzyme prooxydante XO, accompagnée d'une diminution de l'enzyme antioxydante ecSOD (*Landmesser et al.*, 2003).

## **Chapitre Cinquième**

### ***Traitement et approche thérapeutique de la dysfonction endothéliale associée au stress oxydatif***

La dysfonction endothéliale représente une condition potentiellement réversible au stade précoce de plusieurs pathologies cardiovasculaires. Le stress oxydatif, par diminution de l'activité antioxydante endogène et/ou par augmentation des niveaux des ERO, constitue la source de plusieurs modifications néfastes au niveau de l'endothélium, menant ultérieurement à sa dysfonction (*Bonetti et al., 2003*). Ainsi, les interventions thérapeutiques ayant pour cible le stress oxydatif sont importantes pour le traitement de la dysfonction endothéliale et des maladies cardiovasculaires.

## **Inhibition de l'activité prooxydante**

### **Restauration de l'activité physiologique de la eNOS**

Plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire, tels l'HTA et l'hypercholestérolémie, induisent une dysfonction de la voie de la L-arginine (L-arg)-NO•. L'altération de cette voie de synthèse, se manifestant par une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium, est la conséquence d'une augmentation de la production des EDCFs ou d'une perturbation de la biodisponibilité des cofacteurs de la eNOS, la L-arg et la BH<sub>4</sub>. De fait, le découplage de la eNOS, en présence d'un déficit de cofacteurs, mène à la production des ERO aux dépens de celle du NO•, expliquant ainsi la diminution des relaxations vasculaires (*Stuehr et al., 2001*). Plusieurs études expérimentales chez les lapins hypercholestérolémiques (*Cooke et al., 1991*) et athérosclérotiques (*Boger et al., 1997*) ainsi que des études cliniques chez les patients avec IC (*Horning et al., 1998*), HTA (*Lim et al., 2004*) et HTP (*Nagaya et al., 2001*), démontrent qu'un supplément de L-arg améliore les relaxations dépendantes de l'endothélium et inhibe en plus l'agrégation des plaquettes, l'adhésion des monocytes et la prolifération des CML.

La concentration circulante de L-arg chez des sujets sains et chez des patients atteints d'une maladie vasculaire se situe entre 40 et 100 µmol/L (*Jeserich et al., 1992*). Afin d'obtenir 50% de l'activité optimale de la eNOS, une concentration de 3 µmol/L est suffisante, soit de 15 à 30 fois plus faible que la concentration plasmatique circulante

(Pollock *et al.*, 1991). Bien que la concentration endogène soit largement suffisante pour une activité complète de la eNOS, un supplément exogène restaure toutefois la fonction vasodilatatrice, tel que démontré dans des aortes thoraciques de lapins hypercholestérolémiques (Cooke *et al.*, 1991). Cette situation contradictoire peut s'expliquer à l'aide de deux mécanismes. La diméthylarginine asymétrique (ADMA) est un inhibiteur endogène compétitif de la eNOS (Vallance *et al.*, 1992) qui, suite à une légère augmentation de sa concentration plasmatique, joue un rôle dans la pathogenèse de la dysfonction vasculaire et des maladies cardiovasculaires (Böger *et Ron*, 2005). De fait, l'ADMA se lie à la eNOS, inhibant le site de liaison de la L-arg et donc la production ultérieure de NO•. L'action inhibitrice de l'ADMA envers la eNOS est surpassée lors d'un supplément de L-arg, expliquant ainsi la normalisation de la fonction endothéliale suite à une administration exogène de L-arg (Böger *et Ron*, 2005). De l'autre côté, l'enzyme constitutive arginase est impliquée dans la conversion de la L-arg en ornithine et en urée au niveau des CE. Une augmentation de l'activité de cette enzyme, telle que trouvée dans l'I/R, limite la biodisponibilité de la L-arg pour la eNOS, diminuant ainsi les relaxations dépendantes de l'endothélium (Hein *et al.*, 2003).

Des études sur l'aorte et les artères cérébrales et coronaires isolées ont démontré que l'inhibition de la BH<sub>4</sub> cause une dysfonction endothéliale de ces vaisseaux par une génération préférentielle de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> au détriment du NO• (Katusic *et al.*, 2001). Dans la dysfonction endothéliale associée à l'HVG secondaire à un cerclage aortique d'une durée de 60 jours chez le porc, une incubation des artères coronaires épocardiques avec la L-arg ne restaure pas la réponse à la 5-HT et à la BK, alors qu'un supplément d'un analogue de la BH<sub>4</sub> améliore significativement ces relaxations (Malo *et al.*, 2003<sup>1</sup>). Chez les rats spontanément hypertendus (Consentino *et al.*, 1998) et chez les patients diabétiques et atteints d'hypercholestérolémie (Heitzer *et al.*, 2000), l'administration d'un supplément d'analogue de BH<sub>4</sub> (tétrahydrobioptérine dihydrochloride et tétrahydronéoptérine, respectivement) diminue la production de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et elle est accompagnée d'une augmentation de la production nette de NO•.



## Inhibition de l'activité de la NAD(P)H oxydase

La NAD(P)H oxydase constitue la source prédominante des ERO dans la pathogenèse de l'HTA, de la maladie vasculaire associée au diabète, de l'athérosclérose, de l'hypertrophie cardiaque et de l'IC (*Cai et Harrison, 2000*). Le blocage de la formation d'un complexe enzymatique entier par inhibition de l'assemblage des différentes sous-unités, représente un moyen afin de prévenir l'activation de cette enzyme prooxydante. Le peptide antibiotique PR-39 et le peptide chimérique gp91ds-Tat inhibent l'association des sous-unités p47<sup>phox</sup> et gp91<sup>phox</sup>. Ils diminuent ainsi la production de  $\bullet\text{O}_2^-$  au niveau des cœurs de rat suite à un épisode d'I/R (*Ikeda et al., 2001*) et des aortes de souris hypertendue suite à une injection d'Ang II (*Rey et al., 2001*). D'un autre côté, l'apocinine a démontré ses propriétés antioxydantes lorsqu'administrée oralement chez des rats hypertendus (*Beswick et al., 2001*) et l'aminoéthyl benzènesulfono fluorure (AEBSF) inhibe la liaison du cytochrome b558 à la sous-unité p47<sup>phox</sup> (*Diatchuk et al., 1997*).

L'Ang II, suite à sa liaison aux récepteurs AT<sub>1</sub>, représente le principal activateur de la NAD(P)H oxydase et elle augmente l'expression de certaines sous-unités de cette enzyme (*Touyz et al., 2002*). Dans l'aorte de rats devenus hypertendus par l'administration chronique d'Ang II, de grandes quantités de  $\bullet\text{O}_2^-$  sont produites suite à une augmentation de l'activité de la NAD(P)H oxydase et ceci se manifeste par une atteinte des relaxations dépendantes de l'endothélium (*Rajagopalan et al., 1996*). Ainsi, les inhibiteurs de l'ECA et les antagonistes du récepteur AT<sub>1</sub> représentent deux outils pharmacologiques visant à empêcher l'activation de la NAD(P)H oxydase.

Les inhibiteurs de l'ECA sont largement utilisés dans le traitement de l'IC et de l'HTA, et ce pas seulement pour leurs propriétés de diminution de la pression sanguine (*Mancini GB, 2000*). Tout d'abord, l'inhibition de cette enzyme empêche la production de l'ET-1 par les CE via la voie de l'Ang II (*Lüscher et al., 1996*) et inhibe la dégradation de la BK (*Dzau VJ, 1989<sup>1</sup>; Caldwell et al., 1976*). Il se produit ainsi une augmentation de la biodisponibilité du NO $\bullet$  et une amélioration des relaxations dépendantes de

l'endothélium. L'administration de quinapril, un inhibiteur de l'ECA, limite le développement de l'HVG dans un modèle d'augmentation de la post-charge chez le cobaye, améliore la fonction endothéliale coronaire et augmente la biodisponibilité du NO• par inhibition de la synthèse des ERO (*Bell et al.*, 2001). Par ailleurs, les inhibiteurs de l'ECA captopril et zofenapril possèdent des propriétés antioxydantes directes en neutralisant les ERO, tels le •O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Et le •OH (*Chopra et al.*, 1990).

Dans un modèle d'IC chronique chez le rat, un traitement avec l'inhibiteur trandolapril améliore également les relaxations dépendantes de l'endothélium au niveau de l'aorte et normalise l'expression de la eNOS, sans toutefois diminuer la formation aortique de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> (*Schäfer et al.*, 2004). L'échec de la capacité de cet inhibiteur à diminuer le stress oxydatif peut s'expliquer par le fait que, dans ce modèle, la formation de l'Ang II repose sur une source indépendante de l'ECA. De plus, la structure de l'inhibiteur ne contient pas de groupement sulfhydryl qui est impliqué dans la neutralisation directe des ERO (*Chopra et al.*, 1990). Ainsi, cet inhibiteur ne possède ni la capacité de diminuer la production, ni d'augmenter la neutralisation des ERO.

L'inhibition de l'accès de l'Ang II par un antagoniste des récepteurs AT<sub>1</sub> améliore la fonction endothéliale en restaurant les relaxations dépendantes de l'endothélium. Ceci survient par une diminution de l'expression des sous-unités de la NAD(P)H oxydase et, par conséquent, par une diminution du stress oxydatif. Cette diminution de l'expression enzymatique est démontrée chez des patients hypercholestérolémiques suite à une administration de candesartan (*Wassmann et al.*, 2002) au niveau des CE des artères mammaires des patients atteints de maladies coronariennes (*Rueckschloss et al.*, 2002) et au niveau de l'aorte de rats atteints d'une IC suite à l'administration d'irbesartan (*Schäfer et al.*, 2004).

### **Inhibition de l'activité de la cyclooxygénase et de la xanthine oxydase**

Un traitement de longue durée avec l'acide acétylsalicylique (AAS), un anti-inflammatoire et un inhibiteur de la COX, réduit la production de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> d'une manière

dépendante de la concentration. Ceci a été démontré au niveau de l'aorte et des CML aortiques en culture de rats normotendus et spontanément hypertendus (*Wu et al.*, 2002) suite à la diminution de l'activité de la NAD(P)H oxydase tissulaire. Au niveau *ex vivo*, l'amélioration des relaxations dépendantes de l'endothélium par stimulation à l'ACh, suite à l'administration d'AAS, s'explique par une diminution de la concentration des prostanoïdes vasoconstricteurs ainsi que par une diminution du stress oxydatif. Les effets bénéfiques de l'AAS au niveau de la dysfonction endothéliale ne peuvent donc être attribués seulement à son activité anti-inflammatoire et inhibitrice de la COX mais également à son activité inhibitrice de l'activité de la NAD(P)H oxydase (*Wu et al.*, 2002).

L'allopurinol, un inhibiteur de la XO, améliore la fonction endothéliale chez les patients avec IC chronique et il diminue les niveaux de stress oxydatif (*Farquharson et al.*, 2000). Ce même effet bénéfique a été démontré chez les patients diabétiques de type II avec une hypertension modérée (*Butler et al.*, 2000). L'oxypurinol, un autre inhibiteur de la XO, améliore également les relaxations dépendantes de l'endothélium chez des sujets hypercholestérolémiques sans toutefois les normaliser suggérant que d'autres sources des ERO sont impliquées dans cette pathologie (*Cardillo et al.*, 1997).

## **Augmentation de l'activité antioxydante**

### **Supplément d'antioxydants endogènes (SOD, CAT et GPx)**

Les stratégies visant à diminuer le stress oxydatif par une augmentation des niveaux de Cu/Zn SOD se sont montrées décevantes, probablement en raison de l'incapacité des antioxydants à rejoindre le compartiment cellulaire hôte qui génère les ERO. Par contre, de nombreux mimétiques de la SOD possèdent la capacité de traverser la membrane cellulaire, de diminuer le stress oxydatif et d'améliorer la fonction endothéliale (*Fontana et al.*, 1999). EUK-8 et Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetraméthylpipéridinyloxy), deux mimétiques stables de la SOD, sont des neutralisateurs de  $\bullet\text{O}_2^-$  et ils réduisent les dommages causés par le  $\bullet\text{O}_2^-$  au cours de l'I/R (*Xu et al.*, 2004 ; *Schnackenberg et al.*, 1998). Le Tempol renverse également la dysfonction endothéliale au niveau des aortes de rat diabétique par son pouvoir antioxydant (*Haj-Yehia et al.*,

1999). Le mimétique de la MnSOD, le M40403, renverse la dysfonction endothéliale dans les aortes de rat ApoE -/- en supprimant de façon significative la quantité de  $\bullet\text{O}_2^-$ , ce qui améliore la vasodilatation dépendante de l'endothélium à un niveau comparable aux anneaux témoins (*Jiang et al.*, 2003).

Dans un modèle porcin d'HVG secondaire à un cerclage aortique d'une durée de 60 jours, une incubation des artères coronaires épiscopardiques avec les antioxydants SOD et CAT améliore les relaxations dépendantes de l'endothélium (*Malo et al.*, 2003<sup>1</sup>). La même combinaison améliore les relaxations des artères pulmonaires bovines soumises à une greffe aorto-pulmonaire suite à une stimulation avec le calcium ionophore A-23187 (*Steinhorn et al.*, 2001). L'administration seule de la CAT au cours de la période hypoxique d'une hypoxie/réoxygénation protège les cellules cardiaques contre le dommage dû au  $\text{H}_2\text{O}_2$  (*Myers et al.*, 1985). La thérapie génique, suite à un transfert de la CAT par un adénovirus, diminue le stress oxydatif ainsi que la mort cellulaire des CE humaines de veine ombilicale comparativement aux témoins lors d'une exposition au  $\text{H}_2\text{O}_2$  (*Erzurum et al.*, 1993).

La surexpression de la GPx restaure le phénotype normal des CE lors d'un état d'hyperhomocystéinémie qui est caractérisé par une diminution de l'expression de l'enzyme GPx. De fait, la transfection de GPx dans les CE aortiques bovines à l'aide d'un adénovirus diminue la concentration de  $\bullet\text{O}_2^-$ , améliorant ainsi la biodisponibilité du  $\text{NO}\bullet$  et les relaxations dépendantes de l'endothélium (*Weiss et al.*, 2001).

### **Vitamines C et E**

La vitamine C endogène, ou acide ascorbique, est localisée dans les compartiments cytoplasmiques et mitochondriaux. Son administration exogène augmente l'activité de la eNOS et la production subséquente de  $\text{NO}\bullet$ , elle neutralise les ERO dans un modèle de SHR (*Newaz et al.*, 1999) et elle diminue l'activité de la NAD(P)H oxydase dans les aortes de rat (*Ülker et al.*, 2003). De plus, un traitement à long terme de souris ApoE -/- avec l'acide ascorbique résulte en une diminution des concentrations de  $\text{BH}_2$  et

en une amélioration du ratio  $BH_4/BH_2$  (D'Uscio et al., 2003). Chez les sujets hypertendus, une perfusion intra-artérielle d'acide ascorbique améliore les relaxations dépendantes de l'endothélium au niveau périphérique et des artères coronaires (Taddei et al., 1998).

La vitamine E, ou  $\alpha$ -tocophérol, est un antioxydant endogène lipophile, présent dans les LDL ainsi que dans les membranes cellulaires (Burton et Ingold, 1989). Elle possède une capacité de neutralisation du  $\cdot O_2^-$  et de diminution de la production du  $H_2O_2$  (Leibler DC, 1993). Un supplément diététique administré à des modèles expérimentaux d'hypertension, tels les SHR, diminue la peroxydation des lipides dans le plasma et les vaisseaux et améliore le statut antioxydant total (Newaz et al., 1999). Un supplément de vitamine E améliore également la fonction endothéliale au niveau de la circulation de l'avant-bras de patients diabétiques, hypercholestérolémiques et atteints d'une maladie cardiovasculaire (Britten et al., 1999). De plus, une exposition de 24 heures à la vitamine E d'aortes de rats augmente l'activité de la eNOS et atténue celle de la NAD(P)H oxydase (Ülker et al., 2003). Par contre, l'administration de la vitamine E seule est potentiellement néfaste puisqu'elle peut être oxydée en radical tocophéroxyl, un radical qui augmente la peroxydation des lipides (Landmesser et Harrison, 2001). Ainsi, la co-administration de la vitamine E avec un second antioxydant qui empêchera cette conversion, telle la vitamine C, constitue une alternative logique.

Dans un modèle d'hypertension chez le rat, la combinaison des vitamines C et E améliore les relaxations dépendantes de l'endothélium suite à une diminution du stress oxydatif vasculaire. Cette amélioration du potentiel redox survient suite à une diminution de l'activité de la NAD(P)H oxydase concomitante à une augmentation de l'activité antioxydante de la SOD (Chen et al., 2001). De plus, la co-administration des deux vitamines stimule l'activité de la eNOS par une augmentation intracellulaire de la  $BH_4$ , favorisant ainsi la synthèse du  $NO\cdot$  (Chen et al., 2001). Malgré les évidences démontrant les effets antioxydants des vitamines C et E chez les animaux et chez l'homme, des études cliniques randomisées ont produit des résultats décevants. En effet, les études « the Heart Outcomes Prevention Evaluation » (Yusuf et al., 2000), « the Heart Protection

Study » (*Heart Protection Study Collaborative Group*, 2002) et « the Primary Prevention Project » (*Collaborative Group of the Primary Prevention Project*, 2001) n'ont démontré aucun effet bénéfique de l'administration des vitamines C et E chez les patients atteints d'une maladie cardiovasculaire.

### **Autres approches thérapeutiques**

Des études épidémiologiques suggèrent qu'un traitement hormonal aux œstrogènes réduit la mortalité et la morbidité associées aux maladies cardiovasculaires. De fait, l'administration d'estrogène chez les femmes ménopausées améliore la fonction endothéliale vasodilatatrice des artères coronaires de résistance et épicaudiques (*Giligan et al.*, 1994). Plusieurs études animales ont également démontré des effets favorables des œstrogènes au niveau du système cardiovasculaire (*Huang et al.*, 2000). Cependant, le mécanisme bénéfique impliqué demeure controversé : certains voient la diminution de la production de  $\bullet\text{O}_2^-$  comme cause première (*Barbakanne et al.*, 1999) alors que d'autres supportent l'augmentation de l'expression de la eNOS (*Huang et al.*, 2000). Par ailleurs, contrairement à ces résultats, une étude clinique randomisée récemment publiée (Heart and Estrogen Progesterone Replacement Study) n'a démontré aucun effet cardiovasculaire bénéfique pour le supplément hormonal d'estrogène chez les femmes ménopausées (*Hulley et al.*, 1989).

L'administration intra-artérielle de NAC améliore les relaxations dépendantes de l'endothélium d'artères coronaires et périphériques de patients athérosclérotiques (*Andrews et al.*, 2001). Cette amélioration s'explique par une diminution du stress oxydatif suite 1) à une élimination directe des radicaux hydroxyls (*Andrews et al.*, 2001) et 2) à une diminution des niveaux plasmatiques d'homocystéine (*Wiklund et al.*, 1996), un acide aminé qui induit une exacerbation du stress oxydatif lorsqu'il est surexprimé (*Sochman J.*, 2002). D'un autre côté, le glutathion réduit cytosolique neutralise les radicaux libres et détoxifie les ERO produits par le métabolisme oxydatif normal. Dans un modèle expérimental d'athérosclérose, les niveaux tissulaires de glutathion réduits au niveau de l'aorte thoracique de lapin sont diminués, rendant la paroi vasculaire plus

susceptible à une atteinte par le stress oxydatif (*Ma et al.*, 1997). L'OCT (acide L-2-oxothiazolidine-4-carboxilique) est un agent qui augmente les concentrations intracellulaires vasculaires de GSH et qui favorise la production et/ou la biodisponibilité du NO• dans les artères brachiales de patients atteints d'athérosclérose (*Vita et al.*, 1998).

Le carvedilol, un bloqueur non-spécifique des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, constitue un puissant antioxydant qui possède des propriétés de neutralisation des ERO et qui est utilisé dans le traitement de l'hypertension, de l'angine et de l'IC (*Ruffolo et Feuerstein*, 1997). La lacidipine, le plus puissant des antagonistes des canaux calciques, possède également des capacités antioxydantes. Ceci a été démontré dans un modèle de CE humaines de veine ombilicale en culture où l'antagoniste diminuait la production des ERO induite par les LDL oxydées (*Cominacini et al.*, 1998). L'acide urique est aussi un antioxydant, par sa capacité de neutraliser le ONOO- et d'améliorer les relaxations dépendantes de l'endothélium suite à une stimulation par l'ACh chez les souris ApoE -/- (*Lauersen et al.*, 2001). L'acide urique a également fait ses preuves chez les patients avec une hypercholestérolémie familiale en améliorant la fonction endothéliale suite à son administration aiguë ou chronique (*Verhaar et al.*, 1998). Dans un modèle d'IC secondaire à la ligature d'une coronaire chez le rat, un antagoniste sélectif des récepteurs ET<sub>A</sub> améliore les relaxations dépendantes de l'endothélium en diminuant l'activité de la rénine et la formation subséquente de  $\bullet\text{O}_2^-$  (*Bauersachs et al.*, 2000).

## Statines

Les statines sont de puissants inhibiteurs d'une étape limitante de conversion d'un intermédiaire dans le processus de synthèse du cholestérol, soit le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) en mévalonate. Plusieurs études cliniques ont démontré que l'inhibition de la réductase de HMG-CoA par les statines diminue considérablement l'incidence des événements cardiovasculaires chez les individus atteints d'hypercholestérolémie (*4S*, 1994). D'autres études ont démontré une normalisation de la fonction endothéliale suite à l'administration des statines et ce, précocément et indépendamment de la diminution des niveaux sériques de cholestérol. À

titre d'exemple, une amélioration de la fonction endothéliale survient 3 heures suite à un bolus de cérivastatine chez des patients normocholestérolémiques alors qu'il n'y a à ce moment aucune variation des niveaux de cholestérol (*Omori et al.*, 2002).

Les statines possèdent plusieurs effets pléiotropiques au niveau de la fonction endothéliale. En premier lieu, ces inhibiteurs de la HMG-CoA réductase augmentent la production de NO• par une stimulation et une régulation positive de la eNOS. Cette régulation de la eNOS se fait par une prolongation de la demi-vie de l'ARNm plutôt que par une augmentation de la transcription génique (*Laufs et Liao*, 1998). De plus, l'atorvastatine induit une diminution des niveaux de CaV-1, augmentant ainsi l'activation de la eNOS et la production de NO• (*Feron et al.*, 2001). Finalement, les statines inhibent l'expression de l'ET-1 par une inhibition de l'expression de l'ARNm de la pré-pro-ET-1, tel que démontré par l'action de la simvastatine au niveau des CE aortiques bovines (*Hernandez-Perera et al.*, 1998).

L'effet antioxydant est donc relié à un de ces trois mécanismes par lesquels les statines améliorent la fonction endothéliale. Le métabolite hydroxy de l'atorvastatine constitue la seule molécule de toutes les statines qui possède la capacité de neutraliser directement les ERO par un mécanisme de protonation (*Preston et al.*, 2004). Les autres statines ont un impact sur la diminution de la production ou de la biodisponibilité des ERO, en diminuant l'activité prooxydante ou en augmentant le statut antioxydant. De fait, l'atorvastatine atténue la production de radicaux libres induits par l'Ang II au niveau des CML en modulant négativement l'expression du récepteur AT<sub>1</sub> (*Wassmann et al.*, 2001). De plus, cette statine diminue l'expression de l'ARNm des sous-unités p22<sup>phox</sup> et nox1 de la NAD(P)H oxydase au niveau des CML d'aorte de rats témoins et spontanément hypertendus (*Wassmann et al.*, 2002<sup>1</sup>). Plusieurs autres statines ont montré un impact négatif sur l'assemblage et/ou l'activité de la NAD(P)H oxydase : pravastatine < cérivastatine < lovastatine < fluvastatine < simvastatine (*Delbosch et al.*, 2002). Du côté des enzymes antioxydantes, l'atorvastatine augmente l'expression protéinique et de l'ARNm de la CAT dans les aortes d'un modèle SHR, alors que l'expression de la SOD et de la GPx demeurent inchangées (*Wassmann et al.*, 2002<sup>1</sup>).



En plus de diminuer l'oxydation des lipides par une diminution de l'expression des sous-unités et de l'assemblage de la NAD(P)H oxydase, les statines diminuent les niveaux sériques de LDL disponibles pour l'oxydation (*Preston et al.*, 2004). Dans un modèle d'hypercholestérolémie chez le lapin, la fluvastatine administrée à une dose insuffisante pour diminuer les niveaux plasmatiques de cholestérol a tout de même induit une diminution de la susceptibilité des LDL à être oxydées *ex vivo* par le cuivre (*Rikitake et al.*, 2001).

## Probucol

Le probucol (4,4'-isopropylidenedithio-bis(2,6-di-*tert*-butylphenol)) est un antioxydant synthétique mis sur le marché dans les années 60 par la compagnie Dow Chemical Co (Figure 9). Il possède une structure qui partage peu de ressemblance avec les autres agents hypolipémians mais qui ressemble à l'hydroxytoluène butylée, un antioxydant grandement utilisé dans les suppléments alimentaires (*Tardif et Bourassa*, 2000). Le probucol a largement été étudié pour ses propriétés au niveau de l'inhibition de la resténose suite à une angioplastie chez l'homme à l'aide d'un ballonnet (*Tardif et al.*, 1997). Son mécanisme d'action repose sur l'induction d'un remodelage positif plutôt que sur l'inhibition de l'hyperplasie néointimale. Plus précisément, le probucol diminue significativement la perte du gain de la lumière du vaisseau suite à l'angioplastie par une amélioration de l'élargissement compensatoire du vaisseau, tel que démontré par l'élargissement de l'aire de la membrane élastique externe plutôt que par une inhibition de la prolifération des CML au niveau de l'intima (*Côté et al.*, 1999). Le probucol a un effet positif sur la resténose lorsque son administration est débuté avant l'angioplastie, tel que démontré dans l'étude Multivitamins and Probucol suite à un traitement débutant 30 jours avant l'intervention et pour une durée de 6 mois (*Tardif et al.*, 1997). Par contre, une seconde étude clinique a démontré qu'une administration initiée 3 jours avant la chirurgie n'apporte aucun effet bénéfique comparativement au groupe placebo (*Kim et al.*, 2002). Ceci peut être expliqué par l'accumulation lente du probucol au niveau des tissus, nécessitant une période d'administration pré-opératoire plus longue que 72 heures afin d'avoir une protection efficace contre les effets néfastes immédiats d'une angioplastie (*Reaven et al.*, 1992).

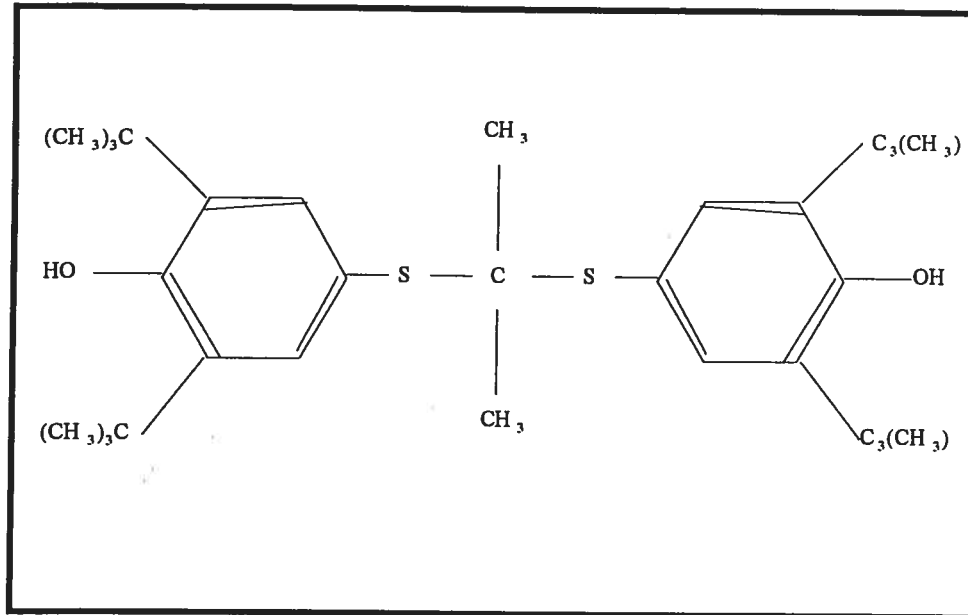


Figure 9. Structure moléculaire du probucol

Le probucol possède un effet hypolipémiant, tel que démontré par sa capacité de diminuer les niveaux circulants de LDL (par une modification des caractéristiques des LDL, induisant une augmentation de leur catabolisme), de HDL (lipoprotéines de haute densité ; augmentation du transport inverse du cholestérol des tissus périphériques au foie), de cholestérol total et des triglycérides (*Kim et al.*, 2002 ; *Reaven et al.*, 1992 ; *Kakuta et al.*, 1994 ; *Post et al.*, 1994 ; *Schneider et al.*, 1993 ; *Daida et al.*, 2000). Par contre, cette capacité n'est guère impliquée dans la modulation favorable du vaisseau suite à l'angioplastie (*Kim et al.*, 2002), ni dans l'inhibition de la progression de l'athérosclérose chez les lapins Watanabe génétiquement hypercholestérolémiques (*Berk et al.*, 1989). De fait, le probucol agit à ces deux niveaux par sa capacité de ré-endothélialisation (*Yokoyama et al.*, 2004), d'inhibition de la sécrétion de l'interleukine-1 par les macrophages (*Anderson et al.*, 1995) et surtout par ses propriétés antioxydantes (*Rajagopalan et al.*, 1996<sup>1</sup>) telles que la prévention de l'activation des macrophages (*Anderson et al.*, 1995) et des métalloprotéinases (*Yamamoto et al.*, 1988), de l'oxydation des LDL (*Chang et al.*, 1995) et du développement d'une dysfonction endothéliale (*Steinberg D.*, 1986).

Le probucol possède un impact antioxydant au niveau cardiaque. De fait, un traitement de 1 mg/kg/d pour 80 jours entraîne une amélioration de plusieurs processus régulés par le potentiel redox dans un modèle d'IC suite à la ligature de l'artère coronaire antérieure gauche chez le rat. Ces effets incluent une diminution partielle de la fibrose et de l'apoptose cardiaques, une inhibition de l'hypertrophie des cardiomyocytes, une diminution de la dilatation ventriculaire et une amélioration du remodelage du ventricule gauche (Sia *et al.*, 2002). Chez la souris avec une double mutation nulle du récepteur neutralisateur des HDL et de l'apolipoprotéine E, l'administration quotidienne d'une diète faible en gras supplémentée de probucol (0,5% du poids de l'animal) diminue la fibrose cardiaque, l'épaisseur de la paroi libre et la masse du ventricule gauche (Braun *et al.*, 2003). Dans un modèle d'I/R chez le rat, le traitement antioxydant quotidien de 1% du poids de l'animal pour un 1 mois diminue la sévérité de la dysfonction diastolique du ventricule gauche due aux ERO au cours de la reperfusion (Rabkin *et al.*, 2003). Finalement, l'amélioration du remodelage et de la fonction du ventricule gauche est également observée dans un modèle canin de stimulation électrique ventriculaire (240 battements par minute) lors d'une administration de 100 mg/kg/jr pour une période de 4 semaines (Nakamura *et al.*, 2002).

L'administration du probucol chez le lapin hypercholestérolémique améliore les relaxations aortiques dépendantes de l'endothélium suite à une stimulation à l'ACh et il est sans effet chez les témoins. Cette restauration de la fonction endothéliale résulte d'une neutralisation directe du  $\bullet\text{O}_2^-$  par les groupements phénols du probucol (Figure 9) et d'une augmentation conséquente de la biodisponibilité du  $\text{NO}\bullet$  pour les CML (Inoue *et al.*, 1998). Cette neutralisation du  $\bullet\text{O}_2^-$  par le probucol est aussi observée *in vitro* dans les cardiomyocytes hypertrophiés de rats néonataux (Nakagami *et al.*, 2003). Le probucol préserve également la fonction endothéliale par une diminution des niveaux de l'inhibiteur endogène de la eNOS, l'ADMA (Jiang *et al.*, 2002), sans influencer la sécrétion basale d'ET-1 (Chen *et al.*, 1998).

Du côté des enzymes prooxydantes endogènes, le probucol module négativement l'expression de la sous-unité  $\text{p}22^{\text{phox}}$  de la NAD(P)H oxydase des CML aortiques des

lapins hypercholestérolémiques (*Itoh et al., 2002*). Dans ce même modèle, Itoh et al (2002) ont démontré que l'expression de la eNOS était diminuée de 90 % en présence d'hypercholestérolémie et qu'un traitement à l'aide du probucol restaure complètement l'expression de l'enzyme (*Itoh et al., 2002*). Du côté des enzymes antioxydantes endogènes, le probucol favorise une diminution du stress oxydatif et une amélioration de la fonction endothéliale. Dans la cardiomyopathie du rat induite suite à l'administration de l'adryamicine, le probucol augmente l'activité de la SOD et de la GPx myocardiales sans modifier celle de la CAT (*Li et al., 2000*). De plus, dans un modèle d'IC induite par une injection d'isoprotérénol chez le rat, le probucol augmente l'expression myocardiale de la GPx sans toutefois modifier la SOD (*El-Demerdash et al., 2005*).

## Hypothèses et buts

L'HVG représente un mécanisme d'adaptation par lequel le cœur, indépendamment de l'étiologie, normalise temporairement la pression au niveau de ses parois afin de préserver sa fonction ventriculaire. Malgré cette compensation, il est reconnu que les patients avec HVG ont un mauvais pronostic puisqu'ils ont une plus grande susceptibilité aux événements ischémiques, due majoritairement à une dysfonction endothéliale coronaire (*Vassanelli et al.*, 1993). Tel que démontré dans plusieurs modèles expérimentaux et cliniques d'HVG, des altérations existent au niveau des relaxations cardiaques et vasculaires dépendantes de l'endothélium alors que la réponse aux donneurs de NO• est préservée (*MacCarthy et Shah*, 2003). Le stress oxydatif, principalement par l'action de l'anion superoxyde, joue un rôle majeur dans le développement de l'hypertrophie et dans la dysfonction endothéliale associée des artères coronaires épocardiques (*Cai et al.*, 2003).

Au cours des cinq dernières années, nous avons développé et documenté un modèle porcin d'HVG secondaire à un cerclage aortique d'une durée de deux mois. Une diminution de la production et de la biodisponibilité vasculaire du NO• est associée à ce modèle d'HVG, tel que démontrée par une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium des coronaires épocardiques (*Malo et al.*, 2003). Cette dysfonction est accompagnée d'une augmentation des niveaux de ONOO- et est améliorée par l'administration exogène d'un analogue du BH<sub>4</sub> et des antioxydants SOD et catalase (*Malo et al.*, 2003<sup>1</sup>). Ces observations impliquent qu'il y a une diminution de l'activité antioxydante endogène et/ou une augmentation des niveaux des ERO. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un traitement antioxydant améliorerait la fonction vasculaire épocardique ainsi que l'HVG.

Les objectifs de cette présente étude étaient d'évaluer dans un premier temps les modifications morphologiques et histologiques associées au stress oxydatif et au niveau cardiaque et d'étudier les variations de la réactivité et de la fonction endothéliale

vasculaire dans un modèle porcin d'HVG. Le deuxième objectif était d'évaluer l'impact d'un traitement antioxydant avec le probucol sur les modifications du ventricule gauche et la fonction endothéliale des artères coronaires épigardiques.

## **Contribution Originale**

## Accord des coauteurs

### 1. Identification de l'étudiant

Marie-Claude Aubin,  
2-520-1-0, Maîtrise en Pharmacologie

### 2. Description de l'article

*Auteurs* : Marie-Claude Aubin, Michel Carrier, Yan Fen Shi, Jean-Claude Tardif, Louis P Perrault.

*Titre* : Role of probucol on endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries associated with left ventricular hypertrophy.

*Revue à laquelle est soumis l'article* : Circulation

*Date de soumission* : 26 septembre 2005

*Statut de l'article* : soumis

### 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 **Marie-Claude Aubin** incluse cet article dans **son mémoire de maîtrise** qui a pour titre **Effet du probucol sur la dysfonction endothéliale des artères coronaires épicaudiques en présence d'une hypertrophie ventriculaire gauche dans un modèle porcin.**

Michel Carrier

Coauteur



Date

Yan Fen Shi

Coauteur



Date



Jean-Claude Tardif

Coauteur

26/9/2005  
date

Louis P. Perrault

Coauteur

26/11/05  
date



2005-09-27 10:58

De: circ@bu.edu

Pour: [REDACTED]

cc: [REDACTED]

Objet: CIRCULATIONAHA/2005/591677 Acknowledgment of Manuscript

MS ID#: CIRCULATIONAHA/2005/591677

MS TITLE: Role of Probucol on Endothelial Dysfunction of Epicardial Coronary Arteries Associated With Left Ventricular Hypertrophy

Dear Dr. Perrault:

Thank you for submitting your manuscript to Circulation. If suitable for review, it will be sent to expert reviewers. If thought unsuitable, we will notify you immediately.

Please note, your paper is considered on the understanding that it has not been submitted to another journal for publication and will not be submitted elsewhere unless it is rejected. To follow the progress of your paper, please go to:

<http://submit-circ.ahajournals.org>

and log in to your Author Area.

Sincerely yours,

Editorial Office  
Circulation

—

# Role of probucol on endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries associated with left ventricular hypertrophy

Marie-Claude Aubin<sup>a,c</sup>, Michel Carrier<sup>a,b</sup>, Yan Fen Shi<sup>a</sup>, Jean-Claude Tardif,<sup>a,d</sup> Louis P. Perrault<sup>a,b,c,d</sup>

*Research Center<sup>a</sup>, Department of Surgery<sup>b</sup>; Department of Pharmacology<sup>c</sup>, Department of Medicine<sup>d</sup>; Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada*

**Short Title:** Endothelial dysfunction in LVH

---

Address correspondence and reprint requests to Dr L.P. Perrault, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street East, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330 (3471); Fax: (514) 376-1355; [REDACTED]  
[REDACTED]

## ABSTRACT

**Background:** Left ventricular hypertrophy (LVH) affects approximately 30% of patients above 60 and increases the risk of cardiac events. Oxidative stress, mainly by the action of the superoxide anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), plays an important role in the development of the cardiac and vascular endothelial dysfunction associated with LVH. Thus, therapeutic intervention with antioxidant drugs, such as probucol, may be beneficial in order to limit or reverse the endothelial dysfunction associated with the development of LVH.

**Methods :** LVH was induced by performing an aortic banding on two month old swine. The control group (group 1) was submitted to thoracotomy without aortic banding whereas untreated aortic banded group (group 2) received a placebo for 60 days. The third group received probucol (1000 mg/day orally) from the day of the banding for 60 days. The fourth and fifth groups received probucol from day 30 and 60 after banding respectively, for 30 days. The degree of LVH was assessed by serial echocardiographic studies. Vascular reactivity studies were performed in standard organ chamber experiments, by constructing concentration-response curves to serotonin and to bradykinin. In vitro endothelial function was evaluated by nitrites/nitrates and cGMP quantification. In order to quantify and qualify oxidative stress, lipid peroxidation, superoxide dismutase antioxidant activity as well as angiotensin II levels were assessed.

**Results:** Following 60 days of aortic banding, a significant increase in left ventricle/body weight ratio was observed in the untreated group, confirming the development of LVH ( $p < 0.05$ ). Compared to the untreated group, a significant decrease of LVH was observed in the three groups treated with probucol ( $p < 0.05$ ). Moreover, histological studies demonstrated a significant decrease in left ventricle interstitial fibrosis and in cardiomyocyte hypertrophy in treated groups comparatively to the untreated aortic banded group ( $p < 0.05$ ). Dose-response curves from rings of epicardial coronary arteries of the three probucol groups showed a significant improvement in endothelium-dependent relaxations mediated by Gi and Gq protein pathways ( $p < 0.05$  for both agonists vs untreated aortic banded group). This improvement was associated with increased NO $\bullet$  bioavailability. Probuco treatment decreased the levels of circulating Ang II and hydroperoxides in the three treated groups ( $p < 0.05$  vs untreated group). There was no

significant variation in vascular antioxidant superoxide dismutase activity between the untreated and treated groups.

**Conclusion:** In a porcine model of LVH secondary to aortic banding, the antioxidant probucol limited the development and induced the regression of LVH and the associated endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries by decreasing oxidative stress and by increasing NO• bioavailability.

**Key words :** Left ventricular hypertrophy — Coronary artery — Endothelial dysfunction — Oxidative stress — Probuco

## INTRODUCTION

Increased cardiac afterload caused by aortic stenosis and systemic arterial hypertension induces several molecular and cellular events leading to adaptative left ventricular hypertrophy (LVH) (Fareh *et al.*, 1996). LVH affects 23% of men and 33% of women over the age of 59 years (Savage *et al.*, 1987) and is associated with adverse cardiovascular outcomes (Brown *et al.*, 2000). Alterations of endothelium-dependent relaxations induced by acetylcholine, adenosine and substance P have been demonstrated in LVH in clinical and experimental studies (Grieve *et al.*, 2001; Lüscher and Noll, 1994; Treasure *et al.*, 1993). The decrease of endothelium-dependent relaxations mediated by nitric oxide (NO•) in animal models of LVH has been attributed to a decreased synthesis and/or bioavailability of NO• and to the concomitant release of endothelium-derived contracting factors, such as ET-1 and vasoconstrictor prostanoids (Wattanapitayakul *et al.*, 2000). Oxidative stress, mainly by the action of superoxide anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), also plays an important role in the development of endothelial dysfunction in LVH (Cai and Harrison, 2000) and on the cardiomyocyte hypertrophy (Nakagami *et al.*, 2003).

We have previously characterized the endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in LVH secondary to aortic banding in a porcine model (Malo *et al.*, 2003<sup>1</sup>). Alterations of signaling mechanisms in endothelial cells mainly involve relaxations mediated through Gi proteins and, to a lesser degree, by Gq proteins. These observations, combined with a decreased basal level of cyclic guanosine-3'5'-monophosphate (cGMP) in the coronary wall and a reduction in the plasma nitrite/nitrate ratio, reflect the decreased bioavailability of NO• in this model, due to a decreased production and/or increased destruction or scavenging (Malo *et al.*, 2003<sup>1</sup>). Moreover, in the same model, circulating levels of ET-1 are increased, associated with decreased endothelial ET<sub>B</sub> receptors density, which can explain, in part, the increased vasoconstriction (Desjardins *et al.*, 2005). Finally, plasma concentrations of peroxynitrite (ONOO-) are increased in this model of LVH, confirming the state of increased oxidative stress (Malo *et al.*, 2003<sup>2</sup>).

Acute treatment with the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase has been shown to improve endothelial dysfunction associated to LVH (Malo *et al.*, 2003<sup>2</sup>). This implies that, in this model, endogenous antioxidant activity is insufficient and/or that ROS levels such as  $\bullet\text{O}_2^-$  and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) are increased. Therefore, the aim of the present study was to assess the effect of the chain breaking antioxidant drug probucol on the initiation, progression and reversal of the coronary endothelial dysfunction associated with LVH secondary to aortic banding in a porcine model.

## METHODS

### Experimental groups

Twenty-five 8 week old Landrace male swine, were randomly divided into five experimental groups. The animals from the control group (Group 1) were submitted to the thoracotomy without an aortic banding (n=3). The untreated aortic banded group (Group 2) received a placebo (400 mg/day per os) for 60 days, starting on the day of the surgery (n=3). The first actively treated group (Group 3) was treated with probucol (1000 mg/day orally) (Côté *et al.*, 1999; Yokoyama *et al.*, 2004) from the day of banding for 60 days (n=5). The two other treated groups (Groups 4 and 5 respectively) were started on probucol on days 30 and 60 post-banding respectively, for a 30 day period (n=7 for both) (Table 1). Experiments were performed in compliance with recommendations of the guidelines on the care and use of laboratory animals issued by the Canadian Council on Animal Research and the guidelines of the Animal Care, and the experimental protocol was approved by a local committee.

### Surgical procedure

Swine were anesthetised by an intramuscular injection of a mixture of ketamine (20 mg/kg; Rogarsetic, Toronto, ON) and xylazine (2 mg/kg; Rompun, Cambridge, ON). Artificial ventilation with an oxygen/air mixture was provided throughout the surgical intervention in order to maintain an arterial oxygen saturation of 95% and an anesthesia was induced by isoflurane 1% v/v (Halocarbon Laboratories, NJ, USA). Respiratory control was assured by frequent determinations of arterial blood gases and acidosis was

balanced with 8.4% sodium bicarbonate (Abbott Laboratories, QC, CA). Hair was shaved in the operative field and the skin was disinfected with a surgical scrub and a chlorhexidine 0.5% solution. A catheter was placed in an auricular vein for administration of antibiotics at the beginning of surgery (Excenel 0.06 ml/kg; Pharmacia & Upjohn, Orangeville, ON) and for intravenous fluid infusion during surgery. Arterial cannulation was performed through the right femoral artery for blood pressure analysis and a rectal probe was used for monitoring the temperature.

The chest was entered through a left anterior thoracotomy in the third intercostal space and the aortic banding was performed by gently tying an umbilical tape around the aorta, 3 cm above the coronary ostia, in order to obtain a systolic peak gradient of at least 15 mmHg. The pericardium and chest were closed in multiple layers. An intramuscular injection of an analgesic (Buprenorphine, 0,6 mg/ml; Reckitt Benckiser Healthcare Limited, Dansom Lane, UK) was given at the end of the surgery and the animals were left to recover in temperature-controlled quarters. Swine were treated with the antibiotic Excenel (0.06 ml/kg) for the 2 following days and were fed a standard piglet chow. For the following days, additional doses of analgesic (Buprenorphine, 0,3 mg/ml) were given to animals that had not completely recovered from surgery.

### LVH assessment

#### *Echocardiographic studies*

Swine were sedated (see above) for transthoracic echocardiograms performed before the surgery, for baseline data, and at the end of the treatment, before the sacrifice. A S3 probe (ranging from 1.6-3.2 Mhz) with a standard echocardiographic system (Sonos 5500 Hewlett-Packard, Andover, MA, USA) were used. Ascending aorta dimensions at the banding area, 5 mm both proximal and distal away from the banding were measured in the parasternal long axis view. Continuous Wave Doppler was used in a modified left ventricular apical long axis view to follow the peak velocity and gradient across the banding. A 2-D guided M-mode study of the left ventricle and two-dimensional apical four- and two-chamber views were performed and recorded on videotape for off-line measurements. The thickness of the interventricular septum (IVS) and left ventricular



posterior wall (LVPW) were measured on M-mode at end-diastole using the average of three cardiac cycles. Left ventricular mass was calculated using the following formula: left ventricular mass =  $1.05 [(D + LVPW + IVS)^3 - D^3] - 14$  g, where D represents the left ventricular cavity end-diastolic diameter.

#### *Histological studies*

Following removal of the heart and coronary harvesting, 6 surgical biopsies were taken from the free left ventricle and the septum. They were then fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin and cut in 4  $\mu$ m thick sections for histological documentation of LVH. Each section was selected by an experienced cardiovascular pathologist blinded to the treatment. Cardiomyocyte hypertrophy (cardiomyocytes transversal area: approximately 600 cells/animal, in the septum and the LV free wall) as well as interstitial fibrosis (collagen I content) were determined using HPS and sirius red stain, respectively. Images were taken with a Sony DKC-5000 camera mounted on a BX60 microscope and opened with the program Adobe Photoshop 5.02. Quantification was done with the program Scion Image version 1.63.

#### *Sacrifice and coronary harvesting*

After their respective period of treatment, swine from the five groups were anesthetized using the same approach as described previously. Sacrifice was performed by exsanguination through a median sternotomy. The heart was removed, weighed for heart to body mass ratio and rapidly placed in a modified Krebs-bicarbonate solution (composition in mmol/L: NaCl 118.3, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, EDTA 0.026, Dextrose 11.1; control solution) for harvesting of coronary arteries. The left anterior descending, the left circumflex and right epicardial coronary arteries were dissected free from adherent fat and connective tissue, and were divided into rings 4 mm in length.

#### *Vascular reactivity studies*

Rings were then placed in organ chambers filled with the Krebs-bicarbonate solution (20 ml), maintained at 37°C and oxygenated with a mixture of 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>.

The rings were suspended between two metal stirrups, one connected to an isometric force transducer. Data were recorded on data acquisition software (IOS3, Emka Inc., Paris, France). After 30 minutes of stabilization, tension on rings was progressively increased to the optimal tension of its active length-tension curve (approximately 3,5 g), as determined by measuring the contraction to potassium chloride (KCl; 30 mmol/L) at different levels of stretch. A maximal contraction was determined with KCl (60 mmol/L) and the baths were then washed. Rings were excluded if they failed to contract with potassium chloride (exclusion rate of less than 5%). Afterwards, all studies were performed in the presence of indomethacin ( $10^{-5}$  mol/L; to prevent the endogenous production of prostanoids), propranolol ( $10^{-7}$  mol/L; to prevent the activation of  $\beta$ -adrenergic receptors) and ketanserin ( $10^{-6}$  mol/L; incubated 45 minutes before the addition of serotonin to antagonize smooth muscle cell serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptors). After 45 minutes of stabilization, prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  (range  $2 \times 10^{-6}$  to  $10^{-5}$  mol/L) was added to achieve contraction averaging 50% of the maximal contraction to KCl (60 mmol/L).

#### *Endothelium-dependent relaxations*

The NO mediated-relaxation pathway was studied by constructing concentration-response curves to serotonin (5-HT;  $10^{-10}$  to  $10^{-5}$  mol/L, an agonist binding to endothelial 5-HT<sub>1D</sub> receptors coupled to Gi-proteins) and to bradykinin (BK;  $10^{-12}$  to  $10^{-6}$  mol/L, an agonist binding to endothelial B<sub>2</sub> receptors coupled to Gq-proteins leading to the release of NO and EDHF).

#### *Assessment of endothelial function*

##### *Plasma nitrite and nitrate (NO<sub>x</sub>) levels*

NO• production from eNOS was assessed from NO<sub>x</sub> levels present in plasma samples of aortic banded treated and untreated groups and controls. Blood samples were drawn before sacrifice from swine coronary sinus in EDTA to prevent coagulation and were then centrifuged at 4 000 rpm for 15 minutes at 4°C. The isolated plasma was consequently frozen in liquid nitrogen and kept at -70°C until analysis. Nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) was reduced to NO• using iodide and acetic acid whereas both nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> were reduced using vanadium (III) and hydrochloric acid. A Serviers 280 NO analyzer

(Serviers Instruments Inc., Boulder, CO, USA), combined with the NO• analysis™-liquid program, was used to obtain the nitrite and nitrate concentrations in the different samples.

#### *Coronary artery cyclic GMP levels*

Basal cGMP levels in epicardial coronary arteries of controls and swine submitted to aortic banding, treated and untreated, were measured to assess NO• bioavailability. Following vessels harvesting, a few segments were frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until measurements of cGMP levels. The samples were subsequently pulverized, resuspended in trichloroacetic solution (TCA; 6.25% w/vol) in order to precipitate tissue membranes and centrifuged at 3 000 rpm for 15 min at 4°C. The supernatants were then washed with diethylether to preserve cGMP and eliminate TCA. Finally, the washed supernatants were heat dried with nitrogen to obtain purified cGMP. cGMP levels were measured using a non acetylation enzyme immunoassay (EIA) system based on rabbit anti-cGMP antibody (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Qc, Canada). The levels were adjusted to the quantity of proteins measured in the tissue using the Bradford microassay technique (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

#### *Assessment of oxidative stress*

##### *Plasma angiotensin II levels*

Plasma samples were collected before sacrifice from the coronary sinus and immediately centrifuged at 1,000 x g for 15 min at 4° C. The reversed phase method with columns packed with phenylsilylsilica was performed for plasma sample extraction. Quantitative measurements of angiotensin II were assessed using an <sup>125</sup>I-angiotensin II radioimmunoassay kit (Angiotensin II Radioimmunoassay, ALPCO Diagnostic, Windham, NH, USA).

##### *Plasma lipid hydroperoxide levels*

Plasma samples, drawn from coronary sinus before sacrifice, were mixed 1:1 with the extract reagent saturated with methanol and vortexed. Cold chloroform (1 ml) was added to each tube and the solution was centrifuged at 1,500 x g for 5 min at 0° C. The bottom chloroform layer was carefully removed and used for lipid peroxidation

assessment with a commercial kit (Lipid Hydroperoxide Assay, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA).

### *Vascular SOD*

Epicardial coronary arteries were homogenized in HEPES buffer (20 mM, pH 7.4, containing 1 mM EGTA, 210 mM mannitol and 70 mM sucrose) and centrifuged at 1,500 x g for 5 min at 4°C. The supernatant, containing both cytosolic and mitochondrial Cu/Zn-, extracellular and Mn-SOD, was removed frozen at -80°C until analysis. The activity of the antioxidant enzyme was then assessed with a commercial kit (Superoxide Dismutase Assay, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA).

### *Drugs*

All solutions were prepared daily. 5-hydroxytryptamine creatinine sulfate (serotonin), bradykinin, chloroform, EDTA, indomethacin, ketanserin, probucol, propranolol, prostaglandin F<sub>2α</sub>, mannitol and methanol were purchased from Sigma (Oakville, ON, Canada). EGTA was purchased from MP Biochemicals (Aurora, OH, USA) and sucrose from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ, USA). The placebo was purchased from ODAN Laboratoires Ltée (Montréal, Qc, Canada).

### *Statistical analysis and data interpretation*

Relaxations and contractions are expressed as a percentage of the maximal contraction to prostaglandin F<sub>2α</sub> for each group and presented as mean ± standard error of the mean (SEM). ANOVA studies were performed to compare concentration-response curves. ANOVA studies followed by Dunnet's pairwise comparisons, using the untreated aortic banded group as reference, were used for the comparison of cardiac fibrosis, myocyte hypertrophy, basal production of cGMP, plasma levels of NO<sub>x</sub> and angiotensin II, lipid peroxidation and vascular activity of SOD. A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### LVH assessment

#### Echocardiographic studies

The ratio of aorta dimensions was assessed to determine whether the banding should induce the development of LVH. Aorta diameter at the banding site divided by aorta diameter distal to banding represents a ratio of the decrease in aorta lumen dimension and, indirectly, the increase in afterload. In the untreated aortic banding group, a 40% decrease in the aortic ratio induced the development of LVH 60 days after surgery whereas the control group had no decrease in the ratio ( $p=0.001$ ). All treated groups showed no statistically significant difference in the aortic ratio in comparison with the untreated group ( $42.18\pm 4.14\%$ ,  $45.03\pm 2.89\%$  and  $52.36\pm 6.89$  for groups 3, 4 and 5 respectively.  $p>0.05$ ), suggesting that the development of LVH would have occurred without probucol treatment (Table 2). The percentage of increase of the aortic gradient at the banding site compared to baseline values was not statistically significant different between untreated and treated groups (mmHg/mmHg: group 2:  $60.06\pm 7.5\%$ , group 3:  $55.86\pm 5.03\%$ , group 4:  $59.12\pm 6.52\%$  and group 5:  $55.09\pm 4.69\%$ .  $p>0.05$ ). The ratio of left ventricle/body weight was significantly increased in the untreated group versus controls ( $4.59\pm 0.20$  vs  $3.35\pm 0.21$ .  $p<0.05$ ). Furthermore, the ratio was significantly smaller in treated groups compared with the untreated group (group 3:  $3.26\pm 0.34$ , group 4:  $3.50\pm 0.26$  and group 5:  $3.45\pm 0.33$ ,  $p<0.05$  vs the untreated group) (Table 2).

#### *Histological studies*

Hearts from the untreated aortic banded group developed LVH, as assessed by cardiomyocyte transversal area ( $189.02\pm 1.44$  and  $104.45\pm 0.99\ \mu\text{m}^2$  for untreated and control groups respectively,  $p<0.001$ ) (Table 3). Treatment with probucol statistically decreased cardiomyocyte hypertrophy in the three actively treated groups (group 3:  $120.92\pm 1.08$ ; group 4:  $116.98\pm 1.09$ ; group 5:  $138.46\pm 1.13\ \mu\text{m}^2$ .  $p<0.001$  vs group 2) (Table 3). Interstitial fibrosis was approximately 5 times greater in the untreated group in comparison with the control group (ratio fibrosis/total area in 10 to 12 subendocardial fields/animal:  $66.81\pm 4.54$  ( $\times 10^{-4}$ ) and  $12.45\pm 1.11$  ( $\times 10^{-4}$ ),  $p<0.001$ ). In the three

probucol groups, there was a significant decrease in the left ventricular fibrosis (ratio fibrosis/total area:  $13.15 \pm 1.27$  ( $\times 10^{-4}$ );  $13.04 \pm 1.09$  ( $\times 10^{-4}$ );  $20.04 \pm 1.67$  ( $\times 10^{-4}$ ) for groups 3, 4 and 5 respectively,  $p < 0.001$  vs group 2).

### Vascular reactivity studies

#### *Endothelium-dependent relaxations*

Dose-response curves of coronary rings from the LVH group treated with a placebo demonstrated a statistically significant difference compared to controls ( $p < 0.05$ ), confirming the presence of an endothelial dysfunction (Figures 1 and 2). On the other hand, dose-response curves of the rings from the three treated groups showed a statistically significant increase of relaxations to serotonin (Figures 1) and bradykinin (Figures 2) ( $p < 0.05$ ), compared to curves obtained with rings from the LVH untreated group.

#### Assessment of endothelial function

##### *Plasma nitrites and nitrates ( $NO_x$ ) levels*

Values obtained from the untreated aortic banding group were significantly decreased in comparison with the control group, confirming a reduction in  $NO$  production associated with LVH ( $0.97 \pm 0.22$  and  $2.33 \pm 0.31$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 3). Nitrites/nitrates ratio was statistically increased in groups 3 and 4 ( $3.23 \pm 0.39$  and  $2.66 \pm 0.57$  respectively) in comparison to group 2 ( $p \leq 0.001$ ). The fifth group showed no significant difference with the untreated group ( $1.00 \pm 0.11$ ).

##### *Coronary artery cGMP levels*

Bioavailability of  $NO$ , assessed by cGMP levels, was significantly decreased in the untreated group in comparison with values obtained from controls ( $16.46 \pm 2.72$  vs  $37.13 \pm 4.93$  pmol/mg proteins,  $p < 0.01$ ). The three treated groups showed a significant increase in vascular cGMP content in comparison with the untreated group ( $36.09 \pm 3.70$ ;  $35.40 \pm 3.45$  and  $31.30 \pm 2.63$  for groups 3, 4 and 5,  $p < 0.01$  vs group 2) (Figure 4).

### Assessment of oxidative stress

#### *Plasma angiotensin II levels*

Plasma angiotensin II levels were increased in the untreated aortic banding group compared to the control group ( $33.18 \pm 0.61$  vs  $5.41 \pm 2.81$  pg/ml respectively,  $p < 0.001$ ) (Figure 5). Probucol significantly decreased plasma angiotensin II levels in the three treated groups ( $6.08 \pm 0.8$  pg/ml for group 3,  $7.26 \pm 0.7$  pg/ml for group 4 and  $13.78 \pm 2.87$  pg/ml for group 5.  $p < 0.001$  vs group 2).

#### *Plasma lipid hydroperoxide levels*

In the untreated group, the levels of hydroperoxides were significantly increased in comparison to the control group ( $8.18 \pm 0.76$   $\mu\text{M}$  vs  $2.96 \pm 0.58$   $\mu\text{M}$  respectively,  $p = 0.003$ ) (Figure 6). Plasma hydroperoxide levels from the treated groups were significantly decreased relatively to the untreated groups ( $3.80 \pm 0.62$   $\mu\text{M}$  for group 3,  $4.16 \pm 0.51$   $\mu\text{M}$  for group 4 and  $4.55 \pm 0.54$   $\mu\text{M}$  for group 5,  $p \leq 0.008$ ).

#### *Vascular SOD*

The activity of the antioxidant SOD had a trend towards an increase in the untreated aortic banding group compared to the control group ( $5.72 \pm 0.22$  vs  $4.02 \pm 0.21$  U/ml, respectively,  $p = 0.07$ ). There were no significant differences in SOD in the probucol groups versus the untreated group (Figure 1).

## DISCUSSION

The major findings of the present study are that, in this porcine LVH model, the antioxidant probucol 1) prevented left ventricular hypertrophy and interstitial fibrosis; 2) significantly improved endothelium-dependent relaxations of epicardial coronary arteries; 3) increased production and bioavailability of nitric oxide; and 4) reduced levels of plasma angiotensin II, a strong activator of NAD(P)H oxidase.

Oxidative stress, mainly by the action of  $\bullet\text{O}_2^-$ , plays an important role in the development of cardiomyocyte hypertrophy. In fact, in cultured rat hypertrophied

cardiomyocytes, the hypertrophy is subsequent to an increased formation of  $\bullet\text{O}_2^-$  and activity of NAD(P)H oxidase (Nakagami *et al.*, 2003). Moreover, in a guinea pig model of pressure overload, the expression of multiple subunits of this prooxidant enzyme is increased in the myocardium of the left ventricle, generating more  $\bullet\text{O}_2^-$  (Li *et al.*, 2002). The antioxidant effects of probucol may explain at least in part its ability to prevent left ventricular hypertrophy in this model. This scavenging action of probucol has been demonstrated *in vitro*, in cultured neonatal rat hypertrophied cardiomyocytes (Nakagami *et al.*, 2003). Furthermore,  $\text{NO}\bullet$  is known to have an antihypertrophic effect on the myocardium (Lüscher and Vanhoutte, 1990). In condition of oxidative stress,  $\text{NO}\bullet$  is scavenged by  $\bullet\text{O}_2^-$  so that it is less available for cardiomyocytes. Following antioxidant therapy with probucol,  $\text{NO}\bullet$  is more accessible for cardiomyocytes to inhibit hypertrophy.

The presence of interstitial fibrosis in this porcine model of pressure-overload LVH was significantly decreased in the three groups treated with probucol. In a rat model of LVH, the genesis of fibrosis is subsequent to increased  $\bullet\text{O}_2^-$  formation (Nakagami *et al.*, 2003). This observation might explain in part the beneficial impact of probucol on the development of interstitial fibrosis in the myocardium. In fact, following left anterior descending artery ligation in a rat model, treatment of 80 days with probucol 1 mg/kg/day partially decreased fibrosis and improved left ventricular remodeling (Sia *et al.*, 2002).

As demonstrated in a previous study from our laboratory, no statistically significant difference was present in dose-response curves of rings between untreated and control groups for endothelium-independent relaxations (sodium nitroprusside, an  $\text{NO}\bullet$  donor) and for endothelium-dependent receptor-independent relaxations (calcium ionophore A23187) (Malo *et al.*, 2003<sup>1</sup>). Hence, these agonists were not tested on rings from the treated groups to assess the impact of probucol on vascular reactivity. On the other hand, epicardial coronary endothelium-dependent vasodilations are statistically decreased in the untreated group in comparison to the control group, confirming the presence of an endothelial dysfunction. The alterations in the endothelial cell signaling



pathway preferentially involves the Gi protein-mediated relaxations, as demonstrated by concentration-response curves to serotonin, and moderately the Gq protein-mediated pathway, as demonstrated by concentration-response curves to bradykinin. Vascular reactivity is significantly improved in the three treated groups in comparison with the untreated group. The action of probucol on vascular reactivity has also been demonstrated in hypercholesterolemic rabbits, following stimulation with acetylcholine, whereas it has no effect on controls (Inoue *et al.*, 1998). This improvement in endothelium-dependent relaxations could be explained *in vitro* by the increase in NO• bioavailability for VSMC, demonstrated by the increase in vascular cGMP content.

The rapid regression of LVH and of the associated endothelial dysfunction even when probucol was started 60 days after banding (group 5) may be linked to the neutralization of •O<sub>2</sub><sup>-</sup> by its phenol groups. In fact, NO• production was not significantly increased in these animals compared with the untreated group whereas its bioavailability was restored, suggesting decreased scavenging of •O<sub>2</sub><sup>-</sup> by NO•. VSMC possess the same capacity to respond to NO• in epicardial coronary arteries of LVH and control groups, demonstrated by similar concentration-response curves to SNP (Malo *et al.*, 2003<sup>1</sup>). In this way, the restoration of NO• bioavailability was sufficient to obtain a comparable improvement in vascular reactivity in the three treated groups compared with the untreated group as the downstream cascade is intact in VSMC. Cardiac hypertrophy has been shown to be mediated by •O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Nakagami *et al.*, 2003). Our results show that oxidative stress is required not only for the induction but also for the maintenance of LVH. This raises the intriguing possibility that a powerful synthetic antioxidant may be used to induce regression of LVH. The reduction in interstitial fibrosis and cardiomyocyte transversal area were however slightly less marked when probucol was started 60 days after banding than when it was started earlier. The significance of these findings in patients with LVH of different etiologies will have to be determined in clinical trials.

In a previous study from our laboratory, Malo et al have demonstrated that an *in vitro* supplementation with methyltetrahydrobiopterin, an analog of the cofactor BH<sub>4</sub>,

significantly improved epicardial coronary endothelium-dependent relaxations in this porcine model (Malo *et al.*, 2003<sup>2</sup>). In fact, peroxynitrites possess the capacity to oxidize BH<sub>4</sub>, inducing a functional uncoupling of eNOS. This promotes oxidative stress instead of generation of NO• (Stuehr *et al.*, 2001). Treatment with probucol may have induced a decrease in peroxynitrite production, increasing non-oxidized BH<sub>4</sub> and restoring the functional coupling of the enzyme for an increased production of NO•. The increased NO• production in probucol treated groups may also be the result of an increased expression of the enzyme eNOS. Indeed, probucol possesses the capacity to positively modulate eNOS expression, as demonstrated in a study using cultured bovine aortic endothelial cells (Ramasamy *et al.*, 1999).

Angiotensin II is a strong activator of the NAD(P)H oxidase, even at a concentration under the threshold that augments blood pressure. Following aortic banding in a rat model, the renin-angiotensin system (RAS) is rapidly activated, acting on NAD(P)H oxidase and generating important levels of •O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Bouloumié *et al.*, 1997). In the untreated group of the present study, the RAS was activated, as demonstrated by the significant increase in angiotensin II levels. On the other hand, the treated groups showed a significant decrease in angiotensin II, suggesting an impact of probucol on RAS. In a dog model of pacing-induced heart failure, renin and angiotensin II levels were also decreased following probucol treatment (Nakamura *et al.*, 2002).

## CONCLUSION

LVH secondary to aortic banding is characterized by decreased NO• bioavailability, increased oxidative stress and alterations in endothelium-dependent relaxations of epicardial coronary arteries. In this porcine model, the antioxidant probucol prevented left ventricular hypertrophy and interstitial fibrosis, improved coronary artery endothelial function, increased NO• bioavailability and reduced lipid hydroperoxide and angiotensin II levels. Considering the negative prognostic and pathophysiological implications of LVH and endothelial dysfunction, clinical studies

should be performed to assess the effects of probucol or similar agents in patients with established LVH or at risk for the development of LVH and its deleterious consequences.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Fonds de la recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal (FRICM), the Department of Surgery of the Université de Montréal. Dr Louis P. Perrault is a Research Scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Dr Jean-Claude Tardif holds the Pfizer and Canadian Institutes of Health Research Chair in Atherosclerosis. The authors would like to thanks Marie-Pierre Mathieu, Steve Laurendeau, Olivier Bouchot, Simon Maltais and Émilie Rény-Nolin for their technical assistance, and Karine Tétrault for statistical analysis.

## REFERENCES

*Bouloumié A, Bauersachs J, Linz W, Schölkens BA, Wiemer G, Fleming I, Busse R.* Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension.* 1997; 30:934-41.

*Braunwald E.* Pathophysiology of heart failure. *Heart diseases: a textbook of Cardiovascular Medicine.* Saunders Edition. Volume 1: 886p.

*Brown DW, Giles WH, Croft JB.* Left ventricular hypertrophy as a predictor of coronary heart disease mortality and the effect of hypertension. *Am Heart J.* 2000 ; 140 :848-56.

*Cai H and DG Harrison.* Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases : the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000 ; 87 :840-4.

*Côté G, Tardif JC, Lespérance J, Lambert J, Bourassa M, Bonan R, Gosselin G, Joyal M, Tanguay JF, Nattel S, Gallo R, Crépeau J.* Effects of probucol on vascular remodeling after coronary angioplasty. *Circulation.* 1999; 99:30-5.

*Desjardins F, Aubin MC, Carrier M, Perrault LP.* Decrease of endothelin receptor subtype ET<sub>B</sub> and release of COX-derived products contribute to endothelial dysfunction in porcine epicardial coronary arteries in left ventricular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;6:499-508.

*Fareh J, Touyz RM, Schiffrin EL, Thibault G.* Endothelin-1 and angiotensin II receptors in cells from rat hypertrophied heart. *Circ Res.* 1996 ; 78 :302-11.

*Grieve DJ, MacCarthy PA, Gall NP, Cave AC, Shah AM.* Divergent biological actions of coronary endothelial nitric oxide during progression of cardiac hypertrophy. *Hypertension.* 2001 ; 38 :267-273.

*Inoue N, Ohara Y, Fukai T, Harrison DG, Nishida K.* Probucool improves endothelial-dependent relaxation and decreases vascular superoxide production in cholesterol-fed rabbits. *Am J Med Sci.* 1998; 315:242-7.

*Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM.* Activation of NAD(P)H oxidase during progression of cardiac hypertrophy to heart failure. *Hypertension.* 2002; 40:477-84.

*Lüscher TF and PM Vanhoutte.* The endothelium: Modulator of cardiovascular function. CRC Press, Inc, Boca Raton. 1990: 1-228.

*Lüscher TF and G Noll.* Endothelial dysfunction in the coronary circulation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994 ; 24 (Suppl. 3) :S16-S26.

*Malo O, Carrier M, Shi YF, Tardif JC, Tanguay JF, Perrault LP.* Specific alterations of endothelial signal transduction pathways of porcine epicardial coronary arteries in left ventricular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003<sup>1</sup> ; 42 :275-86.

*Malo O, Desjardins F, Tanguay JF, Tardif JC, Carrier M, Perrault LP.* Tetrahydrobiopterin and antioxidants reverse the coronary endothelial dysfunction associated with left ventricular hypertrophy in a porcine model. *Cardiovasc Res.* 2003<sup>2</sup>; 59:501-11.

*Nakagami H, Takemoto M, Liao JK.* NADPH oxidase derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35:851-9.

*Nakamura R, Egashira K, Machida Y, Hayashidani S, Takeya M, Utsumi H, Tsutsui H, Takeshita A.* Probucol attenuates left ventricular dysfunction and remodeling in tachycardia-induced heart failure. *Circulation.* 2002; 106:362-7.

*Ramasamy S, Drummond GR, Ahn J, Storek M, Pohl J, Parthasarathy S, Harrison DG.* Modulation of expression of endothelial nitric oxide synthase by nordihydroguaiaretic acid, a phenolic antioxidant in cultured endothelial cells. *Mol Pharmacol.* 1999; 56:116-23.

*Savage DD, Garrison RJ, Kannel WB, Levy D, Anderson SJ, Strokes J, Feinleib M, Castelli WP.* The spectrum of left ventricular hypertrophy in a general population sample : the Framingham study. *Circulation.* 1987 ; 75 (Suppl. I) :I26-I33.

*Sia YT, Lapointe N, Parker TG, Tsoporis JN, Deschepper CF, Calderone A, Pourdjabbar A, Jasmin JF, Sarrazin JF, Liu P, Adam A, Butany J, Rouleau JL.* Beneficial effects of long-

term use of the antioxidant Probucol in heart failure in the rat. *Circulation*. 2002; 105: 2549-2555.

*Stuehr D, Pou S, Rosen GM*. Oxygen reduction by nitric oxide synthases. *J Biol Chem*. 2001; 276:14533-6.

*Treasure CB, Klein JL, Vita JA, Manoukian SV, Renwick GH, Selwyn AP, Ganz P, Alexander RW*. Hypertension and left ventricular hypertrophy are associated with impaired endothelium-mediated relaxation in human coronary resistance vessels. *Circulation*. 1993 ; 87 :86-93.

*Wattanapitayakul SK, Weinstein DM, Holycross BJ*. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *FASEB J*. 2000 ; 14 :271-8.

*Yokoyama T, Miyauchi K, Kutara T, Sato H, Daida H*. Effect of probucol on neointimal thickening in a stent porcine model of restenosis. *Jpn Heart J*. 2004; 45:305-13.

## FIGURES LEGEND

**Figure 1:** Cumulative concentration-response curves to serotonin in rings of porcine coronary arteries from untreated group (■), controls (◆), group treated 60 days with probucol from the day of the AB (▲), group treated 30 days with probucol 30 days post-AB (●) and group treated 30 days with probucol 60 days post-AB (X). Responses are given as the percent of relaxation to the contraction induced by prostaglandin F<sub>2α</sub>. Results are presented as the mean ± SEM. \* $p < 0.05$  vs controls; \*\* $p < 0.05$  vs three treated group. AB: aortic banding.

**Figure 2 :** Cumulative concentration-response curves to bradykinin in rings of porcine coronary arteries of untreated group (■), controls (◆), group treated 60 days with probucol from the day of the AB (▲), group treated 30 days with probucol 30 days post-AB (●) and group treated 30 days with probucol 60 days post-AB (X). Responses are given as the percent of relaxation to the contraction induced by serotonin (5-HT). Results are presented as the mean ± SEM. \* $p < 0.05$  vs controls; \*\* $p < 0.05$  vs three treated group. AB: aortic banding.

**Figure 3:** Influence of probucol treatment on plasma nitric oxide production. Results are presented as the mean ± SEM.  $n=4$  for groups 1 and 2.  $n=3$  for groups 3, 4 and 5. \* $p < 0.001$  vs control group; \*\* $p \leq 0.001$  vs untreated group.

**Figure 4:** Influence of probucol treatment on vascular cGMP levels. Results are presented as the mean ± SEM.  $n=5$  for the five groups. \* $p < 0.01$  vs control group; \*\* $p < 0.01$  vs untreated group.

**Figure 5:** Influence of probucol treatment on plasma angiotensin II levels. Results are presented as the mean ± SEM.  $n=4$  for groups 1 and 3.  $n=3$  for groups 2, 4 and 5. \* $p < 0.001$  vs control group; \*\* $p < 0.001$  vs untreated group.

**Figure 6:** Influence of probucol treatment on plasma lipid peroxidation. Results are presented as the mean  $\pm$  SEM. n=6 for groups 1. n=4 for groups 1, 3, 4 and 5. \* $p=0.003$  vs control group; \*\* $p\leq 0.008$  vs untreated group.

**Figure 7:** Influence of probucol treatment on vascular superoxide dismutase activity. Results are presented as the mean  $\pm$  SEM. n=6 for groups 1 and 4, n=5 for groups 2, 3 and 5.



**Table 1. Experimental groups**

	Treatment	Beginning of treatment	Period of treatment
Group 1	None (No banding)	—————	—————
Group 2	Placebo	On the day of the banding	60 days
Group 3	Probucol (1000 mg/day)	On the day of the banding	60 days
Group 4	Probucol (1000 mg/day)	30 days post-banding	30 days
Group 5	Probucol (1000 mg/day)	60 days post-banding	30 days

**Table 2. Echocardiographic and morphologic data**

	Echocardiography		Morphology		
	Aortic dimension at AB site (% decrease vs distal)	Gradient at AB site (% increase vs baseline)	LV weight/body weight (g/kg)	Heart weight/tibia length (g/cm)	Heart weight/body weight (g/kg)
Group 1	ns	ns	3.35 ± 0.21	9.57 ± 0.53	4.68 ± 0.17
Group 2	42.10 ± 11.24*	60.06 ± 7.5*	4.59 ± 0.20*	11.93 ± 0.60*	6.74 ± 0.04*
Group 3	42.18 ± 4.14	55.86 ± 5.03	3.26 ± 0.34**	11.17 ± 0.37	5.93 ± 0.38
Group 4	45.03 ± 2.89	59.12 ± 6.52	3.50 ± 0.26**	11.06 ± 0.31	6.23 ± 0.58
Group 5	52.36 ± 6.89	55.05 ± 4.69	3.45 ± 0.33**	12.11 ± 0.70	6.18 ± 0.34

Data are presented as mean ± SEM

AB: aortic banding, LV: left ventricle, ns: non significant

\*p<0.05 for group 2 vs group 1, \*\* p<0.05 for treated groups vs group 2

**Table 3. Cardiomyocyte hypertrophy and interstitial fibrosis data**

Histology		
	Cardiomyocyte transversal area ( $\mu\text{m}^2$ )	Interstitial fibrosis (Fibrosis area/total area $\times 10^{-4}$ )
Group 1	104.45 $\pm$ 0.99	12.45 $\pm$ 1.11
Group 2	189.02 $\pm$ 1.44*	66.81 $\pm$ 4.54*
Group 3	120.92 $\pm$ 1.08**	13.15 $\pm$ 1.27**
Group 4	116.98 $\pm$ 1.09**	13.04 $\pm$ 1.08**
Group 5	138.46 $\pm$ 1.13**	20.03 $\pm$ 1.67**

Data are presented as mean  $\pm$  SEM

\*  $p < 0.001$  for group 2 vs group 1, \*\*  $p < 0.001$  for treated groups vs group 2

**Figure 1.**

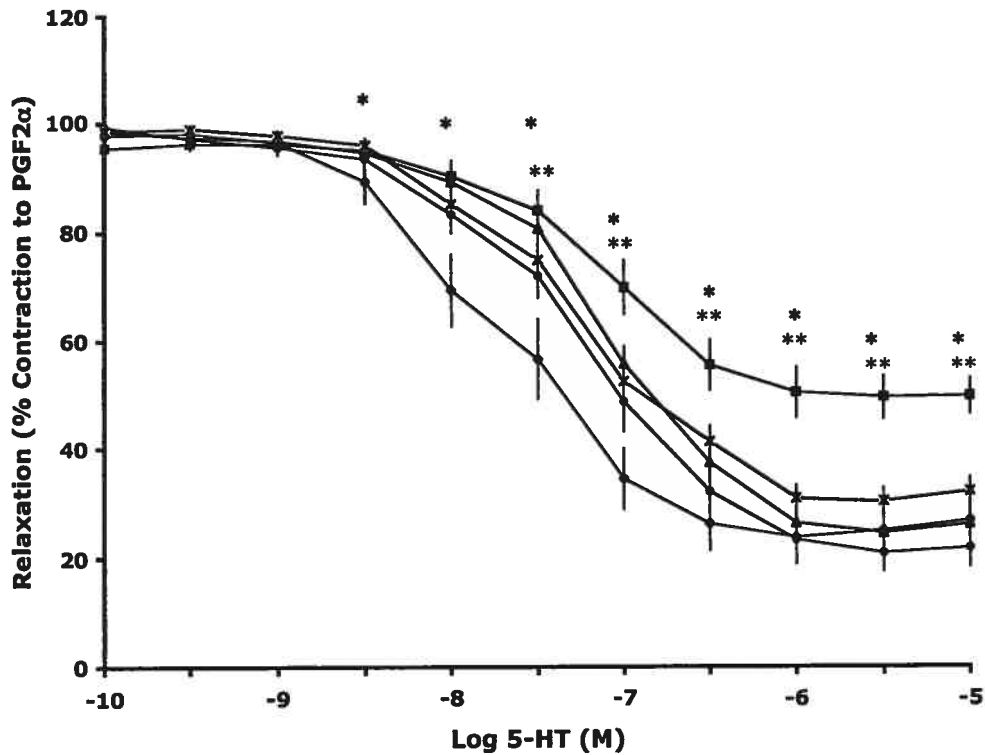


Figure 2.

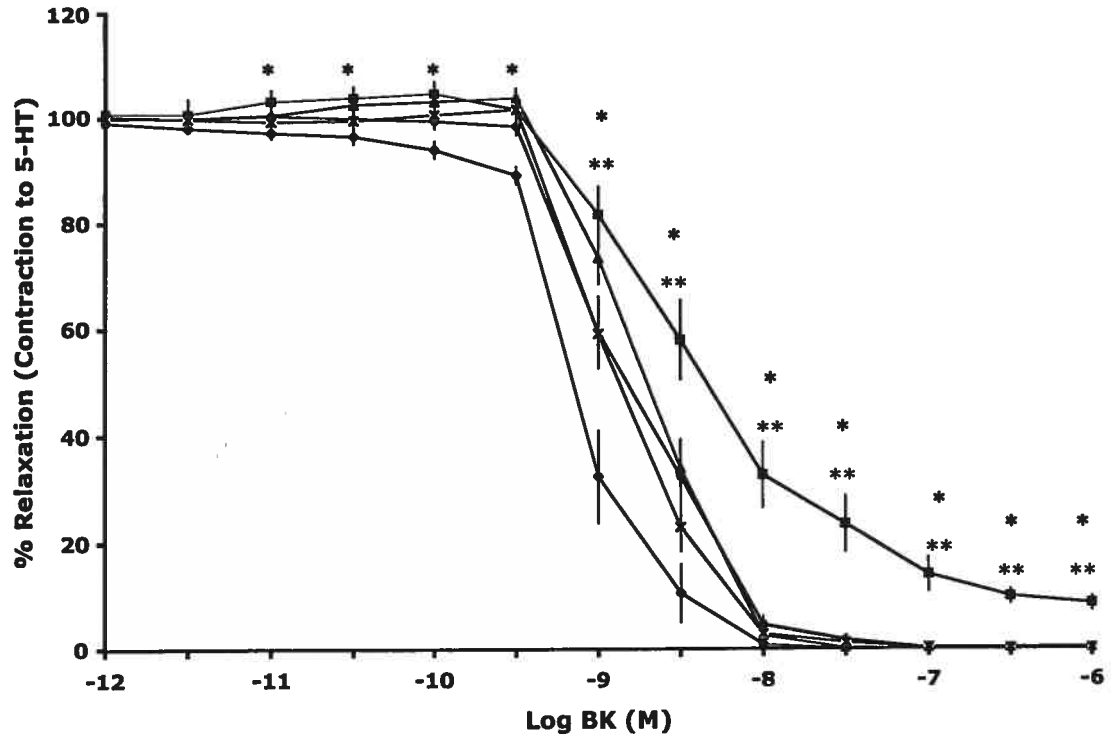
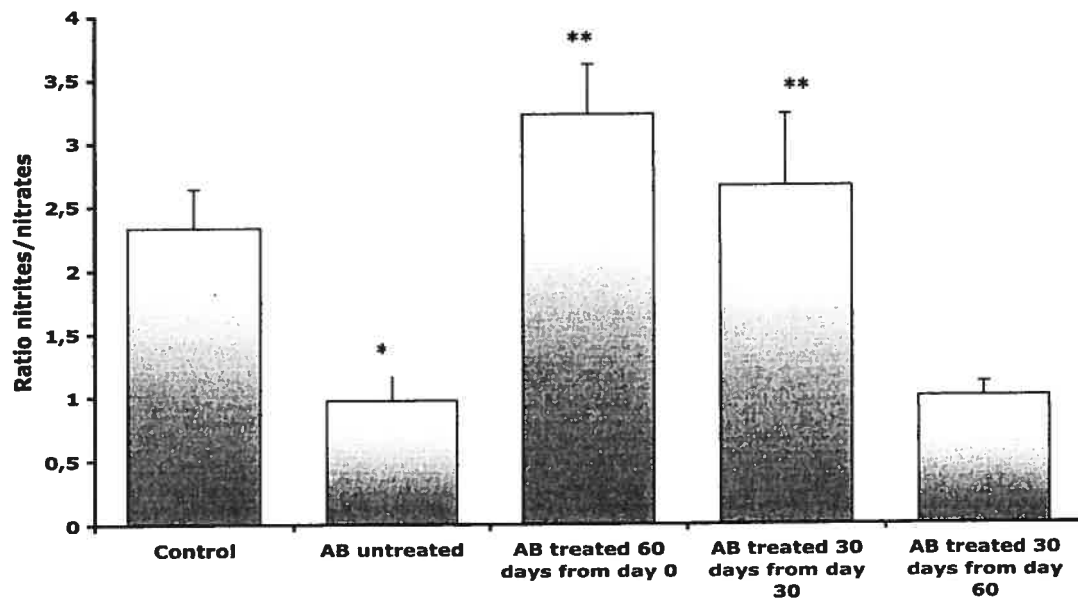
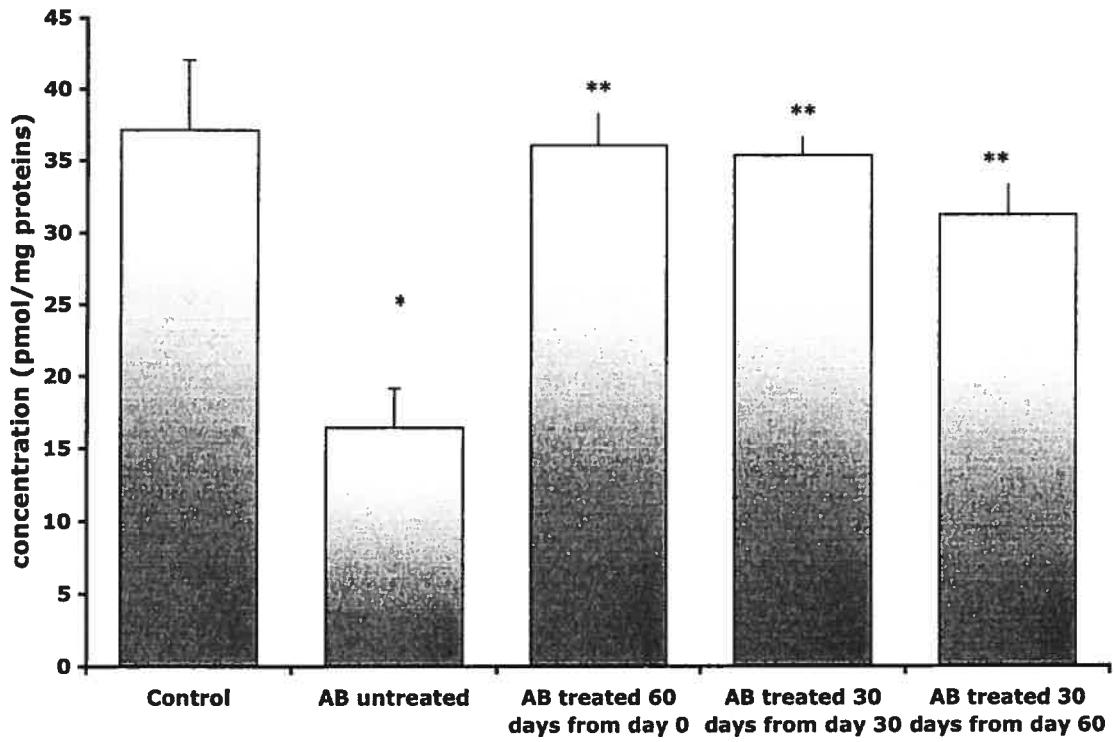


Figure 3.



**Figure 4.**



**Figure 5.**

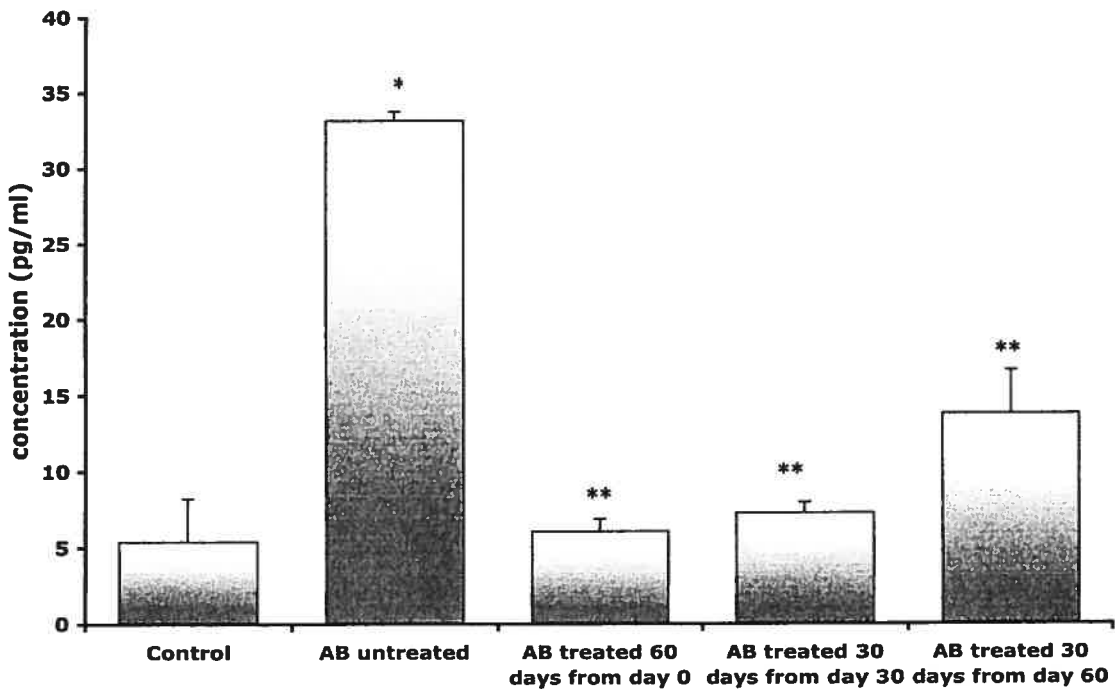


Figure 6.

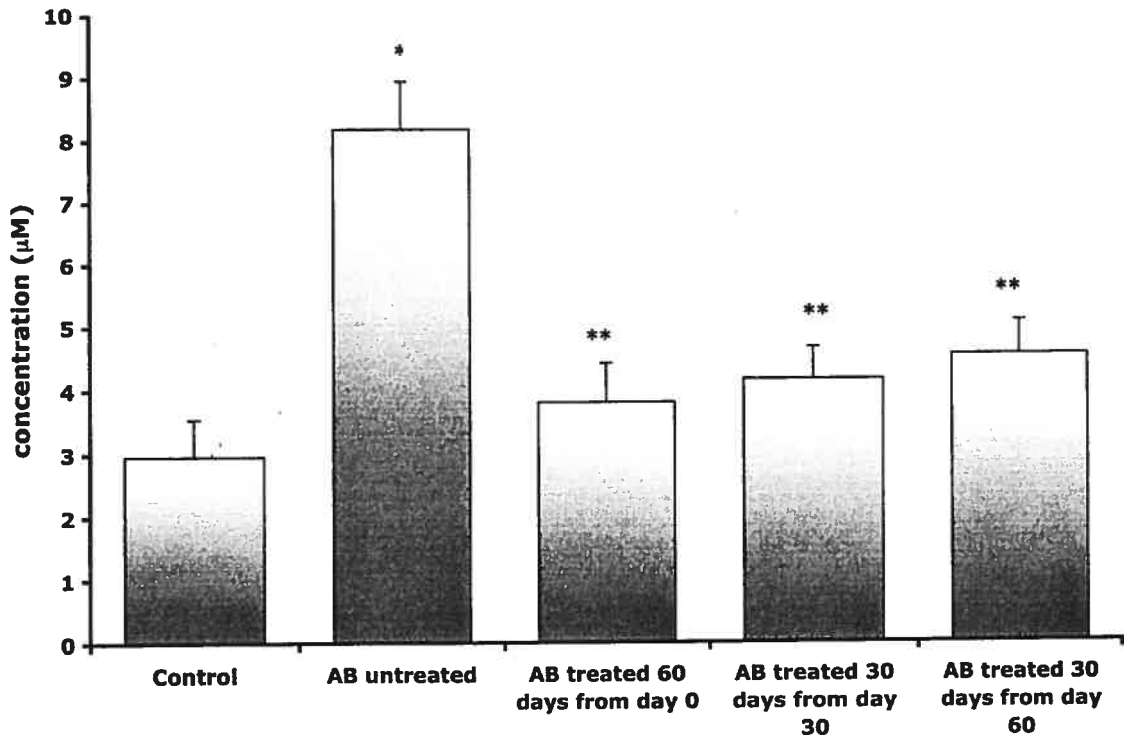
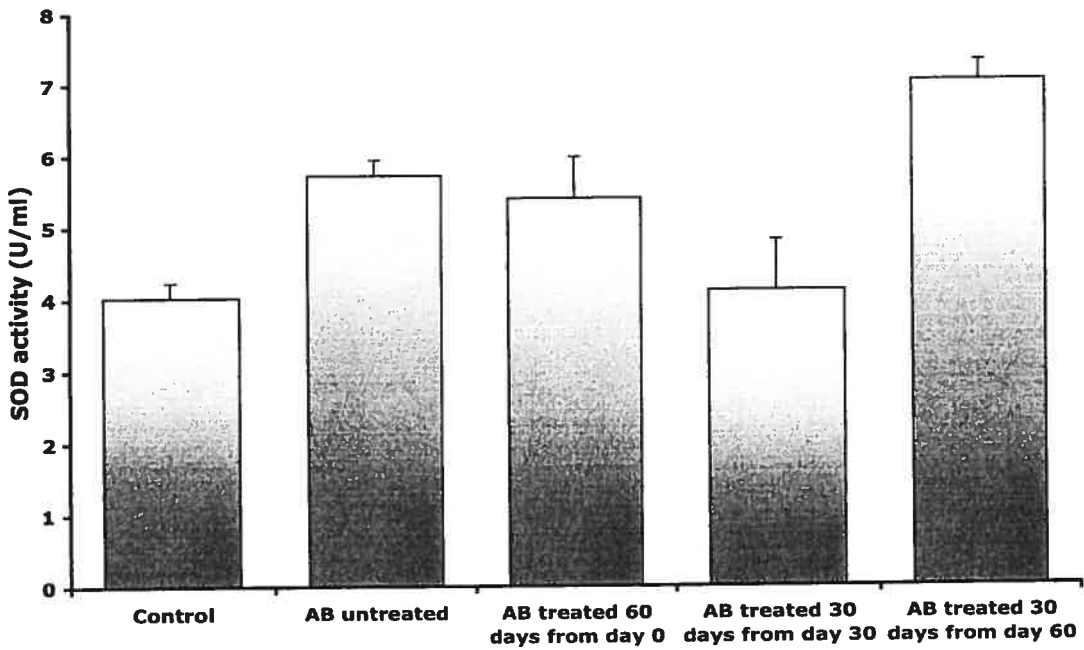


Figure 7.



## **Discussion**

L'hypertrophie ventriculaire gauche affecte 23% des hommes et 33% des femmes après l'âge de 59 ans (*Savage et al.*, 1987) et augmente de trois fois le risque d'évènements cardiovasculaires (*Brown et al.*, 2000). Au niveau fonctionnel, l'HVG représente un état pathologique associé à une dysfonction des relaxations dépendantes de l'endothélium dans différents lits vasculaires, dont les artères coronaires. Cette diminution des relaxations au niveau du ventricule gauche a été rapportée lors d'études cliniques et expérimentales, suite à des stimulations induites par l'ACh, l'adénosine et la substance P (*Grieve et al.*, 2001 ; *Lüscher et Noll*, 1994 ; *Treasure et al.*, 1993). Le stress oxydatif, principalement par l'action de  $\bullet\text{O}_2^-$ , joue un rôle important dans le développement de cette dysfonction endothéliale (*Cai et Harrison*, 2000) et de divers changements pathologiques ventriculaires, dont la fibrose interstitielle et l'hypertrophie des cardiomyocytes (*Nakagami et al.*, 2003). Dans un modèle d'HVG secondaire à un cerclage aortique d'une durée de deux mois chez le porc, la dysfonction endothéliale est également présente au niveau des artères coronaires épiscopardiques, associée avec une diminution de la biodisponibilité du  $\text{NO}\bullet$  pour les CML (*Malo et al.*, 2003). De plus, le stress oxydatif vasculaire a été documenté par une augmentation des concentrations circulantes de  $\text{ONOO}^-$  (*Malo et al.*, 2003<sup>1</sup>).

Suite à ces observations, l'impact d'un traitement antioxydant à l'aide du probucol a été évalué. Les principales observations découlant de notre étude sont que l'administration du probucol a un impact bénéfique au niveau du ventricule gauche, diminuant l'hypertrophie de ce dernier. Cette affirmation est appuyée à l'échographie par la diminution du ratio masse du ventricule gauche/masse corporelle et par l'histologie démontrant une diminution de l'aire transversale des cardiomyocytes et de la fibrose interstitielle. Le traitement au probucol améliore également de manière significative les relaxations dépendantes de l'endothélium au niveau des artères coronaires épiscopardiques suite à une stimulation des voies de signalisation dépendantes des protéines  $\text{G}_i$  ainsi que  $\text{G}_q$ . Cette amélioration des relaxations vasculaires s'explique possiblement par une augmentation de la biodisponibilité du  $\text{NO}\bullet$  au niveau des CML, secondaire à une augmentation de la production du  $\text{NO}\bullet$  par les CE, qui est elle-même lié à une diminution de la neutralisation de ce facteur par les ERO. Il y a en effet une production

limitée des ERO avec le traitement au probucol tel que montré par une diminution de la peroxydation des lipides et par la diminution de l'hormone prooxydante Ang II.

Chez le groupe non traité, les données morphologiques montrent un développement significatif de l'hypertrophie ventriculaire gauche par l'augmentation du ratio de la masse ventriculaire /masse corporelle en comparaison avec le groupe témoin. Cette observation est également supportée par l'augmentation significative de l'aire transversale des cardiomyocytes, témoignant d'une hypertrophie des cellules dans le groupe non traité. Le stress oxydatif, principalement par l'action de l'anion superoxyde semble jouer un rôle important dans le développement de l'hypertrophie des cardiomyocytes. De fait, Nakagami et al. ont démontré que, conséquemment à l'activation de la NAD(P)H oxydase par l'Ang II, l'hypertrophie cardiaque est le résultat de l'action du  $\bullet\text{O}_2^-$  plutôt que de celle de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Nakagami et al., 2003). Dans un modèle d'augmentation de la post-charge chez le cobaye, l'expression de multiples sous-unités de cette enzyme prooxydante est augmentée dans le myocarde du ventricule gauche hypertrophié, générant davantage de  $\bullet\text{O}_2^-$  (Li et al., 2002). Finalement, dans une culture de cardiomyocytes hypertrophiés de rat, il a été démontré que l'hypertrophie est subséquente à l'augmentation de la formation de  $\bullet\text{O}_2^-$  et de l'activité de la NAD(P)H oxydase (Nakagami et al., 2003). Chez les trois groupes traités au probucol de la présente étude, comparativement au groupe non traité avec cerclage aortique, il y a une diminution significative du ratio de la masse du ventricule gauche/masse corporelle ainsi que de l'aire transversale des cardiomyocytes.

Ces deux observations surviennent en dépit de la présence de conditions favorables au développement de l'HVG, tel que montré par la diminution du diamètre de l'aorte et du gradient au niveau du cerclage : l'amélioration de la condition du ventricule gauche repose donc sur un effet positif du probucol. De fait, par ses deux groupements phénols, le probucol neutralise directement le  $\bullet\text{O}_2^-$  (Inoue et al., 1998), expliquant possiblement la diminution de l'hypertrophie par l'antioxydant. D'un autre côté, le  $\text{NO}^\bullet$  est reconnu comme étant un facteur antihypertrophique au niveau du myocarde (Rapoport et Murad, 1983). En condition de stress oxydatif, le  $\text{NO}^\bullet$  est neutralisé par le  $\bullet\text{O}_2^-$ ,



diminuant ainsi sa disponibilité pour les cardiomyocytes. À la suite du traitement antioxydant, le NO• est possiblement davantage disponible pour l'inhibition de l'hypertrophie des cardiomyocytes, expliquant ainsi d'une seconde manière la diminution de l'hypertrophie en présence de probucol.

L'HVG est également caractérisée par l'apparition d'une dysfonction diastolique, attribuable à l'augmentation de la rigidité de la paroi du ventricule et à la fibrose interstitielle (*Wassmann et al.*, 2002). La fibrose interstitielle est également augmentée dans notre modèle d'HVG secondaire à une augmentation de la post-charge et elle est significativement diminuée chez les trois groupes traités. Dans un modèle d'HVG chez le rat, la genèse de la fibrose est subséquente à l'augmentation de la formation de  $\bullet\text{O}_2^-$  (*Harrison et al.*, 2003), expliquant possiblement l'impact bénéfique du probucol sur le développement de la fibrose interstitielle au niveau du myocarde. De fait, suite à la ligature de l'artère interventriculaire antérieure dans un modèle d'IC chez le rat, un traitement de 80 jours avec 1 mg/kg/jour de probucol diminue la fibrose interstitielle et améliore le remodelage ventriculaire (*Sia et al.*, 2002).

Tel que démontré au cours d'une étude précédente dans notre laboratoire, il n'y a pas de différence statistiquement significative au niveau des relaxations indépendantes de l'endothélium (sodium nitroprussiate, un donneur de NO•) entre les artères coronaires épicaudiques des animaux avec HVG comparativement à celle des témoins (*Lincoln et al.*, 1994). Cette même conclusion est valable pour les relaxations dépendantes de l'endothélium et indépendantes d'un récepteur (calcium ionophore A23187) (*Lincoln et al.*, 1994). Ainsi, ces agonistes n'ont pas été testés dans les anneaux provenant des animaux traités pour évaluer l'impact du traitement au probucol sur cet aspect de la réactivité vasculaire. Par contre, les relaxations dépendantes de l'endothélium sont significativement diminuées chez le groupe non traité avec cerclage aortique comparativement au groupe témoin, confirmant la présence d'une dysfonction endothéliale. Les altérations des mécanismes de signalisation des CE impliquent préférentiellement la voie de signalisation des protéines Gi, tel que montré par les

courbes de concentration-réponse à la sérotonine, et minoritairement la voie des protéines Gq, tel que montré par les courbes de concentration-réponse à la bradykinine.

La réactivité vasculaire, impliquant la relaxation endothéliale induite par les voies des protéines Gi et Gq est significativement améliorée chez les trois groupes traités en comparaison avec le groupe non traité. L'action du probucol sur la réactivité vasculaire a été démontrée chez les lapins hypercholestérolémiques suite à une stimulation à l'acétylcholine alors qu'il n'a aucun effet sur les lapins témoins (*Inoue et al.*, 1998). Cette amélioration des relaxations dépendantes de l'endothélium en présence d'HVG est expliquée *in vitro* par l'augmentation de la biodisponibilité du NO• pour les CML vasculaires, démontrée par l'augmentation du contenu vasculaire en GMPc. Cette augmentation, appuyée par l'augmentation du ratio nitrites/nitrates, est le résultat d'une diminution de la neutralisation par les ERO et/ou d'une augmentation de la production du NO• par la eNOS.

Au cours d'une étude précédente dans notre laboratoire, Malo et al (2003) ont démontré qu'un supplément *in vitro* d'un analogue de la BH<sub>4</sub>, la méthyltétrahydrobioptérine, améliore significativement les relaxations dépendantes de l'endothélium au niveau des artères coronaires épicaudiques dans un modèle d'HVG chez le porc (*Malo et al.*, 2003<sup>1</sup>). De fait, les peroxy-nitrites possèdent la capacité d'oxyder la BH<sub>4</sub>, induisant un découplage fonctionnel de la eNOS. Cette dernière favorise alors la formation du •O<sub>2</sub><sup>-</sup> au détriment du NO• (*Izawa et al.*, 2003). Le traitement au probucol, par la neutralisation du •O<sub>2</sub><sup>-</sup>, a potentiellement diminué la production de ONOO<sup>-</sup>, réduisant ainsi les niveaux d'oxydation de BH<sub>4</sub> et rétablissant le couplage fonctionnel de l'enzyme et la production de NO•. L'augmentation de la production du NO• chez les groupes traités peut également provenir d'autres sources. De fait, les niveaux d'ADMA (diméthylarginine asymétrique), un inhibiteur endogène de la eNOS pour la L-arginine, sont augmentés dans plusieurs pathologies, telles que les maladies des artères coronaires et l'insuffisance cardiaque chronique, diminuant la production du NO• (*Weiss et al.*, 2001). Il a été démontré qu'un supplément de L-arginine exogène améliore les relaxations dépendantes de l'endothélium au niveau des aortes thoraciques de lapins

hypercholestérolémiques (Myers et al., 1985). De plus, suivant une injection de LDL natives chez le rat, le probucol possède la capacité de diminuer l'ADMA, permettant la liaison de la L-arginine à la eNOS et améliorant ainsi les relaxations dépendantes de l'endothélium (Jiang et al., 2002). Par contre, dans notre modèle, l'hypothèse de la L-arginine est peu probable puisqu'une incubation des anneaux d'artères coronaires épicaudiques avec de la L-arginine exogène n'améliore pas les relaxations dépendantes de l'endothélium (Scott-Burden et Vanhoutte, 1993).

Finalemeut, l'augmentation de la production de NO• chez les trois groupes traités peut également être le résultat d'une augmentation de l'expression de la eNOS. Dans la littérature, les données concernant l'expression de cette enzyme sont contradictoires. Chez le rat avec une augmentation de la post-charge, l'expression de l'enzyme est significativement augmentée 6 semaines après un cerclage aortique supraréna, simultanément à la présence d'une dysfonction endothéliale (Milstien et Katusic, 1999). Cette observation suggère que l'augmentation de l'expression peut être néfaste suite à l'augmentation de la production •O<sub>2</sub><sup>-</sup>, de l'interaction avec le NO• et de la formation du ONOO- qui est cytotoxique. D'un autre côté, Grieve et al ont démontré dans un modèle de cerclage de l'aorte abdominale chez le cobaye que l'expression de la eNOS ne varie pas significativement lors de l'HVG compensatoire alors que la transition vers l'insuffisance cardiaque est accompagnée par une diminution marquée (Grieve et al., 2001). Malo et al ont démontré dans ce modèle d'HVG compensatoire une préservation de l'expression de la eNOS, suggérant un rôle mineur ou absent dans la diminution de la biodisponibilité du NO• chez le groupe non traité, alors que la fonctionnalité de l'enzyme n'a pas été étudiée (Malo et al., 2003). Le probucol possède la capacité de moduler positivement l'expression de la eNOS, tel que montré dans une étude de CE aortiques bovines en culture (Ramassamy et al., 1999). Puisque le probucol possède la capacité de neutraliser le •O<sub>2</sub><sup>-</sup>, l'augmentation de la eNOS fonctionnelle peut être bénéfique par la diminution de la génération de ONOO-, la diminution de l'oxydation de BH<sub>4</sub>, la diminution du découplage fonctionnel de la eNOS, l'augmentation de la production de NO• et l'augmentation de sa biodisponibilité pour les CML vasculaires.

L'augmentation de la neutralisation du NO• par les ERO représente une autre possibilité expliquant la diminution de la biodisponibilité de ce facteur. De fait, Malo et al (2003) ont précédemment montré que les niveaux de ONOO- sont augmentés dans ce modèle, témoignant de la présence d'un état de stress oxydatif (Malo et al., 2003<sup>1</sup>). Dans notre étude, ceci a également été confirmé par l'augmentation significative de la peroxydation des lipides (hydroperoxydes) chez le groupe non traité avec cerclage aortique comparativement au groupe témoin. Le traitement au probucol a significativement diminué les niveaux de ce marqueur du stress oxydatif. Le probucol peut avoir une action directe sur les lipides, protégeant ceux-ci directement ou diminuant leurs niveaux circulants par ses propriétés hypolipémiantes et réduisant ainsi les chances de peroxydation. Il a été démontré que, suivant une angioplastie transluminale, les propriétés hypolipémiantes du probucol ne sont pas impliquées dans le remodelage favorable du vaisseau (Kim et al., 2002). De plus, la même conclusion a été obtenue dans l'inhibition de la progression de l'athérosclérose chez des lapins Watanabe héréditairement athérosclérotiques (Berk et al., 1989). Ainsi, le probucol pourrait agir indépendamment de ses propriétés hypolipémiantes dans ce modèle. Il agit plutôt à la source du stress oxydatif, c'est-à-dire en diminuant la production de ERO par les enzymes prooxydantes ou en augmentant leur neutralisation par une stimulation des antioxydants endogènes.

L'angiotensine II représente un puissant activateur de la NAD(P)H oxydase et ce, même à des concentrations qui n'induisent pas de variation de la pression sanguine. Suite à un cerclage aortique chez le rat, le système rénine-angiotensine (SRA) est rapidement activé, agissant sur la NAD(P)H oxydase et produisant d'importants niveaux de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Bouloumié et al., 1997). Chez le groupe non traité de notre étude, le SRA est activé, tel que démontré par l'augmentation significative des niveaux d'angiotensine II plasmatiques. Par contre, le traitement au probucol induit une diminution significative des niveaux de l'hormone chez les trois groupes, suggérant un impact de l'antioxydant sur le SRA. Dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque, les niveaux d'Ang II et de rénine sont diminués suivant un traitement au probucol (Landmesser et al., 2003) ; par contre dans l'étude présente, les cibles exactes de la cascade de synthèse de l'Ang II ne

sont pas déterminées. Puisque les niveaux Ang II sont diminués, l'impact de cette hormone sur l'enzyme prooxydante NAD(P)H oxydase l'est aussi, suggérant un rôle dans la diminution du stress oxydatif et dans l'amélioration des relaxations dépendantes de l'endothélium.

L'HVG secondaire à un cerclage de l'aorte transversale dans un modèle de souris est associée à une augmentation de l'activité de la SOD et de la catalase (*Landmesser et al.*, 2003). Cette augmentation de l'activité antioxydante cardiaque représente un mécanisme compensatoire au stress oxydatif en présence d'une hypertrophie (*Phung et al.*, 1994). D'un autre côté, les patients avec une maladie cardiovasculaire montrent une diminution de l'activité antioxydante, induisant ainsi une accumulation de  $\bullet\text{O}_2^-$  (*Matés et Fsanchez-Jiménez*, 1999). Dans notre modèle d'HVG, l'activité de la SOD tend à être augmentée en présence de stress oxydatif dans le groupe non traité avec cerclage aortique sans atteindre de différence significative. Chez les trois groupes traités, l'activité tend à être diminuée relativement au groupe non traité et ce, proportionnellement à l'état de stress oxydatif. Ainsi, dans ce modèle d'HVG, l'activité antioxydante semble varier en fonction au stress oxydatif et de manière bénéfique pour le retour vers l'homéostasie. Dans la littérature, les données concernant les variations de l'activité de la SOD sont contradictoires. De fait, en présence d'une IC induite par l'isoprotérénol, le traitement au probucol n'est pas accompagné d'une variation de l'activité de la SOD (*Bauersachs et al.*, 2000) alors qu'en présence d'une cardiomyopathie induite par l'adriamycine, le probucol induit une augmentation de l'activité de cette dernière (*Verhaar et al.*, 1998).

## **Conclusion**

L'HVG secondaire à un cerclage aortique est caractérisée par une dysfonction des relaxations dépendantes de l'endothélium au niveau des artères coronaires épiscopardiques alors que les relaxations indépendantes de l'endothélium sont préservées. Cette diminution de la biodisponibilité du NO• pour les CML vasculaires est expliquée par une diminution de la production (découplage fonctionnel de la eNOS) et/ou par une augmentation de la neutralisation par les ERO. De fait, le stress oxydatif représente une source importante d'altérations menant à une série de modifications et résultant en une HVG et en une dysfonction endothéliale des coronaires. L'antioxydant probucol possède la capacité de neutraliser le •O<sub>2</sub><sup>-</sup>, un radical libre à la source de la cascade de stress oxydatif, résultant ainsi en une amélioration de la réactivité vasculaire et de la condition du ventricule gauche.

Le probucol diminue ainsi la fibrose interstitielle et l'hypertrophie des cardiomyocytes, deux phénomènes qui surviennent ultérieurement à l'augmentation de la production de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> dans le myocarde (*Landmesser et al, 2000*). Au niveau des artères coronaires épiscopardiques, le probucol améliore significativement les relaxations dépendantes de l'endothélium, possiblement suite à une augmentation de la production et de la biodisponibilité du NO•. De plus, le stress oxydatif est diminué suite à l'administration de probucol, suite à la diminution des niveaux du stimulateur de la NAD(P)H oxydase, l'angiotensine II, et des niveaux des hydroperoxydes. Ainsi, le probucol représente une intervention pharmacologique bénéfique afin de prévenir l'initiation et la progression et même de renverser l'HVG et la dysfonction endothéliale vasculaire qui lui est associée. Des études plus poussées devraient être réalisées chez les humains afin d'évaluer les effets bénéfiques du probucol, ou d'un analogue, chez les patients avec une HVG établie ou à titre préventif, chez des patients porteurs de facteurs de risque connus pour le développement d'une HVG.

## **Bibliographie**



*Abe A et H Karaki.* Mechanisms underlying the inhibitory effect of dibutyl cyclic AMP in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1992; 211:305-11.

*Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn F.* Localization and function of angiotensin AT<sub>1</sub> receptors. *Am J Hypertens.* 2000; 13:31S-8.

*Ambrosio G, Zweier JL, Duilio C, Kuppusamy P, Santoro G, Elis PP, Tritto I, Cirillo P, Condorelli M, Chiarello M, Flaherty JT.* Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J Biol Chem.* 1993; 268:18532-41.

*Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P.* The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med.* 1995; 332:488-93.

*Andrews NP, Prasad A, Quyyumi AA.* N-Acetylcysteine improves coronary and peripheral vascular function. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 37:117-23.

*Andries LJ, Brutsaert DL, Sys SU.* Nonuniformity of endothelial constitutive nitric oxide synthase distribution in cardiac endothelium. *Circ Res.* 1998; 82:195-203.

*Angdin M, Settergren G, Starkopf J, Zilmer M, Zilmer K, Vaage J.* Protective effect of antioxidants on pulmonary endothelial function after cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2003; 17:314-20.

*Arimura K, Egashira K, Nakamura R, Ide T, Tsutsui H, Shimokawa H, Takeshita A.* Increased inactivation of nitric oxide is involved in coronary endothelial dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280:H68-75.

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

*Azumi H, Inoue N, Takeshita S, Rikitake Y, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M.* Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation.* 1999; 100:1494-8.

*Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA, Smith TW, Michel T.* Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. *J Biol Mol.* 1994; 269:27580-8.

*Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Kobzik L, Lowenstein CJ, Lamas S, Kelly RA, Smith TW, Michel T.* Induction of NO synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$ . *Am J Physiol.* 1995; 268:H1293-H1303.

*Ballinger SW, Petterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, Yakes M, Van Houten B, Ballinger CA, Freeman BA, Runge MS.* Hydrogen peroxide- and peroxinitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res.* 2000; 86:960-6.

*Barbakanne MA, Rami J, Michel JB, Souchard JP, Philippe M, Besombes JP, Bayard F, Arnal JF.* Estradiol increases rat aorta endothelium-derived relaxing factor (EDRF) activity without changes in endothelial NO synthase gene expression: possible role of decreased endothelium-derived superoxide anion production. *Cardiovasc Res.* 1999; 41:672-81.

*Barton M et CC Haudenschild.* Endothelium and atherogenesis : Endothelial therapy revisited. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001; 38(Suppl. 2):S23-S25.

*Batenburg WW, de Vries R, Saxena PR, Jan Danser AH.* L-S-Nitrosothiols: endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries? *J Hypertens.* 2004; 22:1927-36.

*Bauersachs J, Bouloumie A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R, Ertl G.* Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation.* 1999; 100:292-8.

*Bauersachs J, Fraccarollo D, Galuppo P, Widder J, Ertl G.* Endothelin-receptor blockade improves endothelial vasomotor dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2000; 47:142-9.

*Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA.* Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:1620-4.

*Beckman JS et WH Koppenol.* Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrites: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol.* 1996; 271:C1424-37.

*Bell JP, Mosfer SI, Lang D, Donaldson F, Lewis MJ.* Vitamin C and quinapril abrogate LVH and endothelial dysfunction in aortic-banded guinea pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281:H1704-10.

*Bengtsson SHM, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR.* Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003; 30:849-54.

*Berges A, Van Nassauw L, Bosmans J, Timmermans JP, Vrints C.* Role of nitric oxide and oxidative stress in ischemic myocardial injury and preconditioning. *Acta Cardiol.* 2003; 58:119-32.

*Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, Tsuda T.* Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1989; 13:305-14.

*Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC.* NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension.* 2001; 38:1107-11.

*Block ER, Patel JM, Edwards D.* Mechanism of hypoxic injury to pulmonary artery endothelial cell plasma membranes. *Am J Physiol.* 1989; 257:C223-31.

*Böger RH, Bode-Boger SM, Brandes RP, Phivthong-ngam L, Bohme M, Nafe R, Mugge A, Frolich JC.* Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. *Circulation.* 1997; 96:1282-90.

*Böger RH et ES Ron.* L-arginine improves vascular function by overcoming the deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor? *Alter Med Rev.* 2005; 10:14-23.

*Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A.* Endothelial dysfunction. A marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:168-75.

*Boulanger CL, Tanner FC, Bea ML, Werner A, Hahn AWA, Lüscher TF.* Oxidized low density protein induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res.* 1992; 70:1191-7.

*Boulanger CM et PM Vanhoutte.* G protein and endothelium-dependent relaxations. *J Vasc Res.* 1997; 34:175-85.

*Bouloumié A, Bauersachs J, Linz W, Schölkens BA, Wiemer G, Fleming I, Busse R.* Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension.* 1997; 30:934-41.

*Braun A, Zhang S, Miettinen HE, Ebrahim S, Holm TM, Vasile E, Post MJ, Yoerger DM, Picard MH, Krieger JL, Andrews NC, Simons M, Krieger M.* Probucol prevents early coronary heart disease and death in the high-density lipoprotein receptor SR-BI/apolipoprotein E double knockout mouse. *PNAS.* 2003; 100:7283-8.

*Braunwald E.* Pathophysiology of heart failure. *Heart diseases: a textbook of Cardiovascular Medicine.* Saunders Edition. Volume 1: 886p.

*Bray CA.* Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. *The Enzyme*, vol XII, 3<sup>rd</sup> edition (Boyer P.D., ed). 1975. p299-419. Academic Press, New York.

*Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH.* Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature.* 1991; 351:714-8.

*Britten MB, Zeiher AM, Schächinger V.* Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options. *J Intern Med.* 1999; 245:315-27.

*Brown DW, Giles WH, Croft JB.* Left ventricular hypertrophy as a predictor of coronary heart disease mortality and the effect of hypertension. *Am Heart J.* 2000 ; 140 :848-56.

*Bukoski RD, Bergman C, Gairard A, Stoclet JC.* Intracellular Ca<sup>2+</sup> and force determined simultaneously in isolated resistance arteries. *Am J Physiol.* 1989; 257:H1728-35.

*Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH.* EDHF: bringing the concepts together. *TRENDS in Pharmacological Sciences.* 2002; 23(8):374-80.

*Burton GW et KU Ingold.* Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann N Y Acad Sci.* 1989; 570:7-22.

*Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD.* Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension.* 2000; 35:746-51.

*Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AOM.* Production of superoxide radical and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 1977; 180:248-57.

*Cai H et DG Harrison.* Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases : the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000 ; 87 :840-4.

*Cai H, Griendling KK, Harrsion DG.* The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *TRENDS in Pharmacological sciences.* 2003; 24(9):471-8.

*Caldwell PR, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL.* Angiotensin-converting enzyme: Vascular endothelial localization. *Science.* 1976; 191:1050-1.

*Campbell WB et KM Gauthier.* What is new in endothelium-derived hyperpolarizing factors? *Curr Opin Nephrol Hypertens Res.* 2002; 11:177-83.

*Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, Quyyumi AA, Panza JA.* Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension.* 1997; 30:57-63.

*Chang MY, Sasahara M, Chait A, Raines EW, Ross R.* Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the non-human primate by probucol. Cellular composition and proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15:1631-40.

*Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A, Hobbs AJ.* Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:1426-31.

*Chen TH, Tseng HP, Yang JY, Mao SL.* Effects of antioxidant in endothelial cells exposed to oxidized low-density lipoproteins. *Life Sci.* 1998; 62:277-82.

*Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL.* Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension.* 2001; 38:606-11.

*Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S.* Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptative physiologic response. *FASEB J.* 1991; 5:3037-46.

*Chopra M, McMurray J, Syewart J, Dargie HJ, Smith WE.* Free radical scavenging: a potentially beneficial action of thiol-containing angiotensin converting enzyme inhibitors. *Biochem Soc Trans.* 1990; 18:1184-5.

*Coleman RA, Smith WL, Narumiya S.* International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.* 1994; 46:205-29.

*Cominacini L, Garbin U, Fratta Pasini A, Davoli A, Campagnola M, Pastorino AM, Gaviraghi G, Lo Cascio V.* Oxidized low-density lipoprotein increases the production of intracellular reactive oxygen species in endothelial cells: inhibitory effect of lacidipine. *J Hypertens.* 1998; 16:1913-9.

*Consentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Lüscher TF.* Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest.* 1998; 101:1530-7.

*Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ, Hirsch AT, Creager MA.* Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation.* 1991; 83:1057-62.

*Côté G, Tardif JC, Lespérance J, Lambert J, Bourassa M, Bonan R, Gosselin G, Joyal M, Tanguay JF, Nattel S, Gallo R, Crepeau J.* Effects of probucol on vascular remodeling after coronary angioplasty. Multivitamins and ProbucoL Study Group. *Circulation.* 1999; 99:30-5.

*Cronstein BN, Kramer SB, Weissmann G, Hirschhorn R.* Adenosine: a physiological modulator of superoxide generation by human neutrophils. *J Exp Med.* 1983; 158:1160-77.

*Cronstein BN, Rosenstein ED, Kramer SB, Weissmann G, Hirschhorn R.* Adenosine: a physiological modulator of superoxide generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A<sub>2</sub> receptor on human neutrophils. *J Immunol.* 1985; 135:1366-71.

*Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, Kaley G.* Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res.* 2002; 90:1159-66.

*Daida H, Kawubara Y, Yokoi H, Nishikawa H, Takatsu F, Nakata Y, Kutsumi Y, Oshima S, Nishiyama S, Ishiwata S, Kato K, Nishimura S, Miyauchi K, Kanoh T, Yamaguchi H.* Effect of probucol on repeat revascularization rate after percutaneous transluminal angioplasty (from the ProbucoL Angioplasty Restenosis Trial [PART-1]). *Am J Cardiol.* 2000; 86:550-2.

*Dates Mo, Morita T, Yamashita N, Nishida K, Yamaguchi O, Higuchi Y, Hirotsu S, Matsumura Y, Hori M, Tada M, Otsu K.* The antioxidant N-2-Mercaptopropionyl glycine

attenuates left ventricular hypertrophy in in vivo murine pressure-overload model. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39:907-12.

*De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griending KK.* Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res.* 1998; 82:1094-1101.

*Del Biccio G, Lapenna D, Porreca E, Pennelli A, Savini F, Feliciani P, Ricci G, Cuccurullo F.* Aortic antioxidant defense mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis.* 1990; 81:127-35.

*Delbosc S, Morena M, Djouad F, Ledoucen C, Descomps B, Cristol JP.* Statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, are able to reproduce superoxide anion production by NADPH oxidase in THP-1-derived monocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002; 40:611-7.

*Delpy E, Coste H, Gouville AC.* Effects of cyclic cGMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *Br J Pharmacol.* 1996; 119:471-8.

*Desjardins F, Aubin MC, Perrault LP.* Decrease of endothelin receptor subtype ET<sub>B</sub> and release of COX-derived products contribute to endothelial dysfunction in porcine epicardial coronary arteries in left ventricular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005; 6:499-508.

*De Witt DL, Day JS, Sonnenburg WK, Smith WL.* Concentrations of prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin I<sub>2</sub> synthase in the endothelium and smooth muscle of bovine aorta. *J Clin Invest.* 1983; 72:1882-8.

*Dhalla AK et K Singal,* Antioxidant changes in hypertrophy and failing guinea pigs hearts. *Am J Physiol.* 1994; 267:H1280-5.

*Diatchuk V, Lotan O, Koshkin V, Wikstroem P, Pick E.* Inhibition of NAD(P)H oxidase activation by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds. *J Biol Chem.* 1997; 271:1577-84.



*Didion SP, Ray MJ, Didion LA, Fegan PE, Sigmund CD, Faraci FM.* Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res.* 2002; 91:938-44.

*Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM.* Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999; 399 :601-5.

*Ding H et CR Triggle.* Contribution of EDHF and the role of potassium channels in the regulation of vascular tone. *Drug Dev Res.* 2003; 58:81-9.

*Dorer FE, Kahn Jr, Lentz KE, Levine M, Skeggs LT.* Purification and properties of angiotensin-converting enzyme from hog lung. *Circ Res.* 1972; 31:356-66.

*Drexler H, Kästner S, Strobel A, Studer R, Brodde OE, Hasenfuss G.* Expression, activity and functional significance of inducible nitric oxide synthase in the human failing heart. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 32:955-63.

*D'Uscio LV, Milstien S, Richardson D, Smith L, Katusic ZS.* Long-term vitamin C treatment increases vascular tetrahydrobiopterin levels and nitric oxide synthase activities. *Circ Res.* 2003; 92:88-95.

*Dzau VJ.* Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: Evidence, possibilities and hypotheses. *J Hypertens.* 1989; 7:933-6.

*Dzau VJ.* Short- and long-term determinants of cardiovascular function and therapy: Contributions of circulating and tissue rennin-angiotensin systems. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989<sup>1</sup>; 14 (Suppl 4):S1-5.

*Ekker M, Tronik D, Rougeon F.* Extra-renal transcription of the renin genes in multiple tissues of mice and rats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86:5155-8.

*El-Demerdash E, Awad AS, Taha RM, El-Hady AM, Sayed-Ahmed MM.* Probucol attenuates oxidative stress and energy decline in isoproterenol-induced heart failure in rat. *Pharmacol Res.* 2005; 51:311-8.

*Eldor A, Falcone DJ, Hajjar DP, Minick CR, Weksler BB.* Recovery of prostacyclin production by de-endothelialized rabbit aorta: critical role of the neointimal smooth muscle. *J Clin Invest.* 1981; 67:735-41.

*Ellis A et CR Triggle.* Endothelium-dependent reactive oxygen species: Their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003; 81:1013-28.

*Erzurum SC, Lemarchand P, Rosenfeld MA, Yoo JH, Crystal RG.* Protection of human endothelial cells from oxidant injury by adenovirus-mediated transfer of the human catalase cDNA. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21:1607-12.

*Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM.* Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002; 23:599-622.

*Fareh J, Touyz RM, Schiffrin EL, Thibault G.* Endothelin-1 and angiotensin II receptors in cells from rat hypertrophied heart. *Circ Res.* 1996 ; 78 :302-11.

*Farmer JA et G Torre-Amione.* The renin angiotensin system as a risk factor for coronary artery disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2001; 3:117-24.

*Farquharson CA, Butler R, Hill A, Belch JJ, Struthers AD.* Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Circulation.* 2000; 106:221-6.

*Feletou M et PM Vanhoutte.* Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996; 23:1082-90.

*Fenton H.* Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J Chem Soc.* 1894:899.

*Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T.* Endothelial nitric oxide synthase targeting in caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem.* 1996; 271(37): 22810-4.

*Feron O, Dessy C, Opel DJ, Arstall MA, Kelly RA, Michel T.* Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-calveolin interaction in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1998; 273(46):30249-54.

*Feron O, Desy C, Desager JP, Balligand JL.* Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation.* 2001; 103:113-8.

*Ferrario CM, Chappeli MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI.* Counter-regulatory actions of angiotensin (1-7). *Hypertension.* 1997; 30:535-41.

*Fishman AP.* Endothelium. A distributed organ of diverse capabilities. *Ann N Y Acad Sci.* 1982; 401:1-8.

*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; 272:C737-43.

*Flavahan NA et PM Vanhoutte.* Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction. *Am J Hypertens.* 1995; 8:28S-41S.

*Folkow B.* Structural factor in primary and secondary hypertension. *Hypertension.* 1990; 16:89-101.

*Fontana L, McNeill KL, Ritter JM, Chowienczyk PJ.* Effects of vitamin C and of a cell permeable superoxide dismutase mimetic on acute lipoprotein induced endothelial dysfunction in rabbit aortic rings. *Br J Pharmacol.* 1999; 126:730-4.

*Fontayne A, Dand PM, Gougerot-Pocidallo MA, El-Benna J.* Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochem.* 2002;41:7743-50.

*Fried RL, Fried W, Babin DB.* Biological role of xanthine oxidase and tetrazolium-reductase inhibitor. *Eur J Biochem.* 1973; 33:439-45.

*Furchgott RF et JV Zawadzki.* The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288:373-6.

*Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC.* Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature.* 1998; 392(66678):821-4.

*Gibbons GH.* Cardioprotective mechanisms of ACE inhibition. The angiotensin II-nitric oxide balance. *Drugs.* 1997; 54 (Suppl 5):1-11.

*Gilligan DM, Badar DM, Panza JA, Quyyumi AA, Cannon RO IIIrd.* Acute vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation.* 1994; 90:786-91.

*Gohlke P, Pees C, Unger T.* AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension.* 1998; 31:349-55.

*Goldstein S et G Czapski.* The reaction of NO with  $O_2^-$  and  $HO_2$ : A pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med.* 1995 ; 19 :505-10.

*Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R.* A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res.* 2000; 87:26-32.

*Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW.* Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994; 74:1141-8

*Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M.* NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000; 86:494-501.

*Grieve DJ, MacCarthy PA, Gall NP, Cave AC, Shah AM.* Divergent biological actions of coronary endothelial nitric oxide during progression of cardiac hypertrophy. *Hypertension.* 2001 ; 38 :267-273.

*Griffith TM.* Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: Do gap junctions provide an unifying hypothesis? *Br J Pharmacol.* 2004; 141:881-903.

*Guzik TJ, West NEJ, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM.* Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res.* 2000; e85-90.

*Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM.* Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus. Role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002; 105:1656-62.

*Haber F et J Weiss.* The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc A.* 1934:332.

*Haj-Yehia AI, Nassar T, Nassar H, Anggard EE.* Effects of the superoxide dismutase-mimic compound TEMPOL on oxidant stress-mediated endothelial dysfunction. *Antioxid Redox Signal.* 1999; 1:221-32.

*Hall KL, Venkateswaran S, Hanesworth JM, Scheling ME, Harding JW.* Characterization of a functional angiotensin IV receptor on coronary microvascular endothelial cells. *Regul Pept.* 1995; 58:107-15

*Halushka PV, Mais DE, Mayeux PR, Morinelli TA.* Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1989; 29:213-39.

*Hamilton CA, Miller WH, Al-Benna S, Brosnan J, Drummond RD, McBride MW, Dominiczak AF.* Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease. *Clin Sci.* 2004; 106:219-34.

*Harrison DG.* Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 1997; 100:2153-7.

*Harrison DG, Cai H, Landmesser U, Griendling KK.* Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2003 ; 4:51-61.

Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med.* 2002; 33:774-797.

Hayashi Y, Sawa Y, Ohtake S, Fukuyama N, Nakazawa H, Matsuda H. Peroxynitrite formation from human myocardium after ischemia-reperfusion during open heart operation. *Ann Thorac Surg.* 2001; 72:571-6.

Heart Protection Study Collaborative Group. MCR/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20536 high-risk individuals: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet.* 2002; 360:7-22.

Hein TW, Zhang C, Wang W, Chang CI, Thengchaisri N, Kuo L. Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide-mediated dilation in coronary arterioles: counteracting role of arginase. *FASEB J.* 2003;17(15):2328-30.

Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Hollnau H, Henne S, Meinertz T, Munzel T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res.* 2000; 86:E36-41.

Herget J, Wilhelm J, Novotná J, Eckhardt A, Vytásek R, Mrazková L, Ostádal M. A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension. *Physiol Res.* 2000; 493-501.

Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S. Effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 101:2711-9.

Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RAK, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res.* 2001; 88:e14-e22.

Hink U, Oelze M, Kolb P, Bachschmid K, Zou MH, Daiber A, Mollnau H, August M, Baldus S, Tsilimingas N, Walter U, Ullrich V, Münzel T. Role for peroxynitrites in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42:1826-34.

Hirata Y, Takagi Y, Marumo F. Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 1989; 78:225-8.

Holland JA, Meyer JW, Chang MM, O'Donnell RW, Johnson DK, Ziegler LM. Thrombin stimulated reactive oxygen species production in cultured human endothelial cells. *Endothelium.* 1998; 6:113-121.

Horning B, Harakawa N, Boger RH. Plasma levels of ADMA are increased and inversely related to endothelium-mediated vasodilation in patients with chronic heart failure: a new predictor of endothelial dysfunction? *Circulation.* 1998; 98:I-318.

Hoshikawa Y, Ono S, Tanita S, Sakuma T, Noda M, Tabata T, Ueda S, Ashino Y, Fujimura S. Contribution of oxidative stress pulmonary hypertension induced by chronic hypoxia. *Nippon Kyobu Shokkan Gakki Yas.* 1995; 33:1169-73.

Huang A, Sun D, Koller A, Kaley G. 17 $\beta$ -Estradiol restores endothelial nitric oxide release to shear stress in arterioles of male hypertensive rats. *Circulation.* 2000; 101:94-100.

Hulley S, Grady D, Bushm T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *J Am Med Assoc.* 1998; 280:605-13.

Hunt C, Sim JE, Sullivan SJ, Featherstone T, Golden W, Kapp-Herr CV, Hock RA, Gomez RA, Parsian AJ, Spitz DR. Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res.* 1998; 58:3986-92.

Ikeda Y, Young LH, Scalia R, Ross CR, Lefer AM. PR-39, a proline/arginine-rich antimicrobial peptide, exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2001; 49:69-77.

*Imlay JA, Chin SM, Linn S.* Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science.* 1988; 240:640-2.

*Inoue N, Ohara Y, Fukai T, Harrison DG, Nishida K.* Probucol improves endothelial-dependent relaxation and decreases vascular superoxide production in cholesterol-fed rabbits. *Am J Med Sci.* 1998; 315:242-7.

*Intengan HD, Deng LY, Li JS, Schiffrin EL.* Mechanics and composition of human subcutaneous resistance arteries in essential hypertension. *Hypertension.* 1999; 33:569-74.

*Irani K.* Oxidant signaling in vascular cell growth, death and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res.* 2000; 87:179-83.

*Ishii H, Koya D, King GL.* Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med.* 1998; 76:21-31.

*Itoh S, Umemoto S, Hiromoto M, Toma Y, Tomochika Y, Aoyagi S, Tanaka M, Fujii T, Matsuzaki M.* Importance of NAD(P)H oxidase-mediated oxidative stress and contractile type smooth muscle myosin heavy chain SM2 at the early stage of atherosclerosis. *Circulation.* 2002 ; 105 :2288-95.

*Izawa S, Inoue Y, Kimura A.* Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of adriamycin and paraquat. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 305:600-5.

*Jefferson JA, Simoni J, Escudero E, Hurtado ME, Swenson ER, Wesson DE, Schreiner GF, Schoene RB, Johnson RJ, Hurtado A.* Increased oxidative stress following acute and chronic high altitude exposure. *High Alt Med Biol.* 2004; 5:61-9.

*Jeserich M, Munzel T, Just H, Drexler H.* Reduced plasma L-arginine in hypercholesterolemia. *Lancet.* 1992; 339:561.

*Jiang F, Guo Y, Salvemini D, Dusting GJ.* Superoxide dismutase mimetic M40403 improves endothelial function in apolipoprotein(E)-deficient mice. *Br J Pharmacol.* 2003; 139:1127-34.



*Jiang JL, Li NS, Li YJ, Deng HW.* Probucol preserves endothelial function by reduction of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor level. *Br J Pharmacol.* 2002; 235:1175-82.

*Jones OTG.* The regulation of superoxide production by the NADPH oxidase of neutrophils and other mammalian cells. *Bioessays.* 1994; 16:919-23.

*Josephson RA, Silverman HS, Lakatta EG, Stern MD, Zweier JL.* Study of the mechanisms of hydrogen peroxide and hydroxyl free-radical-induced cellular injury and calcium overload in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1991; 266(4):2354-61.

*Kaiser L, Spickard RC, Olivier NB.* Heart failure depresses endothelium-dependent responses in canine femoral artery. *Am J Physiol.* 1989; 256:H962-7.

*Kakuta T, Currier JW, Haudenschield CC, Ryan TJ, Faxon DP.* Differences in compensatory vessel enlargement, not neointimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circulation.* 1994; 89:2809-15.

*Karupiah G, Xie Q, Buller RML, Nathan C, Duarte C, MacMicking JD.* Inhibition of viral replication by interferon- $\gamma$ -induced nitric oxide synthase. *Science.* 1993; 261:1445-8.

*Katusic ZS et al, Vanhoutte PM.* Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol.* 1989; 257:H33-7.

*Katusic ZS.* Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281:H981-6.

*Katz S.* Impaired acetylcholine-mediated vasodilation in patients with congestive heart failure, role of endothelium derived vasodilating and vasoconstricting factors. *Circulation.* 1994; 88:55-61.

*Kim MH, Cha KS, Han JY, Kim HJ, Kim JS.* Effect of antioxidant probucol for preventing stent restenosis. *Cathet Cardiovasc Intervent.* 2002; 57:424-8.

*Kinlay S et P Ganz.* Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am J Cardiol.* 1997; 86(Suppl. III):III-12—III-19.

*Kojda G et D Harrison.* Interaction between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* 1999; 43:562-71.

*Komozi K et PM Vanhoutte.* Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Blood Vessels.* 1990; 27:238-45.

*Kozàkova M, Galetta F, Gregorini L, Bigalli G, Franzoni F, Giusti C, Palombo C.* Coronary vasodilator capacity and epicardial vessel remodeling in physiological and hypertensive hypertrophy. *Hypertension.* 2000; 36:343-9.

*Ku G, Doherty NS, Wolos JA, Jackson RL.* Inhibition by probucol of interleukin 1 secretion and its implication in atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 1988; 62:77B-81B.

*Kukovetz WK, Holtzmann S, Wurm A, Pöch G.* Prostacyclin increases cAMP in porcine coronary. *J Cyclic Nucl Res.* 1979; 5:469-76.

*Kukreja RC, Kontos HA, Hess M, Ellis EF.* PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH and NADPH. *Circ Res.* 1986; 59:612-9.

*Küng CF et TF Lüscher.* Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension.* 1995; 25:194-200.

*Küng CF, Tschudi MR, Noll G, Clozel JP, Lüscher TF.* Effects of the calcium-antagonist mibefradil in epicardial and intramyocardial coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995; 26:312-8.

*Kunsch C et RM Medford.* Oxidative stress a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res.* 1999; 85:753-66.

Landmesser U, Merten R, Spiekermann S, Buttner K, Drexler H, Hornig B. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*. 2000; 101:2264-70.

Landmesser U et DG Harrison. Oxidant stress as a marker for cardiovascular events. Ox marks the spot. *Circulation*. 2001; 104:2638-40.

Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Horning B, Drexler H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation*. 2002; 106:3073-8.

Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukui T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003; 111:1201-1209.

Langleben D, Fox RB, Johns RC, Reid LM. Effects of dimethylthiourea on chronic hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling and ventricular hypertrophy in rats. *Clin Invest Med*. 1989; 12:235-240.

Lassègue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91phox homologues in vascular smooth muscle cells: nox 1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res*. 2001; 88:888-894.

Lassègue B et RE Clempus. Vascular NAD(P)H oxidase: specific features, expression and regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 285:R277-R297.

Lassègue B et KK Griendling. Reactive oxygen species in hypertension. *Am J Hypertens*. 2004; 17:852-60.

Laufs U et JK Liao. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*. 1998; 273:24266-71.

*Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG.* Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation.* 1997; 95:588-93.

*Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG.* Endothelial regulation of vasomotion in ApoE-deficient mice. *Circulation.* 2001; 103:1282-8.

*Leibler DC.* The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit Rev Toxicol.* 1993; 23:147-69.

*Leopold JA, Zhang YY, Scribner AW, Stanton RC, Loscalzo J.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase overexpression decreases endothelial cell oxidant stress and increases bioavailable nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:411-7.

*Leusen JHW, Verhoeven AJ, Ross D.* Interaction between the components of the human NADPH oxidase: a novel review about the intrigues in the phox family. *Front Biosci.* 1996; 1:d72-90.

*Levin ER.* Endothelins. *N Engl J Med.* 1995; 333:356-63.

*Li H, Oehrlein SA, Wallerath T, Ihrig-Biedert I, Wohlfart P, Ulshofer T, Jessen T, Herget T, Forstermann U, Kleinert H.* Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Mol Pharmacol.* 1998; 53:630-7.

*Li JM et AM Shah.* Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem.* 2002; 277(22):19952-60.

*Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM.* Activation of NAD(P)H oxidase during progression of cardiac hypertrophy to heart failure. *Hypertension.* 2002; 40:477-84.

*Li P, Chappeli MC, Ferrario CM, Brosnihan KB.* Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension.* 1997; 29:394-400.

*Li T, Danelisen I, Bello-Klein A, Singal PK.* Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovasc Res.* 2000; 3:523-30.

*Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL.* Oxidized low-density lipoproteins decrease the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1995; 270:319-24.

*Lim DS, Mooradian SJ, Goldberg CS, Gomez C, Crowley DC, Rocchini AP, Charpie JC.* Effect of oral L-arginine on oxidant stress, endothelial dysfunction, and systemic arterial pressure in young cardiac transplant recipients. *Am J Cardiol.* 2004; 94:828-31.

*Lincoln TM, Komalavilas P, Cornwell TL.* Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension.* 1994; 23:394-400.

*Lledias F, Rangel P, Hansberg W.* Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem.* 1998; 273:10630-7.

*Lüscher TF et PM Vanhoutte.* Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1986; 8:344-8.

*Lüscher TF et G Noll.* Endothelial dysfunction in the coronary circulation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994 ; 24 (Suppl. 3) :S16-S26.

*Lüscher TF, Oemar BS, Boulanger CM, Hahn AWA.* Molecular and cellular biology of endothelin and its receptors. In Lindpainter K. Ganten D (eds). *Molecular Reviews in Cardiovascular Medecine.* London. Chapman & Hall, 1996. pp 96-104.

*Lüscher TF and M Barton.* Biology of the endothelium. *Clin Cardiol.* 1997; 20(11 Suppl 2):II3-10.

*Ma XL, Lopez BL, Liu GL, Christopher TA, Gao F, Guo Y, Feuerstein GZ, Ruffolo RR Jr, Barone FC, Yue TL.* Hypercholesterolemia impairs a detoxification mechanism against peroxynitrite and renders the vascular tissue more susceptible to oxidative injury. *Circ Res.* 1997; 80:894-901.

*MacCarthy PA et AM Shah.* Impaired endothelium-dependent regulation of ventricular relaxation in pressure-overload cardiac hypertrophy. *Circulation.* 2000; 101:1854-60.

*MacCarthy PA, Grieve DJ, Li JM, Dunster C, Kelly FJ, Shah AM.* Impaired endothelial regulation of ventricular relaxation in cardiac hypertrophy. Role of reactive oxygen species and NADPH oxidase. *Circulation.* 2001; 104:2967-74.

*Malo O, Carrier M, Shi YF, Tardif JC, Tanguay JF, Perrault LP.* Specific alterations of endothelial signal transduction pathways of porcine epicardial coronary arteries in left ventricular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003 ; 42 :275-86.

*Malo O, Desjardins F, Tanguay JF, Tardif JC, Carrier M, Perrault LP.* Tetrahydrobiopterin and antioxidants reverse the coronary endothelial dysfunction associated with left ventricular hypertrophy in a porcine model. *Cardiovasc Res.* 2003<sup>1</sup>; 59:501-11.

*Mancini GB.* Long-term use of angiotensin-converting enzyme inhibitors to modify endothelial function: a review of clinical investigation. *Clin Invest Med.* 2000; 23:144-61.

*Marban E et Y Koretsune.* Cell calcium, oncogenes, and hypertrophy. *Hypertension.* 1990; 15:652-8.

*Marshall C, Mamary AJ, Verhoeven AJ, Marshall BE.* Pulmonary artery NADPH oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996; 15:633-44.

*Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF.* Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 1985; 232:708-16.

*Masaki T.* Possible role of endothelin in endothelial relaxation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995; 35:235-55.

*Matés JM et F Sanchez-Jiménez.* Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci.* 1999; 4:D339-45.

*Mattsson Hulten L, Ullstrom C, Krettek A, van Reyk D, Marklund SL, Dahlgren C, Wiklund O.* Human macrophages limit oxidation products in low density lipoprotein. *Lipid Health Dis.* 2005; 4:6.

*Maulik N et DK Das.* Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33:1047-60.

*McGafferty DM.* Peroxynitrite and inflammatory bowel disease. *Gut.* 2000; 46:436-9.

*McGuire JJ, Ding H, Triggle CR.* Endothelium-derived relaxing factors. A focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Can J Physiol Pharmacol.* 2001; 79:443-70.

*McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF.* Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension.* 1999; 34:539-45.

*Meier B, Jesaitis AJ, Emmendorffer A, Roesler J, Quinn MT.* The cytochrome b-558 molecules involved in the fibroblast and polymorphonuclear leucocyte superoxide-generating NADPH oxidase systems are structurally and genetically distinct. *Biochem J.* 1993; 289:481-6.

*Meyer JW et ME Schmitt.* A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS Lett.* 2000; 472:1-4.

*Milstien S et Z Katusic.* Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrites: implication of vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Comm.* 1999; 263:681-4.

*Misra HP et I Fridovich.* The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones. *J Biol Chem.* 1972; 247:188-92.

*Mohazzab HKM, Kaminski PM, Wolin MS.* NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol.* 1994; 266(Heart Circ Physiol 6):H2568-72.

*Molavi B and JL Mehta.* Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. *Curr Opin Cardiol.* 2004; 19:488-93.

*Mombouli JV et PM Vanhoutte.* Purinergic endothelium-dependent and -independent contractions in rat aorta. *Hypertension.* 1993; 22:577-83.

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

*Moncada S et VR Vane.* Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Pharmacol Rev.* 1979; 30:293-331.

*Myers CL, Weiss SJ, Kirsh MM, Schlafer M.* Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in the 'oxygen paradox': reduction of creatine kinase release by catalase, allopurinol or deferoxamine, but not by superoxide dismutase. *J Mol Cell Cardiol.* 1985, 17:675-84.

*Naftilan AJ.* Role of the tissue renin-angiotensin system in vascular remodeling and smooth muscle cell growth. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1994; 3:218-27.

*Nagao T, Illiano S, Vanhoutte PM.* Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the arterial tree of the rat. *Am J Physiol.* 1992; 263:90-4.

*Nagaya N, Uematsu M, Oya H, Sato N, Sakamaki F, Kiotani S, Ueno K, Nakanishi N, Yamagishi M, Miyatake K.* Short-term oral administration of L-arginine improves hemodynamics and exercise capacity in patients with precapillary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Car Med.* 2001; 163:887-91.



*Nakagami H, Takemoto M, Liao JK.* NADPH oxidase derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35:851-9.

*Nakamura R, Egashira K, Machida Y, Hayashidani S, Takeya M, Utsumi H, Tsutsui H, Takeshita A.* Probucol attenuates left ventricular dysfunction and remodeling in tachycardia-induced heart failure. *Circulation.* 2002; 106:362-7.

*Nakashima M et PM Vanhoutte.* Age-dependent decrease in endothelium-dependent hyperpolarizations to endothelin-3 in the rat mesenteric artery. *J Cardiovasc Res.* 1993; 22 (Suppl. 8):S352-4.

*Navalkar S, Parthasarathy S, Santanam N, Khan BV.* Irbesartan, an angiotensin type I receptor inhibitor, regulates markers of inflammation in patients with premature atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 37:440-4.

*Newaz MA, Nawal NN, Rohaizan CH, Muslim N, Gapor A.*  $\alpha$ -Tocopherol increased nitric oxide synthase activity in blood vessels of SHR. *Am J Hypertens.* 1999; 12:839-44.

*Nossuli TO, Hayward R, Scalia R, Lefer AM.* Peroxynitrite reduces myocardial infarct size and preserves coronary endothelium after ischemia and reperfusion in cats. *Circulation.* 1997; 96:2317-24.

*Nozik-Grayck E, Piantadosi CA, van Adelsberg J, Alper SL, Huang YC.* Protection of perfused lung from oxidant injury by inhibitors of anion exchange. *Am J Physiol.* 1997; 273:L296-304.

*Okado-Matsumoto A et I Fridovich.* Subcellular distribution of superoxide dismutase (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem.* 2001; 276:38338-93.

*Omori H, Nagashima H, Tsurimi Y, Takagi A, Ishizuka N, Hagiwara N, Kawana M, Kasanuki H.* Direct in vivo evidence of a vascular statin: a single dose of cerivastatin rapidly increases vascular endothelial responsiveness in healthy normocholesterolemic subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2002; 54:395-9.

*Pacelli R, Wink DA, Cook JA, Krishna MC, Degraff W, Friedman N, Tsokos M, Samuni A, Mitchell JB.* Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. *J Exp Med.* 1995; 182:1469-79.

*Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT.* Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:14 483-8.

*Palmer RM, Ashton DS, Moncada S.* Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1998; 333:664-6.

*Parsaee H, Mc Ewan JR, Sunil J, MacDermot J.* Differential sensitivities of the prostacyclin and nitric oxide biosynthetic pathways to cytosolic calcium in bovine aortic endothelium cells. *Br J Pharmacol.* 1992; 107:1013-9.

*Paravicini TM, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR.* Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits. *Circ Res.* 2002; 91:54-61.

*Patetsios P, Song M, Shutze WP, Pappas C, Rodino W, Ramirez JA, Panette TF.* Identification of uric acid and xanthine oxidase in atherosclerotic plaque. *Am J Cardiol.* 2001; 88:188-91.

*Patterson C, Ruef J, Madamanchi NR, Barry-Lane P, Hu Z, Horaist C, Ballinger CA, Brasier AR, Bode C, Runge MS.* Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin: evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 1999; 274:19824-22.

*Phung CD, Ezieme JA, Turrens JF.* Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 315:479-82.

*(PPP) Collaborative Group of the Primary Prevention Project.* Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomized trial in general practice. *Lancet.* 2001; 357:89-95.

*Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakame M, Murad F.* Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88:10480-4.

*Post MJ, Borst C, Kuntz RE.* The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty: a study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic Yucatan micropig. *Circulation.* 1994; 89:2816-21.

*Preston Mason R, Walter MF, Jacob RF.* Effects of HMG-iCoA reductase inhibitors on endothelial function. *Circulation.* 2004; 109 (Suppl. II):II-34 — II-41.

*Pryor WA et GL Squadrito.* The chemistry of peroxynitrite : a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol.* 1995 ; 268 :L699-L722.

*Pueyo ME, Arnal JF, Rami J, Michel JB.* Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrites in endothelial cells. *Am J Physiol. Cell Physiol.* 1998; 274(43):C214-20.

*Rabkin DG, Weinberg AD, Spotnitz HM.* Optimizing probucol administration to preserve left ventricular compliance after reperfusion injury in the heterotropic rat heart isograft. *J Heart Lung Transplant.* 2003; 22:959-66.

*Radomski MW, Palmer RM, Moncada S.* The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1987; 92:639-46.

*Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman B, Griending KK, Harrison D.* Angiotensin II mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: Contributions to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996; 97:1916-23.

*Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS.* Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. *J Clin Invest.* 1996<sup>1</sup>; 98:2572-9.

*Ramasamy S, Drummond GR, Ahn J, Storek M, Pohl J, Parthasarathy S, Harrison DG.* Modulation of expression of endothelial nitric oxide synthase by nordihydroguaiaretic acid, a phenolic antioxidant in cultured endothelial cells. *Mol Pharmacol.* 1999; 56: 116-23.

*Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S).* *Lancet.* 1994; 344:1383-9.

*Rapoport RM et Murad F.* Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP. *Circ Res.* 1983; 52:352-7.

*Reaven PD, Parthasarathy S, Beltz WF, Witztum JL.* Effect of probucol dosage on plasma lipid and lipoprotein levels and on protection of low density lipoprotein against in vitro oxidation in humans. *Atheroscler Thromb.* 1992; 12:318-24.

*Redon J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Saez GT.* Anti-oxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension.* 2003; 41:1096-1101.

*Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ.* Novel competitive inhibitor NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O<sub>2</sub>(<sup>-</sup>) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res.* 2001; 89:408-14.

*Rey FE, Li XC, Carretero OA, Garvin JL, Pagano PJ.* Perivascular superoxide anion contributes to impairment of endothelium-dependent relaxation: role of gp91(phox). *Circulation.* 2002; 106:2497-2502.

*Ribalet B, Ciani S, Eddlestone GT.* ATP mediates both activation and inhibition of K(ATP) channel activity via cAMP-dependent protein kinase in insulin-secreting cell lines. *J Gen Physiol.* 1989; 94(4):693-717.

*Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M, Nishi H, Inoue N, Yokoyama M.* Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis.* 2001; 154:87-96.

*Ronson RS, Nakamura M, Vinten-Johansen J.* The cardiovascular effects and implications of peroxynitrites. *Cardiovasc Res.* 1999; 44:47-59.

*Roques BP, Noble F, Daugé V, Fournié-Zaluski M-C, Beaumont A.* Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1993; 45:87-146.

*Ross R.* The pathogenesis of atherosclerosis—an update. *N Engl J Med.* 1986 ; 314 :488-500.

*Rubanyi GM.* The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; 22 (Suppl 4):S1-14.

*Rueckschloss U, Quinn MT, Holtz J, Morawietz H.* Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:1845-51.

*Ruffolo RR et GZ Feuerstein.* Pharmacology of carvedilol: rationale for use in hypertension, coronary artery disease, and congestive heart failure. *Cardiovasc Drug Ther.* 1997; 11:247-56.

*Ruschitzka FT, Noll G, Lüscher TF.* The endothelium in coronary artery disease. *Cardiology.* 1997; 88(Suppl 3):3-19.

*Saito T, Fushimi E, Abe T, Kimura Y, Takahashi K, Kudo Y, Nakagomi A, Miura M.* Augmented contractile response to endothelin and blunted endothelium-dependent relaxation in post-ischemic reperfused coronary arteries. *Jpn Circ J.* 1992; 56:567-70.

*Salgo MG et WA Pryor.* Trolox inhibits peroxynitrites-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 333:482-8.

*Sanders SA, Eisenthal R, Harrison R.* NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase-generation of superoxide anion. *Eur J Biochem.* 1997; 245(3):541-8.

*Sadow SL.* Factors, fiction and endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31:563-70.

*Savage DD, Garrison RJ, Kannel WB, Levy D, Anderson SJ, Strokes J, Feinleib M, Castelli WP.* The spectrum of left ventricular hypertrophy in a general population sample: the Framingham study. *Circulation.* 1987; 75 (Suppl. I):I26-I33.

*Schäfer A, Fraccarollo D, Tas P, Schmidt I, Ertl G, Bauersachs J.* Endothelial dysfunction in congestive heart failure: ACE inhibition vs. angiotensin II antagonism. *Eur J Heart Fail.* 2004; 6:151-9.

*Schiffrin EL.* Reactivity of small blood vessels in hypertension: Relation with structural changes. *Hypertension.* 1992; 19 (Suppl. II):II1-II9.

*Schiffrin EL.* The endothelium and the control of blood vessel function in health and disease. *Clin Invest Med.* 1994; 17:602-20.

*Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS.* Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic. *Hypertension.* 1998; 32:59-64.

*Schneider JE, Berk BC, Gravanis MB, Santoian EC, Cipolla GD, Tarazona N, Lassègue B, King III SB.* Probucol decreases neointimal formation in a swine model of coronary artery balloon injury. *Circulation.* 1993; 88:628-37.

*Schulz R, Smith JA, Lewis MJ, Moncada S.* Nitric oxide synthase in cultured endothelial cells of the pig. *Br J Pharmacol.* 1991; 104:21-4.

*Schulz R, Nava E, Moncada S.* Induction and potential biological relevance of Ca<sup>2+</sup>-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol.* 1992; 105:575-80.

*Scott-Burden T and PM Vanhoutte.* The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation.* 1993; 87 (Suppl V):V51-5.

*Scott-Burden T and PM Vanhoutte.* Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors. *Texas Heart Ins J.* 1994; 348:225-46.

*Seyedi N, Xu X, Nasjletti A, Hintze TH.* Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension.* 1995; 26:164-70.

*Shah AM et PA MacCarthy.* Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacology and therapeutics.* 2000; 86:49-86.

*Shi Y, Niculescu R, Wang D, Patel S, Davenpeck KL, Zalewski A.* Increased NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species in coronary arteries after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:739-45.

*Shimokawa H, Aarhus LL, Vanhoutte PM.* Porcine coronary arteries with regenerated endothelium have a reduced endothelium-dependent responsiveness to aggregating platelets and serotonin. *Circ Res.* 1987; 61:256-70.

*Shimokawa H, Flavahan NA, Lorenz RR, Vanhoutte PM.* Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig. *Br J Pharmacol.* 1988; 95:1197-1203.

*Shimokawa H.* Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31:23-37.

*Shindo T, Ikeda U, Ohkawa F, Takahashi M, Funayama H, Nishinaga M, Yokoyama M, Kasahara T, Shimada K.* Nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes and fibroblasts. *Life Sci.* 1994; 55:1101-8.

*Sia YT, Lapointe N, Parker TG, Tsoporis JN, Deschepper CF, Calderone A, Pourdjabbar A, Jasmin JF, Sarrazin JF, Liu P, Adam A, Butany J, Rouleau JL.* Beneficial effects of long-term use of the antioxidant probucol in the heart failure in the rat. *Circulation.* 2002; 105:2549-55.

*Siragy HM.* The role of the AT<sub>2</sub> receptor in hypertension. *Am J Hypertens.* 2000; 13:62S-7.

*Skeggs LT, Lentz KE, Gould AB, Hochstrasser H, Kahn Jr.* Biochemistry and kinetics of the renin-angiotensin system. *Fed Proc.* 1967; 26:42-7.

*Smith CJ, Sun D, Hoegler C, Roth BS, Zhang X, Zhao G, Xu XB, Kobari Y, Pritchard K Jr, Sessa WC, Hintze TH.* Reduced gene expression of vascular endothelial NO synthase and cyclooxygenase-1 in heart failure. *Circ Res.* 1996; 78:58-64.

*Smith JA, Radomski MW, Schulz R, Moncada S, Lewis MJ.* Porcine ventricular endocardial cells in culture express the inducible form of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol.* 1993; 108:1107-10.

*Sochman J.* N-Acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39:1422-8.

*Sorescu D et KK Griendling.* Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. *Congest Heart Fail.* 2002; 8:132-40.

*Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus RE, Szocs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, Griendling KK.* Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation.* 2002; 102:1744-7.

*Squadrito GL et WA Pryor.* The nature of reactive species in systems that produce peroxynitrites. *Chem Res Toxicol.* 1998; 11:718-9.

*Squadrito GL et WA Pryor.* Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrites and carbon dioxide. *Free Rad Biol Med.* 1998<sup>1</sup>; 25:392-403.

*Steinhorn RH, Russell JA, Lakshminrusimha S, Gugino SF, Black SM, Fineman JR.* Altered endothelium-dependent relaxations in lambs with high pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280:H311-7.

*Steinberg D.* Studies on the mechanism of action of probucol. *Am J Cardiol.* 1986; 57:16H-21H.



*Stuehr D, Pou S, Rosen GM.* Oxygen reduction by nitric oxide synthases. *J Biol Chem.* 2001; 276:14533-6.

*Swynghedauw B.* Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999; 79:215-62.

*Taddei S, Viridis A, Mattei P, Salvetti A.* Vasodilatation to acetylcholine in primary and secondary forms of hypertension. *Hypertension.* 1993; 21:929-33.

*Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A.* Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation.* 1998; 97:2222-9.

*Taniyama Y et KK Griendling.* Reactive oxygen species in the vasculature. Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 2003; 42:2075-81.

*Tardif JC, Côté G, Lespérance J, Bourassa M, Lambert J, Doucet S, Bilodeau L, Nattel S, de Guise P.* Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. Multivitamins and Probucol Study Group. *N Engl J Med.* 1997; 337:365-72.

*Tardif JC, Grégoire J, Bourassa MG.* Antioxidants and cardiovascular diseases. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 2000. p175-91.

*Tiefenbacher CP, Chilian WM, Mitchell M, DeFily DV.* Restoration of endothelium-dependent vasodilation after reperfusion injury by tetrahydrobiopterin. *Circulation.* 1996 ; 94(6) :1423-9.

*Touyz RM et EL Schiffrin.* Ang-II stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1999; 34:976-82.

*Touyz RM et EL Schiffrin.* Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 2000; 52:639-72.

*Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL.* Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res.* 2002; 90:1205-13.

*Treasure CB, Manoukian SV, Klein JL, Vita JA, Nabel EG, Renwick GH, Selwyn AP, Alexander RW, Ganz P.* Epicardial coronary artery responses to acetylcholine are impaired in hypertensive patients. *Circ Res.* 1992; 71:776-81.

*Treasure CB, Klein JL, Vita JA, Manoukian SV, Renwick GH, Selwyn AP, Ganz P, Alexander RW.* Hypertension and left ventricular hypertrophy are associated with impaired endothelium-mediated relaxation in human coronary resistance vessels. *Circulation.* 1993 ; 87 :86-93.

*Tsutsui M, Shimokawa H, Tanaka S, Kuwoaka I, Hase K, Nogami K, Nakanishi K, Okamatsu S.* Endothelial Gi protein in human coronary arteries. *Eur Heart J.* 1994; 15:1216-6.

*Turrens JF, Beconi M, Barilla J, Chavez UB, McCord JM.* Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues. *Free Radic Res Commun.* 1991; 12-13(Pt 2):681-9.

*Ülker S, McKeown PP, Bayraktutan U.* Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. *Hypertension.* 2003; 41:534-9.

*Ursell PC et M Mayes.* Anatomic distribution of nitric oxide synthase in the heart. *Int J Cardiol.* 1995; 50:217-23.

*Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S.* Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992; 20:S60-2.

*Vanhoutte PM.* Endothelin-1. A matter of life and breath. *Nature.* 1994; 368:693-4.

*Vanhoutte PM.* Endothelial dysfunction in hypertension. *J Hypertens.* 1996; 14 (Suppl. 5):S83-S93.

*Vanhoutte PM.* Endothelium-dependent responses in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1996<sup>1</sup>; 28:2233-40.

*Vanhoutte PM, Perrault LP, Vilaine JP.* Endothelial dysfunction and vascular disease. *Endothelium in Clinical Practice.* 1997; Rubany GM, Dzau VM (eds). Marcel Dekker Inc Publ, USA, pp 265-90.

*Vanhoutte PM.* Say NO to ET. *J Auton Nerv Syst.* 2000;81:271-7.

*Vasan RS et D Levy.* The role of hypertension in the pathogenesis of heart failure. *Arch Intern Med.* 1996; 156:1789-96.

*Vassanelli C, Menegatti G, Destro G, Molinari J, Zanotto G, Barbiere E, Loschiavo I, Zardini P.* Endothelial dysfunction in ischemic syndromes. *Cardioplegia.* 1993; 38:157-61.

*Vejlstrup NG, Bouloumié A, Boesgaard S, Andersoen CB, Nielsen-Kudsk JE, Mortensen SA, Kent JD, Harrisson DG, Busse R, Aldershville J.* Inductible nitric oxide synthase (iNOS) in the human heart: expression and localization in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30:1215-23.

*Vergnani L, Hatrik S, Ricci F, Passaro A, Manzoli N, Zuliani G, Brovkovich V, Fellin R, Malinski T.* Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production: key role of L-arginine availability. *Circulation.* 2000; 101:1262-6.

*Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, van Dam T, Koomans HA, Rabelink TJ.* 5-methyltetrahydrofolate, the active form of acid folic, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation.* 1998; 97:237-41.

*Viridis A, Ghiadoni L, Cardinal H, Favilla S, Duranti P, Birindelli R, Magagna A, Bernini G, Salvetti G, Taddei S, Salvetti A.* Mechanisms responsible for endothelial dysfunction induced by fasting hyperhomocyst(e)inemia in humans. *J Am Coll Cardiol.* 2001 ; 38 :1106-15.

*Vita JA, Frei B, Holbrook M, Gokce N, Leaf C, Keaney JF Jr.* L-2-Oxothiazolidine-4-carboxylic acid reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Clin Invest.* 1998; 101:1408-14.

*Wagenaar LJ, Voors AA, Buikema H, van Gilst WH.* Angiotensin receptors in the cardiovascular system. *Can J Cardiol.* 2002; 18(12):1331-9.

*Wang HD, Panago PJ, Du Y, Cayatte AJ, Quinn MT, Brecher P, Cohen RA.* Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. *Circ Res.* 1998; 82:810-8.

*Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Konkol C, Sauer H, Bohm M, Nickenig G.* Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin-II mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol.* 2001; 59:646-54.

*Wassmann S, Hilgers S, Laufs U, Bohm M, Nickenig G.* Angiotensin II type 1 receptor antagonism improves hypercholesterolemia-associated endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:1208-12..

*Wassmann S, Laufs U, Muller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, Linz W, Bohm M, Nickenig G.* Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002<sup>1</sup>; 22:300-5.

*Wattanapitayakul SK, Weinstein DM, Holycross BJ.* Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *FASEB J.* 2000 ; 14 :271-8.

*Weigert AL, Schini VB, Vanhoutte PM.* Endothelium dependent potentiation of the relaxation of the rat aorta to isoproterenol. Role of the inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by cyclic GMP. *Life Sciences Advances.* 1994; 13:45-52.

*Weiss N, Zhang YY, Heydrick S, Bierl C, Loscalzo J.* Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocyst(e)ine-induced endothelial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:12503-8.

*White DG et W Martin.* Differential control and calcium-dependent production of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin by pig aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 1989; 97:683-90.

*White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, Bradley WA, Gianturco SH, Gore J, Freeman BA.* Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci.* 1994; 91(3):1044-8.

*Wiklund O, Fager G, Andersson A, Lundstam U, Masson P, Hultberg B.* N-Acetylcysteine treatment lowers plasma homocysteine but not serum lipoprotein(a) levels. *Atherosclerosis.* 1996; 119:99-106.

*Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB.* Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:9813-7.

*Winlaw DS, Smythe GA, Keogh AM, Schyvens CG, Spratt PM, MacDonald PS.* Increased nitric oxide production in heart failure. *Lancet.* 1994; 344:373-4.

*Winterbourn CC.* Comparison of superoxide with other reducing agents in the biological production of hydroxyl radicals. *Biochem J.* 1979; 182:625-8.

*Wright JW et JW Harding.* Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Biobehav Rev.* 1994; 18:21-53.

*Wu R, Lamontagne D, de Champlain J.* Antioxidative properties of acetylsalicylic acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 2002; 105:387-92.

*Xu Y, Armstrong SJ, Arenas IA, Pehowich DJ, Davidge ST.* Cardioprotection by chronic estrogen or superoxide dismutase treatment in the aged female rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287:H165-71.

*Yamamoto A, Hara H, Takaichi S, Wakasugi J, Tomikawa M.* Effect of probucol on macrophages, leading to regression of xanthomas and atheromatous vascular lesion. *Am J Cardiol.* 1988; 62:31B-36B.

*Yan H et JJ Harding.* Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J.* 1996; 328:599-605.

*Yang G, Candy TEG, Boaro M Wilkin HE, Jones P, Nazhat NB, Saadalla-Nazhat RA, Blake DR.* Free radical yields from the homolysis of peroxyntrous acid. *Free Radic Biol Med.* 1992; 12:327-30.

*Yokoyama T, Miyauchi K, Kurata T, Sato H, Daida H.* Effect of probucol on neointimal thickening in a stent porcine restenosis model. *Jpn Heart J.* 2004; 45:305-13.

*Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P.* Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 2000; 342:154-60.

*Zou M, Martin C, Ulrich V.* Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxyntrites. *Biol Chem.* 1997; 378:707-13.

*Zou MH, Shi C, Cohen RA.* High glucose via peroxyntrites causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H(2) receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. *Diabetes.* 2002; 51:198-203.

*Zulueta JJ, Yu FS, Hertig IA, Thannickal VJ, Hassoun PM.* Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygenation: Role of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995; 12:41-9.

