

Université de Montréal

**Influence de l'âge sur la fonction vasculaire en condition
pro-athérosclérotique
Impact de l'environnement rédox**

par
Marie-Ève Gendron

Département de physiologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D
en physiologie

Octobre, 2007

© Marie-Ève Gendron, 2007



W

4

U58

2008

V. 054

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

Cette thèse intitulée :

Influence de l'âge sur la fonction vasculaire en condition pro-athérosclérotique :
Impact de l'environnement rédox

présentée par :
Marie-Ève Gendron

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jacques De Champlain, président-rapporteur
Éric Thorin, directeur de recherche
Patrick Du Souich, membre du jury
Paul M Vanhoutte, examinateur externe
Denis deBlois, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le vieillissement est associé à une dysfonction endothéliale dont l'apparition est accélérée par la présence de facteurs de risque ou de pathologies tels que la dyslipidémie ou l'athérosclérose. La dysfonction endothéliale est caractérisée par un déséquilibre entre la libération des facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF) et des facteurs constricteurs dérivés de l'endothélium (EDCF). Elle est également associée à un phénotype inflammatoire et au stress oxydant. La cyclooxygénase-2 (COX-2) peut être induite par le stress oxydant, toutefois son rôle dans la régulation de la fonction endothéliale reste encore incertain. Puisque les récents essais cliniques ont démontré que l'inhibition de la COX-2 était associée à des événements cardiovasculaires chez des patients âgés présentant plusieurs facteurs de risque cardiovasculaires telle que la dyslipidémie, nous avons émis l'hypothèse que la dyslipidémie induit des dommages endothéliaux oxydatifs et une augmentation de l'expression de la COX-2. L'augmentation de l'expression de la COX-2 permettrait de maintenir un certain niveau de dilatation par la libération d'un vasodilatateur. Ainsi nous avons étudié l'évolution de la fonction endothéliale de l'artère rénale isolée et pressurisée de souris dyslipidémiques (souris exprimant l'apolipoprotéine B-100 humaine) lors du vieillissement (étude réalisée à 3, 6 et 12 mois). Nous avons déterminé la contribution du stress oxydant, par l'utilisation de l'antioxydant NAC, et étudié les mécanismes compensatoires, plus précisément celui de la COX-2. Nous avons démontré que l'expression de la COX-2 est augmentée chez la souris dyslipidémique âgée de 12 mois face à un environnement pro-oxydant et que ce mécanisme engendre la libération d'une prostaglandine vasodilatatrice permettant de compenser la perte de NO associée au vieillissement.

Ayant démontré que le vieillissement était caractérisé par une dysfonction endothéliale et un état pro-inflammatoire, nous avons testé l'hypothèse que l'augmentation de la libération de produits pro-inflammatoires dérivés des COX précède l'apparition de la

dysfonction endothéliale associée au vieillissement. Dans le cadre d'une deuxième étude, nous avons évalué le rôle du thromboxane A₂ (TXA₂) dans la diminution de la dilatation de l'artère rénale de souris et étudié l'implication des radicaux libres dans ce processus. Par l'utilisation d'un traitement antioxydant chronique avec la catéchine (polyphénol), nous avons évalué la contribution de l'environnement rédox dans ce processus. Les résultats suggèrent qu'une augmentation de la production de TXA₂ et de radicaux libres ainsi qu'un changement de la régulation rédox précède l'apparition de la dysfonction endothéliale.

Il est suggéré que les radicaux libres, lorsque produits en faible quantité, sont essentiels à la maturation et au fonctionnement cellulaire. Toutefois, un déséquilibre vers une production incontrôlée menant au stress oxydant apparaît lors du vieillissement et contribue au développement de la dysfonction endothéliale. Ainsi, la troisième étude a tenté de répondre à l'hypothèse suivante : une thérapie antioxydante chronique débutée suite à la maturation prévient plus efficacement la dysfonction endothéliale puisqu'elle ne compromet pas le processus de maturation dépendant d'une régulation serrée de l'environnement rédox. Ainsi, nous avons étudié l'impact d'une thérapie antioxydante avec la catéchine, débutée avant (précoce) ou après (tardive) la période de maturation, sur l'apparition de la dysfonction endothéliale ainsi que sur les processus inflammatoires. Les résultats suggèrent que l'équilibre rédox est essentiel à la maturation de l'endothélium vasculaire et qu'un traitement tardif est préférable, puisqu'il améliore plus efficacement la dilatation, prévient l'adhésion des leucocytes et favorise l'expression génique de gènes vasoprotecteurs.

Finalement, sachant que l'athérosclérose est une pathologie chronique caractérisée par des dommages inflammatoires et oxydatifs, nous avons émis l'hypothèse qu'un traitement antioxydant préventif (débuté à 3 mois, soit avant que l'athérosclérose est établie) est plus efficace qu'un traitement curatif (débuté à 9 mois, soit un fois que l'athérosclérose est établie). Nous avons étudié l'impact de ces deux types de traitement sur la formation de plaques athérosclérotiques et l'apparition de la dysfonction endothéliale

associée à l'athérosclérose chez des souris LdLr^{-/-}; hApoB^{+/+}. Nous avons évalué la sensibilité des différents systèmes vasculaires physiologiques (dilatation et adhésion) à l'athérogenèse ainsi qu'aux différents traitements antioxydants. Les résultats démontrent que dans un contexte d'athérosclérose, à l'opposé d'une thérapie antioxydante préventive, une thérapie curative est délétère puisqu'elle ne limite pas la formation des plaques, augmente l'adhésion et réduit la sensibilité de l'endothélium vasculaire.

Mots-clés : vieillissement, dyslipidémie, athérosclérose, endothélium, polyphénol, radicaux libres, thromboxane A₂, NO, EDHF, cyclooxygénase

Abstract

Aging is associated with endothelial dysfunction which is accelerated by cardiovascular risk factors and pathologies such as dyslipidemia and atherosclerosis. Endothelial dysfunction is characterised by a disequilibrium between endothelium-derived relaxing factors (EDRF) and endothelium-derived contracting factors (EDCF) production. Endothelial dysfunction is also associated with an inflammatory phenotype and oxidative stress. Cyclooxygenase-2 (COX-2) may be induced by oxidative stress, but its contribution to the regulation of the endothelial function is unknown. Since recent clinical trials demonstrated that COX-2 inhibition was associated with cardiovascular events in an elderly population with combined risk factors for cardiovascular diseases such as dyslipidemia, we hypothesised that dyslipidemia leads to ROS-dependent endothelial damages and an upregulation of COX-2. The increased COX-2 expression may allow sustaining of appropriate dilation by producing a relaxing factor. We studied the evolution of endothelial function of isolated and pressurised renal arteries of the dyslipidemic mouse (expressing the human apolipoprotein B-100) during aging (study realised at 3, 6 and 12 months). We determined the contribution of oxidative stress, by the use of the antioxidant NAC, and studied compensatory mechanisms, more specifically that of COX-2. We demonstrated that COX-2 expression is increased in renal arteries of 12-months dyslipidemic mice in face of a pro-oxidative environment and that this mechanism produces a relaxing prostaglandin which compensates for the loss of the contribution of NO associated with aging.

Since we demonstrated that aging is characterised by an endothelial dysfunction and a pro-inflammatory state, we tested the hypothesis that an increased release of pro-inflammatory COX-derived products precedes aging-associated endothelial dysfunction. In a second study, we evaluated the contribution of thromboxane A₂ (TXA₂) in the reduced dilatation observed in mouse renal arteries and studied the implication of free radicals in this process. Using a chronic antioxidant therapy with catechin (polyphenol), we evaluated the contribution of the redox environment. Our results suggest that an augmented

production of TXA₂ and free radicals as well as an associated change in redox regulation precede the development of endothelial dysfunction.

It is suggested that free radicals, when produced in low concentration, are essential to cellular maturation and function. However, disequilibrium toward oxidative stress occurs during aging and contributes to the development of endothelial dysfunction. Hence, the third study examined the following hypothesis: a chronic antioxidative therapy initiated after maturation would limit endothelial dysfunction efficiently without compromising the redox-dependent maturation of the vasculature. We studied the impact of an antioxidative therapy with catechin, initiated before (early) or after (late) maturation, on the development of endothelial dysfunction and inflammatory processes. Our results suggest that redox equilibrium is essential for the proper maturation of the endothelium, since it restores endothelial function, prevents adhesion and favours expression of several vascular-related protective genes.

Finally, since atherosclerosis is a chronic pathology characterised by inflammatory and oxidative damages, we hypothesised that preventive antioxidative treatment (initiated at 3 months, before establishment of atherosclerosis) would be more efficient than a curative therapy (initiated at 9 months, after establishment of atherosclerosis). We studied the impact of such therapies on atherosclerotic plaque formation and development of endothelial dysfunction associated with atherosclerosis in LdLr^{-/-}: hApoB^{+/+} mice. We evaluated the sensitivity of the different vascular physiological systems (dilatation and adhesion) to atherogenesis and to the different types of antioxidative therapy. Our results show that in atherosclerosis, as opposed to preventive therapy, curative therapy is deleterious since it does not limit plaque formation, increases adhesion and reduces sensitivity of the vascular endothelium.

Keywords : aging, dyslipidemia, atherosclerosis, endothelium, polyphenol, free radicals, thromboxane A₂, NO, EDHF, cyclooxygenase

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	vi
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des figures.....	xv
Liste des abréviations.....	xvi
Remerciements.....	xx
1. Introduction.....	1
1.1. L'endothélium vasculaire.....	1
1.1.1. Les facteurs vasodilatateurs dépendants de l'endothélium.....	5
1.1.1.1. Le monoxyde d'azote.....	5
1.1.1.2. La prostacycline.....	6
1.1.1.3. Le facteur hyperpolarisant.....	7
1.1.2. Les facteurs vasoconstricteurs dépendants de l'endothélium.....	10
1.1.2.1. La thromboxane A ₂	10
1.1.2.2. Les radicaux libres.....	10
1.1.2.3. L'endothéline.....	11
1.2. Le vieillissement de l'endothélium vasculaire.....	12
1.2.1. Les théories du vieillissement.....	12
1.2.2. La dysfonction endothéliale.....	13
1.2.3. Le stress oxydant.....	14
1.2.4. L'apparition d'un phénotype pro-athérosclérotique.....	17
1.2.5. Les modèles expérimentaux.....	20
1.3. La dyslipidémie.....	22
1.3.1. La dysfonction endothéliale.....	24
1.3.2. Les modèles animaux expérimentaux.....	25
1.4. L'athérosclérose.....	26
1.4.1. Implication du stress oxydant.....	32

1.4.2. Implication de l'inflammation.....	34
1.4.3. La dysfonction endothéliale	35
1.4.4. Les modèles animaux expérimentaux	37
1.5. Les radicaux libres	38
1.5.1. Les rôles physiologiques des radicaux libres.....	39
1.5.1.1. La signalisation intracellulaire	40
1.5.1.2. La défense et la destruction de pathogènes.....	40
1.5.1.3. Le contrôle du tonus vasculaire.....	41
1.5.1.4. Le contrôle de la concentration d'oxygène	41
1.5.1.5. Le contrôle de l'adhésion cellulaire	42
1.5.1.6. L'apoptose.....	42
1.5.2. Rôle pathologique des radicaux libres : le stress oxydant.....	43
1.5.2.1. Les sources oxydantes.....	43
1.5.2.2. Les mécanismes d'action des radicaux libres	46
1.5.2.3. Les sources antioxydantes enzymatiques et non-enzymatiques.....	48
1.6. Les polyphénols	48
1.6.1. Les polyphénols et la fonction endothéliale.....	50
1.6.1.1. Le monoxyde d'azote	50
1.6.1.2. La prostacycline	51
1.6.1.3. Le facteur hyperpolarisant	52
1.6.1.4. L'endothéline	53
1.6.1.5. L'angiogenèse	53
1.6.2. Le resvératrol	54
1.6.3. Les catéchines	56
1.6.4. Les mécanismes de protection vasculaire par les polyphénols	57
1.6.4.1. Les polyphénols et le vieillissement	57
1.6.4.2. Les polyphénols et l'athérosclérose	58
2. Raisonnement de l'étude	61

2.1. Hypothèse générale de l'étude	61
2.2. Les objectifs de l'étude	62
3. La méthodologie	63
3.1. Les modèles animaux	63
3.1.1. Les souris C57bl/6 (WT).....	63
3.1.2. Les souris dyslipidémiques C57bl/6 hApoB ^{+/+}	63
3.1.3. Les souris athérosclérotiques C57bl/6 LdLr ^{-/-} : hApoB ^{+/+}	64
3.2. Les études de réactivité vasculaire.....	64
3.2.1. Isolation et préparation de l'artère rénale.....	65
3.2.2. Description de l'artériographe.....	66
3.2.3. Réalisation du protocole.....	67
3.2.4. Optimisation de la pression transmurale	68
3.2.5. Présentation des résultats sous la forme de courbes concentration-réponse	69
3.2.5.1. Puissance de l'agoniste (Effet maximal).....	70
3.2.5.2. Sensibilité à l'agoniste (EC ₅₀).....	71
3.2.5.3. Utilisation de bloqueurs et d'inhibiteurs spécifiques	71
3.3. Mesure des radicaux libres par le CM-H ₂ DCF-DA	74
3.3.1. Mécanisme d'action du CM-H ₂ DCF-DA.....	74
3.3.2. Description de la méthode.....	74
3.4. Immunofluorescence par microscopie confocale.....	75
3.4.1. Étude #1	75
3.4.1.1. Prélèvement et préparation des tissus	75
3.4.1.2. Description de la méthode.....	75
3.4.2. Étude #3	76
3.4.2.1. Préparation des tissus	76
3.4.2.2. Description de la méthode.....	77
3.4.3. Analyse et optimisation des images	77
3.4.3.1. Le principe de la microscopie confocale à balayage et à fluorescence.....	78

3.4.3.2. La déconvolution.....	80
3.5. Immunobuvardage de type Western.....	81
3.5.1. Culture cellulaire.....	81
3.5.2. Préparation des échantillons.....	82
3.5.3. Description de la méthode.....	83
3.6. Dosage par ELISA de TXB ₂	83
3.6.1. Description de la méthode.....	84
3.7. Étude d'adhésion des splenocytes à l'endothélium.....	86
3.7.1. Préparation des tissus.....	87
3.7.2. Extraction des splenocytes.....	88
3.7.3. Marquage des splenocytes au chromium ⁵¹	88
3.7.4. Adhésion des splenocytes à l'endothélium.....	89
3.7.5. Acquisition, analyse et présentation des résultats.....	90
3.8. Étude d'expression des molécules d'adhésion à la surface des splenocytes.....	90
3.8.1. Préparation des splenocytes.....	91
3.8.2. Description de la méthode de cytométrie en flux et présentation des résultats.....	91
3.9. Étude d'expression génique par qPCR.....	92
3.9.1. Extraction de l'ARN total.....	92
3.9.2. Obtention de l'ADN complémentaire.....	93
3.9.3. Conceptualisation des amorces spécifiques.....	94
3.9.4. Obtention des courbes standards.....	95
3.9.5. Obtention des résultats à partir des échantillons.....	96
3.9.6. Acquisition et présentation des résultats.....	98
4. Articles.....	100
Étude #1.....	100
Étude #2.....	134
Étude #3.....	170
Étude #4.....	204

5. Discussion	233
5.1. Implication du stress oxydant dans l'apparition de la dysfonction endothéliale associée au vieillissement et à la dyslipidémie	233
5.2. Implication du TXA ₂ et des ROS dans la fonction endothéliale de souris WT âgées de 6 mois et rôle de l'environnement rédox.....	236
5.3. Effet d'un traitement antioxydant précoce et tardif sur la dysfonction endothéliale associée au vieillissement	239
5.4. Effet d'un traitement préventif primaire et secondaire sur la dysfonction endothéliale associée à l'athérosclérose: il vaut mieux prévenir que guérir !	242
5.5. Comparaison des études #3 et #4	246
6. Conclusion et perspectives.....	251
7. Bibliographie.....	253

Liste des tableaux

Tableau 1. Agents pharmacologiques	72
Tableau 2. Séquences des amorces utilisées	94

Liste des figures

Figure 1. Illustration des différents types d'endothélium (Tiré de Aird. 2007).....	2
Figure 2. Hypothèse « <i>the response-to-injury</i> » (Tiré de Ross. 1999).....	28
Figure 3. Hypothèse « <i>the response-to-retention</i> » (Tiré de Proctor <i>et al.</i> 2002).....	30
Figure 4. Hypothèse « <i>the oxidative modification</i> » (Tiré de Diaz <i>et al.</i> , copyright 1997 National Academy of Sciences USA).....	31
Figure 5. Influence des polyphénols sur les facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium (Tiré de Stoclet <i>et al.</i> , 2004).	51
Figure 6. Influence des polyphénols sur l'angiogenèse (Tiré de Stoclet <i>et al.</i> , 2004).	54
Figure 7. Représentation graphique de l'artériographe	66
Figure 8. Représentation graphique d'un protocole	68
Figure 9. Courbe pression-diamètre	69
Figure 10. Exemple de courbes concentration-réponse	70
Figure 11. Principe du microscope confocal	79
Figure 12. Exemple d'une bille de fluorescence non-déconvoluée et déconvoluée	81
Figure 13. Représentation schématique de l'ELISA	86
Figure 14. Protocole de marquage et d'adhésion des splénocytes sur l'endothélium.....	89
Figure 15. Protocole d'extraction d'ARN par le RNeasy mini kit pour tissus fibreux.....	93
Figure 16. Exemple de courbes standards obtenues pour 4 gènes différents.....	96
Figure 17. Schéma récapitulatif des études.....	250

Liste des abréviations

AA: Acide Arachidonique
 ACh: Acétylcholine
 ADMA : *Asymmetric dimethylarginine*
 AGE: *Advanced Glycation End Products*
 AMPc: Adénosine monophosphate cyclique
 BH₄: Tétrahydrobioptérine
 BK_{ca}: Canal potassique à large conductance dépendant du calcium
 c.p.m.: Compte par minute
 CAT: Catalase
 CD162: PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*)
 CD18: β-intégrine
 CD31: PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*)
 CD62L: L-sélectine
 cDNA: ADN (Acide désoxyribonucléique) complémentaire
 CM-H₂DCF-DA:5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester
 CNP: Peptide natriurétique de type C
 CO₂: Dioxyde de Carbone
 COX: Cyclooxygénase
 DABCO: 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
 DDAA: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase
 DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
 DTT: Dithiothréitol
 EDCF: Facteur contracteur dérivé de l'endothélium (*Endothelium-Derived Contracting Factor*)
 EDHF: Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (*Endothelium-Derived Hyperpolarising Factor*)
 EDRF : Facteur relaxant dérivé de l'endothélium (*Endothelium-Derived Relaxing Factor*)
 EDTA: Acide éthylène-diamine-tétraacétique
 EET: Acide époxyéicosatriénoïque
 EGTA: Acide éthylène glycol-bis (β-aminoéthylether)-N, N, N', N' - tétraacétique
 E_{max}: Effet maximal
 eNOS: NO synthase endothéliale (NOSIII)
 FAD: Flavine adénine dinucléotide
 FMN: Flavine mononucléotide
 GMPc: Guanosine monophosphate cyclique
 GPx : Glutathion peroxydase
 GSH: Glutathion

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène
HDL: Lipoprotéine de forte densité (*High Density Lipoprotein*)
HETE: Acide hydroxyéicosatétraénoïque
HIF-1: Facteur inductible par l'hypoxie-1 (*Hypoxia Inducible Factor-1*)
HNE: 4-hydroxy-2-nonenal
ICAM-1: Molécule d'adhésion intercellulaire-1 (*InterCellular Adhesion Molecule-1*)
IDL: Lipoprotéine de densité intermédiaire (*Intermediate Density Lipoprotein*)
IGF-II: Facteur de croissance analogue à l'insuline (*Insuline Growth factor-II*)
IK_{ca}: Canal potassique à conductance intermédiaire dépendant du calcium
INDO: Indométhacine
iNOS: NO synthase inductible (NOSII)
K-ATP: Canal potassique dépendant de l'ATP
K_{IR}: Canal potassique à rectification entrante
K_v: Canal potassique dépendant du voltage
LDL: Lipoprotéine de faible densité (*Low Density Lipoprotein*)
L-NNA: N ω -nitro-L-arginine
LPS: Lipopolysaccharide
MAEC: Cellules endothéliales aortiques de souris (*Mouse Aortic endothelial Cell*)
MCSF-1: *Monocyte-Colony-Stimulating Factor-1*
MDA: Malondialdéhyde
MFI: Intensité de fluorescence moyenne (*Mean Fluorescence Intensity*)
M-MLV: *Moloney Murine Leukemia Virus*
MMP: Métalloprotéinase
MT-MMP: Métalloprotéinase membranaire
Na₃VO₄: Orthovanadate de sodium
NAC: N-acetyl-L-cystéine
NaCl: Chlorure de sodium
NH₄Cl: Chlorure d'ammonium
nNOS: NO synthase neuronale (NOSI)
NO: Monoxyde d'azote
NOS: NO synthase
NTC: *No Template Control*
O₂⁻: Superoxyde
OH: Ion hydroxyle
ONOO⁻: Peroxynitrite
PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1
PBS: Tampon phosphate salin (*Phosphate Buffered Solution*)
PE: Phényléphrine
PGH₂: Prostaglandine H₂
PGI₂: Prostacycline
PKC: Protéine kinase C
PMSF: Phényl Méthyl Sulfonyl Fluorure

PSS: Solution physiologique saline (*Physiological Salt Solution*)
r.p.m.: rotation par minute
RNS: Espèces réactives azotées (*Reactive Nitrogen Species*)
ROS: Espèces réactives oxygénées (*Reactive Oxygen Species*)
SAM: *Senescence Accelerated Mouse*
SDS-PAGE: Sodium dodécyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis
SIRT: Sirtuine
SK_{ca}: Canal potassique à faible conductance dépendant du calcium
SNP: Nitroprussiate de sodium
SOD: Superoxyde dismutase
TBST: Tampon Tris salin supplémenté de Tween (*Tris Buffered-Saline Tween*)
TGF β -1: *Transforming Growth Factor β -1*
TNF- α : Facteur de nécrose tumoral α (*Tumor Necrosis Factor- α*)
TXA₂: Thromboxane A₂
TXB₂: Thromboxane B₂
VCAM-1: Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*)
VEGF: Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*Vascular endothelial growth factor*)
VLDL: Lipoprotéine de très faible densité (*Very Low Density Lipoprotein*)
WT: Wild-type

*Je dédie cette thèse à mes parents,
Marie-Claude et Alain, sans qui je ne serais
pas où j'en suis aujourd'hui. À mon frère,
Philippe, et mon amour, Alexandre.*

Remerciements

Avant tout, je voudrais remercier messieurs les membres du jury pour leur collaboration à l'évaluation de cette thèse ainsi que pour la participation à la soutenance.

Je voudrais particulièrement remercier mon directeur de recherche, Dr Éric Thorin, pour m'avoir tout d'abord accueilli à bras ouverts dans son laboratoire, et ce dès le tout début de ma maîtrise. J'aurai passé les cinq dernières années à ses côtés à apprendre ce qu'est la recherche et la rigueur scientifique. Son savoir, ses connaissances et sa personnalité m'auront grandement influencés et me serviront certainement au cours des prochaines années. Ayant favorisé la participation à des congrès scientifiques annuels dans plusieurs pays d'Europe, il m'a fait découvrir de beaux endroits qui ont alimenté mon désir de voyager! Je garde de lui le souvenir d'une personne acharnée, travaillante, cultivée, fiable et disponible. J'espère garder une proximité dans les années à venir...

J'adresse ma reconnaissance au président-rapporteur de cette thèse, Dr Jacques De Champlain, au membre du jury, Dr Patrick Du Souich ainsi qu'au représentant du doyen de la FES, Dr Denis deBlois. Je remercie également l'examinateur externe, Dr Paul M. Vanhoutte, pour avoir accepté d'évaluer cet ouvrage et principalement pour avoir franchi les milliers de kilomètres qui séparent Hong-Kong (Chine) de Montréal pour venir assister à la soutenance de cette thèse malgré la température hivernale.

Je voudrais également remercier Nathalie Trescases-Thorin, une compagne et amie de travail. Nathalie est une personne intelligente, sensible, attentionnée et soucieuse des gens qui l'entoure. Elle est pour moi un exemple à suivre quant à sa façon de travailler... l'organisation et la logistique au labo ne sont pas des secrets pour Nathalie! J'ai toujours apprécié les discussions constructives, mais également celles un peu plus « légères » et purement « féminines » que nous pouvions avoir ensemble! Au plaisir de se revoir, peut-être bien dans les allées du marché Jean-Talon ou celles du Ikea!

Je voudrais maintenant remercier, par ordre d'ancienneté, mes très chers collègues et ami(e)s... il faut toujours éviter la chicane! Nada sera dans le labo pour encore quelques années puisqu'elle a pris la décision de s'inscrire au doctorat après avoir rempli le rôle d'assistante de recherche et d'étudiante à la maîtrise. Nada est une personne surprenante de qui il me reste encore beaucoup à apprendre. Nada est une jeune femme habile et travaillante avec qui j'ai eu quelques discussions qui m'ont souvent amené à réfléchir et à m'ouvrir davantage sur certains aspects de notre réalité.

Guillaume est à mes côtés depuis le début de mes études doctorales et a été le premier et seul étudiant du genre masculin à occuper un poste permanent d'étudiant gradué dans le labo! Guillaume est quelqu'un de dévoué, sensible, écoutant, calme, attentionné, disponible et drôle. Nous avons pu partager ensemble des discussions de toutes sortes, que ce soit à propos de nos escapades du weekend dernier ou de nos fameuses expériences de qPCR! Je suis heureuse d'avoir Guillaume dans mon entourage.

Stéphanie est ma collègue, confidente et bonne amie de tous les jours au labo. Steph est une personne intelligente, travaillante, curieuse et spontanée. Nous avons passé ensemble de bons moments que ce soit à discuter de nos expériences scientifiques ou de nos expériences de vie! Steph est une personne qui connaît le chemin à venir et qui saura certainement atteindre ses objectifs. J'espère ne pas trop m'éloigner car nous avons encore beaucoup de chose à se raconter.

Annick est notre cadette au doctorat... mais qui fait assurément son chemin comme nous tous l'avons fait! Annick est une personne organisée et secrète. La sensibilité d'Annick fait d'elle une personne respectueuse et attentionnée pour son entourage. J'ai eu l'occasion de découvrir et de connaître sa personnalité lors d'activités sportives, de congrès et de projets communs. Nous aurons certainement l'opportunité de nous revoir.

Je voudrais également remercier les collaborateurs qui ont participé à l'obtention et à l'analyse de certains résultats de cette thèse : Dr Yahye Merhi, Dr Jean-François Théorêt, Maya Mamarbachi, Louis Villeneuve et Marc-Antoine Gillis.

Je voudrais certainement remercier mes parents pour leur présence et leur support. Ma mère et mon père ont toujours été présents pour m'encourager et me féliciter tout au long de mon cheminement universitaire. Mon frère, Philippe, a également toujours été présent pour moi, surtout lors de ses dernières années lors desquelles nous nous sommes particulièrement rapprochés. Je suis heureuse de vous avoir tous auprès de moi. Vous êtes ma famille et je vous adore spécialement.

Finalement, je voudrais remercier mon amoureux, Alex, avec qui je partage ma vie depuis plus de neuf ans. Alex a toujours été présent pour m'écouter, me conseiller, me reconforter et m'encourager. Alex est quelqu'un d'intelligent, de fidèle, d'honnête, de simple et de drôle, dont je ne pourrai jamais me lasser. Je « *t'aimedor* » mon amour et espère être à tes côtés le plus longtemps possible.

Je voudrais aussi remercier les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) pour le soutien financier accordé à ce projet de thèse.

1. Introduction

Dans cette première partie, une revue des principaux sujets traités lors de mes études doctorales sera exposée afin de justifier le projet de recherche. Les thèmes les plus importants seront : l'endothélium vasculaire, le vieillissement, la dyslipidémie, l'athérosclérose, les radicaux libres et les polyphénols. Par la suite, une section expliquant précisément les méthodes utilisées lors de mes études sera présentée et suivie de la présentation des quatre manuscrits scientifiques publiés, soumis ou en préparation. Finalement, une discussion générale intégrant les multiples sujets contenus dans les articles sera présentée ainsi que les perspectives futures potentielles.

1.1. L'endothélium vasculaire

L'endothélium constitue la monocouche de cellules qui tapisse la surface interne des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Le terme « endothélium » a été utilisé pour la première fois par l'anatomiste Wilhelm His en 1865. À cette époque, le mot « endothélium » servait à différencier les cellules qui recouvrent la surface interne des cavités corporelles de celles qui constituent l'épithélium. Sa définition incluait les cellules bordant les vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les cavités bordées de cellules mésothéliales. Par la suite, la définition ne comporta que les cellules longeant la surface interne des vaisseaux sanguins et lymphatiques (Aird, 2007). Les cellules endothéliales sont particulièrement passives si l'on considère leur rythme prolifératif : elles possèdent une durée de vie de plus d'un an (Aird, 2007). La structure, la composition et les fonctions de l'endothélium peuvent varier grandement d'un lit vasculaire à l'autre et même d'une partie de lit vasculaire à l'autre (Aird, 2007; Thorin et Shreeve, 1998). Par exemple, dans certains lits vasculaires tels que ceux du cerveau, des poumons et du cœur, les cellules endothéliales sont intimement connectées l'une à l'autre et reposent sur une membrane basale continue, il s'agit d'un « endothélium continu ». Les cellules endothéliales peuvent également avoir une membrane basale continue, mais être perméables dû à des trous ou à des fenestrations/ouvertures (*fenestrae*; environ 70 nm de diamètre) : il est ainsi appelé « endothélium fenêtré ». Nous retrouvons ce type d'endothélium dans les glandes

endocrines et les reins. Finalement, certains types de vaisseaux sont caractérisés par un endothélium fenêtré, de larges ouvertures (100 à 200 nm de diamètre) et une membrane basale discontinue, un tel endothélium est appelé « endothélium discontinu ». Ce type d'endothélium est particulièrement prédominant dans le foie (Wisse, 1970) (Figure 1).

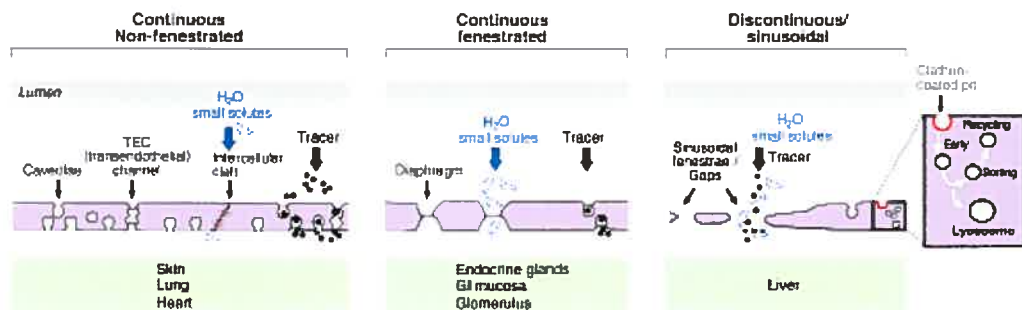


Figure 1. Illustration des différents types d'endothélium (Tiré de Aird, 2007).

De nos jours, il est reconnu que les cellules endothéliales ne sont pas inertes, mais sont très actives métaboliquement. L'endothélium possède diverses fonctions physiologiques qui encore une fois dépendent du lit vasculaire concerné. Premièrement, l'endothélium est responsable du contrôle du passage des cellules sanguines du compartiment sanguin vers les tissus en favorisant l'attachement, le roulement, l'adhésion ferme et la transmigration de celles-ci. Par exemple, lorsqu'une blessure est présente à la surface de la peau, les cellules sanguines, telles que les neutrophiles et les monocytes, sont rapidement recrutées par des cytokines au site lésé en traversant la monocouche de cellules endothéliales. La migration massive de ces cellules a pour effet d'induire une réaction inflammatoire qui a pour objectif de protéger l'organisme et de guérir efficacement la plaie. L'interaction entre les cellules sanguines et les cellules endothéliales est possible grâce à l'induction et la translocation de diverses molécules d'adhésion (E-sélectine, P-sélectine, intégrines, ICAM-1, VCAM-1) à la surface de leur membrane cellulaire (Butcher, 1991; Springer, 1994). La migration des cellules sanguines vers les tissus est un processus

physiologique pouvant également contribuer au développement de plusieurs conditions pathologiques telles que l'athérosclérose (Ross, 1999), l'arthrite rhumatoïde (Weyand et Goronzy, 1997) et plusieurs types d'allergies (Rosenwasser, 2007), lorsque la réaction n'est pas contrôlée.

Les cellules endothéliales sont aussi responsables de la perméabilité vasculaire. En effet, l'endothélium est une couche cellulaire semi-perméable qui ne laisse passer que les fluides, les solutés et quelques macromolécules (par l'intermédiaire de transports spécialisés). La perméabilité vasculaire augmente lors de moments d'inflammation aiguë ou chronique. Dans de tels cas, des substances comme l'histamine, la sérotonine ou le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) sont libérés et induisent un raccourcissement des cellules endothéliales (Majno et Palade, 1961; Majno et al., 1961; McDonald et al., 1999), ce qui augmente l'espace intercellulaire et favorise les phénomènes de transcytose (Feng et al., 2002; Feng et al., 1997). Lors de la transcytose une molécule traverse complètement la cellule endothéliale. Ce type de transport est réalisé par de petites vésicules appelées caveolae ou *via* les jonctions entre les cellules. Par exemple, la transcytose permet le passage des lipoprotéines de faible densité (LDL) vers l'espace sous-endothélial (Frank et Lisanti, 2004), un évènement très important dans le processus d'athérogenèse qui sera abordé ultérieurement. Les cellules endothéliales possèdent également des vésicules recouvertes de clathrine (protéine qui forme la paroi des vésicules d'endocytose) et des lysosomes qui participent au phénomène d'endocytose. Les processus d'endocytose surviennent soit de manière non-spécifique ou par l'intermédiaire de récepteurs et ont pour but de détruire dans les lysosomes, de recycler à la surface cellulaire ou d'entreposer dans des organelles intracellulaires des substances/molécules. Par exemple, le phénomène d'endocytose est utilisé par les cellules endothéliales afin d'incorporer dans leur membrane cellulaire le cholestérol circulant (Goldstein et al., 1985). Selon le lit vasculaire, ces différents modes de transport sont plus ou moins présents.

L'endothélium vasculaire contribue également au maintien de l'homéostasie de la coagulation, c'est-à-dire de maintenir le sang dans un état fluide puisque la disparition de l'endothélium induit immédiatement la formation de caillots sanguins. Les cellules endothéliales libèrent des substances anti-coagulantes telles que : l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, le sulfate d'héparan, la thrombomoduline, le récepteur endothélial de la protéine C, l'activateur tissulaire du plasminogène, la prostacycline (PGI₂) et le monoxyde d'azote (NO). À l'opposé, les facteurs pro-coagulants libérés par l'endothélium sont : le facteur tissulaire, le *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (PAI-1), le facteur de von Willebrand et les récepteurs activés par les protéases (Aird, 2001).

L'angiogenèse, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins ou lymphatiques à partir de vaisseaux déjà existants, est une autre fonction contrôlée par l'endothélium. Elle nécessite la présence du VEGF, un facteur de croissance endothélial. Suite à l'enclenchement du processus angiogénique par le VEGF, les angiopoïétines (Ang)-1/2 ainsi que quelques membres de la grande famille des éphrines sont recrutés afin de poursuivre la formation et la maturation des vaisseaux, notamment lorsque les cellules endothéliales débutent leur interaction avec les cellules de support telles que les cellules musculaires lisses et les péricytes (Gale et Yancopoulos, 1999; Yancopoulos et al., 2000).

Finalement, l'endothélium contribue à la régulation du tonus vasomoteur et ainsi libère des facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs. C'est en 1980 que Furchgott et Zawadzki ont démontré que la relaxation du muscle lisse induite par l'acétylcholine est dépendante d'un endothélium intact (Furchgott et Zawadzki, 1980). Ce n'est que 7 ans plus tard que la véritable identité du facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF) a été reconnue comme étant le NO (Ignarro et al., 1987; Khan et Furchgott, 1987). Il est maintenant reconnu que le NO n'est pas le seul EDRF. L'endothélium génère également de la PGI₂ (Moncada et al., 1976) et un facteur hyperpolarisant (EDHF) dont la nature est encore débattue (Feletou et Vanhoutte, 2006). De plus, en conditions physiologiques et surtout pathologiques, l'endothélium peut libérer des facteurs constricteurs dérivés de

l'endothélium (EDCF) tels que la thromboxane A_2 (TXA_2), l'angiotensine, l'anion superoxyde (O_2^-), l'endothéline et des prostaglandines (PDG) (Vanhoutte et al., 2005).

1.1.1. Les facteurs vasodilatateurs dépendants de l'endothélium

1.1.1.1. Le monoxyde d'azote

Le NO est un gaz soluble produit par les cellules endothéliales, mais également par les macrophages et par certains neurones spécifiques du cerveau. Le NO possédant une demi-vie très courte, de l'ordre des secondes, n'agit que sur les cellules avoisinant son site de production (Garcia et Stein, 2006). Le NO est formé à partir de la L-arginine par les NO synthases (NOS). Sa formation est parallèle à celle de la L-citrulline et nécessite des cofacteurs comme la tétrahydrobioptérine (BH_4), des flavines mononucléotides (FMN), des flavines adénine dinucléotides (FAD) et de la NADPH. Suite à sa production, le NO diffuse et se lie à la guanylate cyclase au niveau du muscle lisse afin de produire du guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et d'induire ultimement la vasodilatation (Denninger et Marletta, 1999). Il existe trois types de NOS : endothéliale (eNOS, NOSIII), neuronale (nNOS, NOSI) et inducible (iNOS, NOSII). La eNOS et la nNOS sont constitutivement exprimées et requièrent la présence de calcium et de calmoduline pour être activées. À l'opposé, la iNOS est induite seulement suite à un stimulus tel qu'une cytokine par exemple et ne dépend pas de la présence de calcium pour être activée. De plus, les différents isoformes diffèrent en ce fait que l'activation de la iNOS produit une quantité supérieure de NO (de l'ordre du nanomolaire) comparativement aux isoformes de NOS constitutives (de l'ordre du picomolaire) (Garcia et Stein, 2006).

Les cellules endothéliales produisent du NO de manière constitutive (Fleming et al., 1996), cependant cette production peut être amplifiée, de manière expérimentale et physiologique, par plusieurs substances telles que l'acétylcholine, la bradykinine et l'histamine (Govers et Rabelink, 2001; Marletta, 2001). La libération de NO par les cellules

endothéliales peut également être induite par une augmentation des forces de cisaillement (*shear stress*) à la surface des cellules (Xiao et al., 1997). La liaison d'un agoniste à son récepteur ou les forces de cisaillement induisent une augmentation de calcium dans la cellule, ce qui stimule les formes constitutives de NOS et induit la production de NO (Fleming et al., 1997; Fleming et Busse, 1999).

En plus de participer à la régulation du tonus vasomoteur, le NO est impliqué dans plusieurs processus physiologiques. Il participe, entre autre, à la neurotransmission, au processus de guérison, aux réponses immunes non-spécifiques contre les infections, à la défense de l'hôte et à la cytotoxicité (Nathan et Xie, 1994).

1.1.1.2. La prostacycline

La PGI₂ est le principal métabolite de l'acide arachidonique (AA) produit par les cyclooxygénases (COX: prostaglandine H synthases) dans les cellules endothéliales (Moncada et Vane, 1979). La PGI₂, formée par les COX active les récepteurs IP (Coleman et al., 1994) sur les cellules musculaires lisses et produit la relaxation par l'induction de l'adénylate cyclase et la formation subséquente d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Les effets de la PGI₂ sont intimement liés à ceux du NO. En effet, il semblerait que la PGI₂ facilite la relâche de NO et qu'en revanche le NO potentialise les effets de la PGI₂ dans le muscle lisse. Ceci est possible puisque le NO augmente la production de GMPc et favorise l'inhibition de la phosphodiesterase qui est responsable de la dégradation de l'AMPc, l'effecteur de la PGI₂ (Delpy et al., 1996). Dans certains types d'artères ou certaines espèces, la PGI₂ peut induire une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses par l'ouverture de canaux potassiques. Parmi ceux-ci nous comptons les canaux potassiques dépendants de l'ATP (K-ATP), les canaux potassiques à large conductance dépendants du calcium (BK_{Ca}), les canaux potassiques à rectification entrante (K_{IR}) et les canaux potassiques sensibles au voltage (K_V) (Feletou et Vanhoutte, 2006).

1.1.1.3. Le facteur hyperpolarisant

Un troisième facteur pouvant induire une dilatation dépendante de l'endothélium a été identifié dans plusieurs lits vasculaires: l'EDHF (Félétou et Vanhoutte, 2006; Vanheel et Van de Voorde, 2000). Puisqu'en présence d'inhibiteurs spécifiques des NOS et des COX une réponse dilatatrice dépendante de l'endothélium peut toujours être observée dans certains types d'artères, l'EDHF est souvent défini comme étant le facteur non-NO et non- PGI_2 . Il a été observé que la stimulation par un agoniste des récepteurs couplés aux protéines G ou l'ajout de calcium ionophore A 23187, augmentent les concentrations intracellulaires de calcium, hyperpolarisent les cellules endothéliales et dans certains cas hyperpolarise également les cellules musculaires lisses sous-jacentes (Cheung et Chen, 1992; Fukao et al., 1995; Johns et al., 1988; Luckhoff et al., 1988; Marrelli et al., 2003). Dans la plupart des artères, l'hyperpolarisation implique, tout d'abord, l'activation des canaux potassiques dépendants du calcium à petite conductance (SK_{Ca}), et/ou les canaux potassiques dépendants du calcium à conductance intermédiaire (IK_{Ca}) (Corriu et al., 1996; Gluais et al., 2005a; Marrelli et al., 2003) situés sur l'endothélium (Burnham et al., 2002; Bychkov et al., 2002; Eichler et al., 2003), mais pas les BK_{Ca} (Chataigneau et al., 1998; Zygmunt et al., 1997). Par la suite, le transfert de l'hyperpolarisation de l'endothélium vers le muscle lisse peut être réalisé par l'intermédiaire de deux voies possibles : celle des jonctions serrées et celle du nuage d'ions potassiques dans l'espace intercellulaire (Féletou et Vanhoutte, 2006).

Les jonctions serrées (« *gap junctions* » en anglais) sont formées par la liaison de deux complexes présents sur deux cellules adjacentes formant ainsi un pore favorisant le transfert d'ions et de molécules. Ces pores créent une continuité électrique entre les cellules permettant d'obtenir un potentiel de membrane uniforme. Les jonctions localisées entre les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales sont appelées jonction myo-endothéliales (Beny et Pacicca, 1994; Coleman et al., 2001; Dora et al., 1997; Emerson et Segal, 2000a; Marchenko et Sage, 1994; Yamamoto et al., 1998; Yamamoto et al., 1999).

Comme l'hyperpolarisation des cellules endothéliales et l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses suivent une séquence temporelle, il est légitime de penser que les jonctions serrées puissent contribuer au passage de l'hyperpolarisation d'un type cellulaire à l'autre (Beny, 1990; Emerson et Segal, 2000b). Dans plusieurs lits vasculaires, l'utilisation de bloqueurs des jonctions serrées inhibe partiellement ou complètement la réponse à l'EDHF (Edwards et al., 1999; Taylor et al., 1998; Yamamoto et al., 1998). De plus, les souris déficientes pour la connexine 40, une protéine constituante des jonctions serrées, sont hypertendues et démontrent une réduction des dilatations dépendantes de l'endothélium suite à l'ajout d'un agoniste ou d'une stimulation électrique (de Wit et al., 2000; de Wit et al., 2003). L'incorporation dans l'endothélium d'anticorps dirigés contre la connexine 40 bloque aussi les effets de l'EDHF (Mather et al., 2005). Toutefois, la contribution des jonctions serrées dans la réponse à l'EDHF semble minime, suggérant l'existence de d'autres candidats (Siegl et al., 2005).

Dans plusieurs cas, la formation d'un nuage d'ions potassiques contribue à la réponse dépendante de l'EDHF. Dans ce cas, l'ouverture des canaux IK_{Ca} et/ou SK_{Ca} induisent une sortie d'ions potassiques de l'intérieur de la cellule endothéliale vers l'espace extracellulaire. Une légère augmentation des concentrations extracellulaires d'ions potassiques (1 à 15 mM) du côté abluminal induit une relaxation du muscle lisse (Edwards et al., 1998; Haddy et al., 2006). Cette minime augmentation de potassium active les canaux K_{IR} et la pompe sodium/potassium situés sur les cellules musculaires lisses induisant une hyperpolarisation et une relaxation subséquente (Nelson et Quayle, 1995; Prior et al., 1998). La contribution des ions potassiques dans la réponse dépendante de l'EDHF a été démontrée dans plusieurs types d'artères (Edwards et Weston, 2004). Cependant, dans plusieurs lits vasculaires, tels que les artères mésentériques et hépatiques de rat, la présence d'ions potassiques ne produit pas de relaxation ou d'hyperpolarisation du muscle lisse, suggérant que dans ces artères la réponse dépendante de l'EDHF n'est pas assurée par une accumulation d'ions potassiques dans l'espace intercellulaire (Andersson et al., 2000; Doughty et al., 2000; Lacy et al., 2000).

D'autres candidats, moins étudiés, ont également été suggérés par la communauté scientifique. Les produits des cytochromes P450 (particulièrement les P450 2C et 2J) comme les acides époxyéicosatriénoïques (EET) contribuent à la relaxation de plusieurs types d'artères, tels que les artères coronaires (Fisslthaler et al., 1999; Oltman et al., 1998; Quilley et McGiff, 2000). Il a été démontré que les EET hyperpolarisent le muscle lisse des artères coronaires et augmentent la probabilité d'ouverture des canaux BK_{Ca} à la surface des cellules musculaires lisses (Li et Campbell, 1997). Dans plusieurs types d'artère l'utilisation d'inhibiteurs des cytochromes P450 inhibe la dilatation dépendante de l'endothélium résistante à l'ajout d'inhibiteurs des NOS et des COX (Fleming, 2004). Les produits des lipoxygénases tels que les acides hydroxyéicosatétraénoïques (HETE) peuvent également être des substances vasorelaxantes libérées par l'endothélium. Suite à une stimulation, elles diffusent des cellules endothéliales vers les cellules musculaires lisses afin d'activer les canaux BK_{Ca} (Barlow et al., 2000; Faraci et al., 2001; Zink et al., 2001).

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est une substance réactive dérivée de l'oxygène qui peut être produite de façon spontanée ou enzymatique par la superoxyde dismutase à partir du O_2^- . Dépendamment du tissu, des conditions expérimentales et de la concentration, le H_2O_2 peut présenter des propriétés vasodilatatrices ou vasoconstrictrices et hyperpolariser ou dépolariser le muscle lisse (Ellis et Triggle, 2003). En effet, certaines observations laissent supposer que le H_2O_2 est un EDHF, puisqu'en présence d'inhibiteurs des NOS et des COX la dilatation dépendante de l'endothélium est partiellement prévenue et abolie par la catalase (Faraci, 2006; Shimokawa et Matoba, 2004).

Finalement, le peptide natriurétique de type C (CNP) peut induire la relaxation et l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisse et ouvrir les canaux BK_{Ca} (Banks et al., 1996; Wei et al., 1994). Des observations démontrent que dans des artères mésentériques de rats, l'acétylcholine induit la relâche de CNP à partir des cellules endothéliales pour ensuite diffuser vers le muscle lisse où il se lie et active le récepteur de type C. L'hyperpolarisation serait induite par l'activation d'un canal potassique à rectification entrante régulé par une

protéine G. et ce. indépendamment du GMPc (Chauhan et al., 2003). La réelle implication du CNP comme EDHF nécessite cependant encore plusieurs études de confirmation et de validation.

Il est important de noter que chaque type d'EDHF n'est pas nécessairement présent exclusivement dans un type d'artère ou lit vasculaire. Plusieurs EDHF peuvent être présents en même temps afin de produire l'hyperpolarisation (Krummen et al., 2006; Krummen et al., 2005).

1.1.2. Les facteurs vasoconstricteurs dépendants de l'endothélium

1.1.2.1. La thromboxane A₂

La TXA₂ est formé par la TXA₂ synthase à partir de son précurseur, la prostaglandine H₂ (produit par les COX). En se liant à son récepteur TP, la TXA₂ induit une contraction du muscle lisse (Coleman et al., 1994). En condition physiologique, les effets de la TXA₂ sont masqués par l'effet vasodilatateur des EDRF (Auch-Schwelk et al., 1992).

1.1.2.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être produits par les cellules endothéliales et musculaires lisses, principalement en condition pathologique. Dans l'endothélium, les radicaux libres comme le O₂⁻ piègent le NO pour former du peroxynitrite, ce qui engendre une vasoconstriction étant donné que le NO ne peut induire son effet vasodilatateur (Rubanyi et Vanhoutte, 1986; Vanhoutte, 2001). Les radicaux libres peuvent également induire une vasoconstriction en augmentant la concentration de calcium dans le cytosol des cellules musculaires lisses et en sensibilisant les fibres d'actine et de myosine au calcium (Touyz, 2005).

1.1.2.3. L'endothéline

L'endothéline-1 est un peptide de 21 acides aminés possédant un puissant pouvoir vasoconstricteur (Yanagisawa et al., 1988). Dans les vaisseaux sanguins, la pro-endothéline est relâchée à partir des cellules endothéliales et est ensuite convertie en endothéline, sa forme mature, par l'enzyme de conversion de l'endothéline localisée à la membrane de la cellule endothéliale. Plusieurs observations suggèrent que l'endothéline-1 est synthétisée *de novo* en réponse à plusieurs stimuli chimiques (angiotensine II, cytokine) ou physiques (forces de cisaillement, hypoxie) (Rubanyi et Botelho, 1991). Toutefois, il a été démontré dans des cellules endothéliales humaines, de rat et de lapin que l'endothéline-1 est également emmagasinée dans des granules appelées corps de Weibel-Palade (Russell et Davenport, 1999). Deux récepteurs spécifiques pour l'endothéline-1 couplés à des protéines G ont été identifiés : ET_A et ET_B (Sakurai et al., 1992). Le récepteur ET_A est situé sur le muscle lisse, tandis que le récepteur ET_B se trouve également sur l'endothélium. La liaison de l'endothéline-1 au récepteur ET_A active la phospholipase C résultant en une contraction du muscle lisse (Kedzierski et Yanagisawa, 2001). Cependant, la liaison de l'endothéline-1 au récepteur ET_B sur l'endothélium induit la formation et la libération de NO et de PGI_2 , ce qui produit une relaxation. Ainsi, suite à une administration intra-vasculaire d'endothéline-1, une courte baisse de pression suivie d'une puissante vasoconstriction est habituellement observé (Michiels, 2003).

En plus de provoquer une vasoconstriction, l'endothéline-1 est un peptide pro-inflammatoire qui peut induire de la fibrose, du remodelage vasculaire et des dommages vasculaires. Il a été démontré qu'une augmentation d'endothéline-1 est associée à certaines formes d'hypertension et à la défaillance cardiaque (Moe et al., 2003; Touyz et Schiffrin, 2003). Par exemple, le système endothéline est anormalement activé dans l'hypertension pulmonaire artérielle (Michel et al., 2003). De par ce fait, des antagonistes sélectifs ou non-sélectifs pour chacun des récepteurs de l'endothéline-1 ont été développés. Les effets bénéfiques que procurent les antagonistes des récepteurs de l'endothéline-1 sont multiples.

En plus de réduire le tonus vasculaire pulmonaire, ils améliorent le remodelage vasculaire en réduisant l'hypertrophie de la média et en augmentant le diamètre de la lumière (Jasmin et al., 2001; Michel et al., 2003; Prie et al., 1998).

1.2. Le vieillissement de l'endothélium vasculaire

1.2.1. Les théories du vieillissement

Le vieillissement consiste en l'accumulation de diverses modifications au sein de notre organisme qui augmentent la probabilité de décès. Ces modifications peuvent être attribuées au développement, à des déficiences génétiques, à l'environnement, à certaines pathologies et/ou au processus de vieillissement en tant que tel. Plusieurs théories visant à expliquer le vieillissement ont été développées (Hayflick, 1985; Holliday, 1995; Medvedev, 1990; Rockstein et al., 1974; Warner et al., 1987). Les théories les plus populaires stipulent que le vieillissement est causé par des liaisons moléculaires croisées (Bjorksten, 1968), des changements au niveau des fonctions immunologiques (Walford, 1969), des gènes de sénescence compris dans le génome (Warner et al., 1987), le raccourcissement des télomères (Kruk et al., 1995) ou des dommages induits par des réactions radicalaires (Harman, 1993). La théorie du vieillissement par les radicaux libres (« *The free radical theory of aging* ») a été proposée par Denham Harman en 1956 (Harman, 1956). Sa théorie propose que le vieillissement est causé par les radicaux libres qui endommagent l'ADN, oxydent les protéines et induisent la peroxydation des lipides. Ces dommages s'accumulent au cours des années et mènent au dysfonctionnement graduel des systèmes physiologiques. À ce jour, aucune théorie n'est généralement acceptée dans sa totalité et la véritable nature des mécanismes responsables du vieillissement reste encore inconnue.

1.2.2. La dysfonction endothéliale

Plusieurs études chez l'humain et l'animal démontrent que la dilatation dépendante de l'endothélium est progressivement réduite lors du vieillissement. Cette baisse de la fonction endothéliale a été observée dans plusieurs types d'artères humaines : les artères coronaires (Egashira et al., 1993), l'artère brachiale (Taddei et al., 1995), l'artère basilaire (Hatake et al., 1990), mais également dans des artères de plus petit calibre (Lyons et al., 1997; Singh et al., 2002). Une diminution de la fonction endothéliale a également été notée dans plusieurs modèles animaux. En effet, une diminution de la dilatation dépendante de l'endothélium associée au vieillissement a été observée chez le rat (Csiszar et al., 2002; Geary et Buchholz, 2003; Hongo et al., 1988; Küng et Lüscher, 1995; Muller-Delp et al., 2002), le porc (Murohara et al., 1991) et la souris (Blackwell et al., 2004; Gendron et al., 2007). On peut donc affirmer que le vieillissement physiologique, sans aucune association avec des facteurs de risque, mène à une diminution de synthèse et/ou de relâche des facteurs vasorelaxants dérivés de l'endothélium. Il se pourrait également, que lors du vieillissement, il y ait une augmentation de la dégradation de ces facteurs et/ou une diminution de la sensibilité du muscle lisse à réagir suite à une stimulation. Il est peu plausible que la baisse de réactivité soit due à cette dernière, puisque les dilatations indépendantes de l'endothélium au nitroprussiate de sodium (SNP) ou d'autres dérivés nitrés restent le plus souvent inchangées avec le vieillissement (Egashira et al., 1993; Hatake et al., 1990; Muller-Delp et al., 2002; Murohara et al., 1991; Taddei et al., 1995).

Tous les EDRF peuvent être affectés par le vieillissement. Nous avons récemment démontré que dans l'artère rénale de souris la contribution du NO diminue avec le vieillissement et que celle de l'EDHF reste constante (Gendron et al., 2007). Heymes et collaborateurs ont observé une diminution de la dilatation dépendante au NO en plus d'une augmentation de la synthèse de PGI₂ dans l'aorte de rat âgé ainsi qu'une augmentation de l'expression de la COX-2 (Heymes et al., 2000). Une augmentation de l'expression de la

prostaglandine H synthase-1 et de la prostacycline synthase a été reportée dans l'aorte de rat Wistar-Kyoto âgé (Numaguchi et al., 1999). Cependant, certaines études ont démontré une diminution de la contribution de la PGI_2 chez l'humain et le rat âgé normotendu ou hypertendu (Gotoh et al., 1983; Hornyk et al., 1991; Lennon et Poyser, 1986). De plus, une diminution progressive de la contribution des canaux potassiques lors du vieillissement a été constatée chez le rat âgé et cette contribution est abolie si les rats sont hypertendus (Mantelli et al., 1995). Le degré d'altération de la dilatation dépendante de l'endothélium ainsi que les types d'EDRF affectés par le vieillissement varient selon l'espèce, le lit vasculaire, l'âge de l'animal et les conditions expérimentales.

1.2.3. Le stress oxydant

Plusieurs études démontrent une augmentation vasculaire de la production de O_2^- ainsi que d'autres espèces oxygénées réactives lors du vieillissement (Blackwell et al., 2004; Csiszar et al., 2002; Finkel et Holbrook, 2000; Hamilton et al., 2001; Harman, 2003). Puisque l'utilisation d'antioxydants induit une amélioration de la dilatation dépendante de l'endothélium, il est raisonnable d'affirmer que les radicaux libres sont, du moins en partie, responsables de l'apparition de la dysfonction endothéliale associée au vieillissement (Csiszar et al., 2002; Gendron et al., 2007). Il est connu qu'une certaine quantité de O_2^- fuit continuellement des mitochondries, et cette quantité augmente avec l'âge. Puisque l'ADN mitochondrial est constamment et progressivement exposé à des concentrations de plus en plus importantes de O_2^- celui-ci devient endommagé et dysfonctionnel (Finkel et Holbrook, 2000; Harman, 2003; Vina et al., 2003). Ceci a pour conséquences de réduire le nombre de mitochondries, d'altérer l'expression des protéines mitochondriales ainsi qu'induire la formation de protéines dysfonctionnelles, menant à une réduction de l'énergie cellulaire disponible et à la formation supplémentaire de radicaux libres.

Il a été démontré que la consommation en oxygène et le vieillissement sont deux éléments qui corrélerent positivement (Halliwell et Gutteridge, 1999). Par exemple, les

abeilles reines vivent 50 fois plus longtemps que les abeilles ouvrières car ces dernières dépensent plus d'énergie et donc d'oxygène. Les mouches se retrouvant dans les maisons vivent plus longtemps que leurs consœurs vivant à l'extérieur puisqu'elles volent moins et consomment moins d'oxygène. Les animaux de grande taille consomment moins d'oxygène par unité de poids que les animaux de petite taille et vivent plus longtemps. Il a été démontré qu'une restriction calorique influence le vieillissement et est associée à une meilleure capacité de réparation de l'ADN, à une diminution de la production de radicaux libres et à des niveaux plus faibles de dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides. Les animaux présentant une plus grande longévité possèdent des systèmes de défenses antioxydants supérieurs aux animaux vivant moins longtemps (Valko et al., 2007).

Plusieurs enzymes sont responsables de la formation des radicaux libres lors du vieillissement. Les NOS lorsque découplées (dû à un manque de cofacteurs tel que la BH₄ peuvent produire des quantités importantes de radicaux libres au lieu du NO (Landmesser et al., 2003)). La xanthine oxidase ainsi que la NADPH oxidase peuvent également engendrer la formation de radicaux libres (Chung et al., 1999; Deshpande et al., 2003; Geiszt et al., 2000). Finalement, le système cytochrome P450, lorsque découplé, peut produire des quantités importantes de radicaux libres (Fleming et al., 2001; Hanukoglu, 2006; Puntarulo et Cederbaum, 1998). La perte d'électrons par la chaîne de respiration mitochondriale est considérée comme une source majeure de radicaux libres dans la cellule (Genova et al., 2003; Turrens, 2003; Vinogradov et Grivennikova, 2005). Seulement 0.15% des électrons provenant du découplage des cytochromes P450 participent à la formation de peroxyde d'hydrogène dans la cellule. Toutefois, cette seule production de peroxyde d'hydrogène serait suffisante pour causer l'accumulation de dommages oxydatifs pouvant mener au vieillissement (St-Pierre et al., 2002).

En plus d'être associé à une augmentation de la production de radicaux libres, le vieillissement vasculaire est associé à une diminution de l'efficacité des systèmes antioxydants cellulaires endogènes. Une réduction d'expression de la superoxyde dismutase

(SOD) a été observée dans un modèle de vieillissement chez le rat (Barton et al., 1997). De plus, les niveaux sériques de glutathion (GSH) ainsi que l'activité des enzymes liées au GSH sont réduits lors du vieillissement (Cho et al., 2003; Yu et Chung, 2001b). Cependant, dans plusieurs cas, une augmentation des défenses antioxydantes a été observée en réponse à une augmentation du stress oxydant. Par exemple, l'activité de la SOD tend à être plus élevée dans les tissus présentant un métabolisme élevé (Yu et Chung, 2006). De façon similaire, le GSH, la GSH peroxydase et la GSH réductase sont augmentés dans les poumons de rats exposés à l'ozone ainsi qu'en présence d'une concentration accrue d'oxygène (Chow, 1988). Chez des animaux exposés à des tensions d'oxygène élevées pendant plusieurs jours, une augmentation de la SOD, catalase, GSH peroxydase et GSH réductase a été observée. Il est suggéré que ces réponses tenteraient de compenser et d'assurer la survie de l'organisme en se protégeant contre les attaques oxydantes environnementales (Fisher et al., 1984).

Les radicaux libres diminuent la dilatation dépendante de l'endothélium en réduisant la biodisponibilité des EDRF (NO, PGI₂ et EDHF) ou en inhibant l'expression ainsi que l'activité des enzymes responsables de leur production. Plusieurs études relatives au vieillissement ont démontré une augmentation simultanée de O₂⁻ et de NO résultant en la production de peroxy-nitrite (ONOO⁻). La génération de peroxy-nitrite a pour effet de diminuer la biodisponibilité du NO et de provoquer un découplage de la eNOS (induit une réduction de la synthèse de NO et une production accrue de O₂⁻) (Csiszar et al., 2002; van der Loo et al., 2000). Il a également été démontré que l'EDHF peut être inhibé par une production élevée de radicaux libres et/ou de peroxy-nitrite (Krummen et al., 2006; Liu et al., 2006; Liu et Gutterman, 2002a; b; Liu et al., 2002). De plus, la PGI₂ synthase peut être inactivée par nitration, dû à une quantité excessive de radicaux libres et de NO généré (Schmidt et al., 2003). Cependant, le contraire a aussi été observé. Des études démontrent, en condition de septicité induite par les lipopolysaccharides (LPS) ou en présence accrue de radicaux libres, une activation de la PGI₂ synthase, une augmentation de l'expression des

cyclooxygénases et une élévation de la production de PGI₂ (Gendron et al., 2007; Halushka et al., 1985; Schildknecht et al., 2004).

Finalement, des études récentes concernant le stress oxydant démontrent que la régulation des gènes est altérée lors du vieillissement. La voie des MAP kinases et l'activité de certains facteurs de transcription sensibles à l'environnement rédox, comme le NFκB et l'AP-1, sont inhibés ou activés par une production massive de radicaux libres (Kim et al., 2002a; Kim et al., 2002b; Yu et Chung, 2001a).

1.2.4. L'apparition d'un phénotype pro-athérosclérotique

Des études épidémiologiques démontrent le lien entre le vieillissement et le développement de l'athérosclérose (Orlandi et al., 2006). Les artères de sujets âgés sont plus susceptibles à des stimuli athérogéniques que les artères de sujets jeunes. Tout d'abord, plusieurs changements structurels relatifs à la paroi vasculaire surviennent lors du vieillissement. Un épaissement de la tunique intimale, comprenant l'endothélium et l'espace sous-endothélial limité par la lame basale, apparaît dans la plupart des types d'artères lors du vieillissement (Movat et al., 1958; Orlandi et al., 1993; Tracy et al., 1979; Virmani et al., 1991). Chez les humains, les primates et les rongeurs, l'épaissement de l'intima augmente considérablement avec l'âge (Hoover et al., 1982; Orlandi et al., 1993). L'épaissement de l'intima consiste en la formation lente et progressive de plusieurs couches de cellules musculaires lisses sous l'endothélium. Les cellules musculaires lisses y présentent des changements phénotypiques importants tels une forme arrondie et la présence augmentée d'organelles cytoplasmiques ainsi qu'un large réticulum endoplasmique rugueux (Gerrity et Cliff, 1972; Mosse et al., 1986; Takaichi et al., 1993; Wolinsky, 1972). Des fibres élastiques et du collagène provenant de la matrice extracellulaire s'accumulent également. Des dépôts de cholestérol, de phospholipides et de cellules spumeuses (« *foam cells* ») peuvent être aperçus chez l'humain lors de l'épaissement de la tunique intimale dès l'âge de trente et quarante ans, mais est plus

probable vers l'âge de cinquante ans (Geer et Haust, 1972; Movat et al., 1958). L'activité, c'est-à-dire la migration et la prolifération, des cellules musculaires lisses est également augmentée lors de ce processus (McCaffrey et al., 1988; Patek et al., 1968). Le remodelage de l'intima est associé à une augmentation de l'expression des métalloprotéinases (MMP), du *Transforming Growth Factor β -1* (TGF β -1) et de ICAM-1 (Jacob, 2003; Li et al., 1999). Les changements structurels associés au vieillissement qui surviennent dans l'intima, tel que son épaissement, favorisent l'apparition d'un site idéal pour le développement de lésions athérosclérotiques et le dépôt de lipides. En effet, suite à une alimentation riche en gras, des lapins âgés développent plus facilement des lésions athérosclérotiques que des jeunes lapins (Spagnoli et al., 1991).

Évidemment, les fonctions de l'endothélium sont altérées par le vieillissement et ceci contribue à l'apparition du phénotype pro-athérogénique. Comme la perméabilité des cellules endothéliales est augmentée lors du vieillissement, les protéines plasmatiques peuvent traverser la couche cellulaire et collaborer à l'épaississement de la paroi. La dysfonction endothéliale est également caractérisée par une diminution de la production et de la relâche de facteurs vasorelaxants, ainsi la biodisponibilité du NO est compromise. Il en résulte un tonus vasculaire augmenté ainsi qu'une prédisposition à l'athérosclérose (Vallance et Chan, 2001). L'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium est également altérée avec le vieillissement. Cela a été observé sur l'endothélium d'aorte de rat (Li et al., 1999) et favorise l'adhésion des leucocytes chez le lapin (Orlandi et al., 2000). Chez l'humain, les niveaux de molécules d'adhésion solubles corrént positivement avec l'âge (Morisaki et al., 1997).

La media est également modifiée lors du vieillissement et favorise le développement de l'athérosclérose. Tout comme l'intima, la média s'épaissit, mais voit son nombre de cellules diminuer, sa composition en collagène augmenter et celle en élastine s'accroître (Atkinson, 1998; Cliff, 1970; Orlandi et al., 1993; Spina et al., 1983).

Les produits de glycation avancés (« *Advanced Glycation End products* »; AGE) sont le résultat de changements complexes survenus lors de la glycation non-enzymatique de protéines par le glucose (Wautier et Schmidt, 2004). La présence de AGE dans la paroi vasculaire augmente avec le vieillissement (Schleicher et al., 1997), ce qui augmente la rigidité de la paroi vasculaire (Bucala et Cerami, 1992; Wautier et Schmidt, 2004), favorise la relâche de cytokines ainsi que de facteurs de croissance (Bucala et Cerami, 1992) et altère la dilatation dépendante au NO (Bucala et al., 1991). Par leur présence, les AGE contribuent à favoriser un phénotype pro-athérogénique.

L'apoptose est également un événement important dans le processus de vieillissement et l'apparition d'un phénotype pro-athérogénique. Le nombre de cellules apoptotiques dans la paroi vasculaire de jeunes sujets est faible. Cependant, la susceptibilité des cellules musculaires lisses à entrer en apoptose augmente avec le vieillissement dû aux divers changements environnementaux tels que l'augmentation de la production des radicaux libres, l'accroissement des dommages à l'ADN et l'activité plus marquée des MAP kinases (Orlandi et al., 2006). Toutefois, il est important de mentionner que l'apoptose lors du vieillissement n'est pas uniquement nuisible. En effet, l'apoptose contrairement à la nécrose permet que le contenu des cellules mortes soit encapsulé et éliminé par des phagocytes. Ceci empêche la relâche d'enzymes de dégradation dans l'espace intercellulaire et la formation subséquente de réactions inflammatoires (Arends et Wyllie, 1991; Ellis et al., 1991). L'apoptose est également nécessaire à l'homéostasie tissulaire. Elle est en fait une conséquence de la différenciation cellulaire observée chez l'adulte. De plus, l'apoptose permet l'élimination de cellules indésirables ou endommagées, telles que les cellules cancéreuses (Cohen et al., 1992; Ellis et al., 1991; Li et Yuan, 1999; Medh et Thompson, 2000).

Lors du vieillissement les cellules musculaires lisses se différencient et adoptent un phénotype synthétique par leur perte de contractilité (Lundberg et Crow, 1999). Leur teneur en α -actine, desmine et myosine diminue (Bochaton-Piallat et al., 1993). De plus,

des changements au niveau des voies de signalisation intracellulaires sont aussi notés. L'expression de iNOS, NFκB et ICAM-1 est augmentée et suggère un rôle important de la défense cellulaire et de l'inflammation dans le processus de vieillissement (Chan et Fiscus, 2004; Ferrini et al., 2004; Li et al., 1997; Yan et al., 1999).

1.2.5. Les modèles expérimentaux

Différents modèles animaux sont disponibles pour étudier le vieillissement. Parmi ces modèles nous comptons la souris Klotho (Kuro-o et al., 1997). Ce modèle de souris est généré par l'insertion d'un transgène dans le génome de la souris provoquant une mutation dans le gène klotho. Ces souris présentent un syndrome similaire au vieillissement retrouvé chez l'humain. Les souris Klotho possèdent une durée de vie réduite (9 semaines), sont infertiles, ont un retard de croissance, de l'athérosclérose, de l'ostéoporose, de l'emphysème pulmonaire et un épaississement de l'intima des vaisseaux (Kuro-o et al., 1997).

La souris SAM (*Senescence Accelerated Mouse*) est un autre modèle murin utilisé pour étudier le vieillissement (Takeda et al., 1997). Les souris SAM sont obtenues par croisements consanguins continus entre frères et soeurs à partir de 9 lignées sources originales ARK/J présentant une sénescence accélérée (SAMP, senescence-prone) et de 3 lignées de souris ARK/J présentant un vieillissement normal (SAMR, senescence-resistant). Il existe plusieurs lignées différentes dont les caractéristiques sont répertoriées. L'évaluation du degré de sénescence s'effectue en utilisant un système de note qualifiant les différents signes cliniques et les lésions comme étant liés au processus de vieillissement: souplesse de la peau, brillance et perte du poil, lésions du système oculaire, comportement au niveau du temps de réaction. Ce modèle de souris possède une durée de vie d'environ 10 mois et une génétique complexe puisque plusieurs gènes sont impliqués dans le développement du phénotype (Takeda et al., 1997).

La souris Werner est développée par l'insertion d'une mutation dans le gène homologue responsable du syndrome de Werner (syndrome de vieillissement prématuré) chez l'humain. Les souris Werner ont une espérance de vie de 25 mois et présentent des cataractes, une réduction de la prolifération des fibroblastes, un diabète de type II, une dyslipidémie, des problèmes cardiovasculaires et différents cancers (Lebel et Leder, 1998). Elles montrent une densité osseuse plus faible au niveau des membres et elles sécrètent de l'acide hyaluronique en excès. Les cellules (fibroblastes et cellules souche embryonnaires) dérivées de ces souris montrent la même instabilité génétique et érosion télomérique que leurs homologues humains (Lebel et Leder, 1998).

D'autres modèles de souris mimant des syndromes de vieillissement accéléré ont été développés tels que les souris homologues pour le syndrome de Cockayne (Yu et al., 1996) et d'ataxie télangiectasique (Barlow et al., 1996). Ces derniers modèles ne sont pas extensivement utilisés mais pourraient être intéressants dans un contexte où la dysfonction neurologique et le retard de croissance sont des éléments importants.

Les souris déficientes pour la télomérase est un modèle présentant une incapacité des cellules hématopoïétiques et des spermatocytes à proliférer. La troisième génération de ces souris est utilisée pour étudier le vieillissement puisqu'elles développent de l'infertilité, de l'alopecie, des lésions cutanées, une altération de la réponse au stress et une espérance de vie d'environ 18 mois. Toutefois, elles ne présentent pas d'athérosclérose, d'ostéoporose, de cataractes et de diabète (Rudolph et al., 1999).

Tous ces modèles, d'une manière ou d'une autre représentent une situation de vieillissement accéléré et sont donc différents d'un vieillissement dit « normal ». Ainsi, tous ces types de souris ne traversent pas la phase normale de croissance et plusieurs d'entre elles sont infertiles. Le fait que le vieillissement soit accéléré a des conséquences qui diffèrent du vieillissement « normal ». Par exemple, l'ostéoporose survient surtout aux extrémités des membres et non au niveau du bassin. De plus, les souris développent surtout

des cancers de type non-épithélial. Le vieillissement est un phénomène biologique complexe dans lequel plusieurs composantes génétiques et environnementales sont impliquées. Il est donc difficile de croire qu'une seule mutation puisse mimer exactement les caractéristiques du vieillissement. En effet, aucun des modèles précédents ne présente tous les phénotypes du vieillissement. Ainsi, plusieurs groupes ont simplement décidé d'utiliser des souris âgées, sans mutation, afin d'étudier l'effet du vieillissement sur différentes fonctions physiologiques et voies de signalisation. De cette manière, les manipulations génétiques sont évitées, cependant les études doivent s'étaler sur une longue durée, puisque la longévité moyenne d'une souris est de 4 ans.

1.3. La dyslipidémie

La dyslipidémie est un facteur de risque courant. Elle est caractérisée par des niveaux anormaux de lipides et de lipoprotéines sanguins. Le plus souvent, une hypercholestérolémie et/ou hypertriglycéridémie sont observées. Plusieurs types de dyslipidémie peuvent être identifiés. La plupart des dyslipidémies sont caractérisées par des concentrations sanguines élevées de cholestérol total (LDL et triglycérides) et des concentrations faibles de lipoprotéines de forte densité (HDL). Dans la majorité des cas l'hypercholestérolémie est due à une diète riche en matières grasses, à l'obésité, à certains médicaments (diurétiques, bêta-bloqueurs, glucocorticoïdes, cyclosporine), à des désordres affectant le métabolisme des lipoprotéines ou serait d'origine polygénique (Garg et Simha, 2007).

L'absorption du cholestérol est un processus comportant différentes étapes régulées par plusieurs gènes. L'homéostasie du cholestérol est principalement maintenue par un équilibre entre la synthèse *de novo* du cholestérol, l'absorption au niveau intestinal et la synthèse des acides biliaires, l'excrétion du cholestérol biliaire ainsi que la clairance (Burnett et Huff, 2006). À partir du cholestérol contenu dans notre diète, 55% est absorbé et retenu dans notre organisme. Le cholestérol contenu dans notre diète contrôle la synthèse

de novo du cholestérol et le foie est un organe essentiel dans le maintien de cette balance. L'excès de cholestérol contenu dans notre organisme provenant de la synthèse endogène ou de la diète est excrété exclusivement par le foie, soit par excrétion directe en cholestérol libre dans la bile ou par conversion en acides biliaires excrétés comme conjugués d'acide biliaire dans la bile (Wilson et Rudel, 1994).

Suite à l'ingestion de lipides, la digestion débute dans l'estomac par les lipases linguales et gastriques. Les produits issus de l'hydrolyse sont transportés jusqu'au petit intestin où ils se mélangent avec la bile et le jus pancréatique contenant des lipases pancréatiques capables d'hydrolyser les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol estérifié pour former du cholestérol non-estérifié et des acides gras (Burnett et Huff, 2006). En combinaison avec les sels biliaires, les lipides forment des micelles qui facilitent l'absorption à la surface des cellules de l'intestin (entérocytes). À l'intérieur de la cellule, le cholestérol est estérifié (environ 75%) par l'*Acyl coenzyme A :cholesterol acyltransferase* (ACAT). Le cholestérol est ensuite lié à des lipoprotéines (ApoB) et libéré dans la circulation sanguine par le conduit thoracique. Le cholestérol circule dans le sang sous la forme de LDL, VLDL ou HDL. Il est éliminé par le foie ou plus précisément, les hépatocytes *via* les récepteurs des LDL. Les récepteurs des LDL sont formés dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes et sont transportés à la surface membranaire où ils lient spécifiquement les LDL par l'intermédiaire de l'ApoB. Les complexes LDL/récepteurs sont ensuite internalisés par endocytose dans des vésicules de clathrine et dégradés dans des lysosomes. Certains récepteurs sont recyclés à la surface des hépatocytes (Garg et Simha, 2007).

Il existe plusieurs mécanismes associés au transport du cholestérol menant à l'hypercholestérolémie. L'altération de la formation ou de la fonction des récepteurs des LDL est une cause de l'hypercholestérolémie, ce désordre est appelé plus communément hypercholestérolémie familiale. L'hypercholestérolémie familiale est causée par une mutation dans le gène codant pour le récepteur des LDL et est l'un des désordres

métaboliques les plus fréquents. Cette mutation mène à une diminution de la clairance des LDL plasmatiques (Garg et Simha. 2007). Une autre cause de l'hypercholestérolémie est la présence d'une ApoB défectueuse incapable de lier le récepteur des LDL (Garg et Simha. 2007).

L'élévation de LDL sanguin associée à l'hypercholestérolémie prédispose le sujet à l'athérosclérose. En effet, les LDL présentes en excès sont piégées par les parois vasculaires et sont modifiées par oxydation et glycation. Ceci endommage l'endothélium, favorise l'inflammation et contribue à l'amorçement de l'athérogenèse (Griendling et Alexander. 1997; Morel et al.. 1983; Steinberg, 1997).

1.3.1. La dysfonction endothéliale

La dyslipidémie est associée à une dysfonction endothéliale caractérisée par une altération de la dilatation dépendante de l'endothélium induite par l'acétylcholine (Engler et al.. 2003; Kawano et al.. 2002; Zeiher et al.. 1991). Il est suggéré que l'affaiblissement de la dilatation induite par l'acétylcholine chez des patients présentant des facteurs de risque tel que l'hypercholestérolémie, soit due à une diminution de la biodisponibilité du NO (Quyyumi et al.. 1995) résultant d'une baisse d'expression et/ou d'activité de la eNOS ou d'une augmentation de la production de peroxy-nitrites. Il a également été suggéré que la baisse de NO soit due à une augmentation d'ADMA (*Asymmetric DiMethylArginine*), un inhibiteur compétitif endogène de la eNOS (Boger et al.. 1998). La contribution des radicaux libres dans l'apparition de la dysfonction endothéliale a également été démontrée (Cai et Harrison. 2000; Tomasian et al.. 2000). En effet, l'inhibition de la xanthine oxydase, une enzyme capable de produire du O_2^- , améliore la fonction endothéliale chez des patients hypercholestérolémiques (Cardillo et al.. 1997).

1.3.2. Les modèles animaux expérimentaux

Plusieurs modèles animaux ont été développés afin d'étudier la dyslipidémie et l'athérosclérose. Dans cette section, je traiterai uniquement des modèles animaux présentant une dyslipidémie dépourvue de plaques athérosclérotiques. Les modèles utilisés afin d'étudier l'athérosclérose seront présentés dans la section suivante. De plus, je discuterai uniquement des nombreux modèles murins disponibles puisqu'il s'agit du type animal utilisé dans mes travaux. Des revues intéressantes discutant des différents modèles animaux pour la dyslipidémie et l'athérosclérose ont récemment été publiées (Getz et Reardon, 2006; Russell et Proctor, 2006).

La souris déficiente pour SR-B1 est un modèle de souris déficientes pour le récepteur aux HDL de la classe B et du type I. Des variants de ce modèle ont été développés, notamment un modèle de souris déficientes à la fois pour SR-B1 et également pour l'apolipoprotéine-E (Braun et al., 2003). Sous une diète normale, les souris SR-B1 ne développent pas d'athérosclérose et présentent des niveaux de cholestérol 15 fois plus élevés que la normale.

Les souris *db/db* proviennent d'une souche de souris possédant une mutation spontanée du système leptine, l'homologue du gène *cp* humain (Lee et al., 1996). Les souris homozygotes pour la mutation produisent un récepteur possédant un domaine intracellulaire et un site de liaison pour la leptine défectueux. Cette mutation provoque de l'obésité, de la résistance à l'insuline, de l'hyperinsulinémie et de l'hypertriglycéridémie. Ces souris développent une dysfonction endothéliale et vasculaire, une altération de la fonction ainsi que du métabolisme cardiaque, des dommages rétiens et une sclérose glomérulaire (Carley et al., 2004; Chin et al., 2005; Coleman, 1978; Ellis et al., 2003; Srinivasan et al., 2004). Ces souris ne développent pas de lésions et sont davantage un modèle pertinent pour l'étude du diabète.

La souris *ob/ob* produit une leptine défectueuse incapable de se lier à son récepteur (Lee et al., 1996; Zhang et al., 1994). Ces souris sont obèses, résistantes à l'insuline et hypertriglycéridémiques. Ces souris possèdent des dysfonctions cardiaques et vasculaires, mais ne développent pas de lésions (Dong et al., 2006; Mazumder et al., 2004; Naveilhan et al., 2002; Winters et al., 2000). Il s'agit, tout comme la souris *db/db*, d'un modèle intéressant afin d'étudier le système de la leptine et d'analyser le métabolisme du glucose.

La souris hApoB^{+/+} est un modèle de souris transgénique exprimant l'apolipoprotéine B-100 humaine (Purcell-Huynh et al., 1995; Sanan et al., 1998). Sous une diète régulière, ces souris développent une dyslipidémie légère, mais notable. Les niveaux de cholestérol sont 50% plus élevés chez les souris hApoB^{+/+} comparativement à leurs acolytes non-transgéniques. Les niveaux de triglycérides sont, quant à eux, 100% plus élevés. Les souris hApoB^{+/+} ne développent pas de lésions athérosclérotiques (Sanan et al., 1998), mais sont un modèle adéquat afin d'étudier l'impact d'une dyslipidémie modérée.

1.4. L'athérosclérose

Déjà très tôt dans l'existence, *in utero*, il est possible d'observer des dépôts de gras sur les parois de l'aorte, et donc, des manifestations de l'athérosclérose (Napoli et al., 1997). L'athérosclérose est une pathologie silencieuse et progressive qui éventuellement mène à des événements cliniques d'ischémie et d'infarctus du myocarde. L'athérogenèse est un processus complexe comportant plusieurs événements. Trois hypothèses distinctes ont été développées afin d'expliquer et d'illustrer l'athérogenèse. Chacune de ses hypothèses met l'emphase sur certains concepts menant au développement de plaques athérosclérotiques complexes : « *the response-to-injury hypothesis* », « *the response-to-retention hypothesis* » et « *the oxidative modification hypothesis* » (Stocker et Keaney, 2004).

L'hypothèse « *the response-to-injury* » a été proposée par Ross et Glomset. Selon ces auteurs l'évènement initiateur est la dénudation de l'endothélium, ce qui enclenche plusieurs réponses compensatrices qui altèrent les propriétés homéostatiques vasculaires normales (Ross et Glomset. 1973). Cependant, à ce jour il a été montré que l'endothélium reste physiquement intact à la surface des lésions athérosclérotiques (Ross. 1999). Ainsi, l'hypothèse a été révisée et il est maintenant reconnu que la présence d'une dysfonction endothéliale est suffisante pour initier l'athérogenèse (Ross. 1999). La survenue de la dysfonction endothéliale induit une augmentation de la perméabilité qui permet l'adhésion et l'infiltration de leucocytes et de LDL au niveau de l'intima. Par la suite, la formation de cellules spumeuses et le démarrage d'une réponse inflammatoire caractérisée par l'activation de lymphocytes-T, l'adhésion et l'agrégation des plaquettes ainsi qu'une entrée additionnelle de leucocytes et de cellules musculaires lisses (présentes dans la média) dans l'intima est observé. Une accumulation de macrophages et de cellules spumeuses ainsi que la formation d'une capsule fibreuse et de nécrose au centre de la lésion complètent le processus d'athérosclérose (Figure 2).

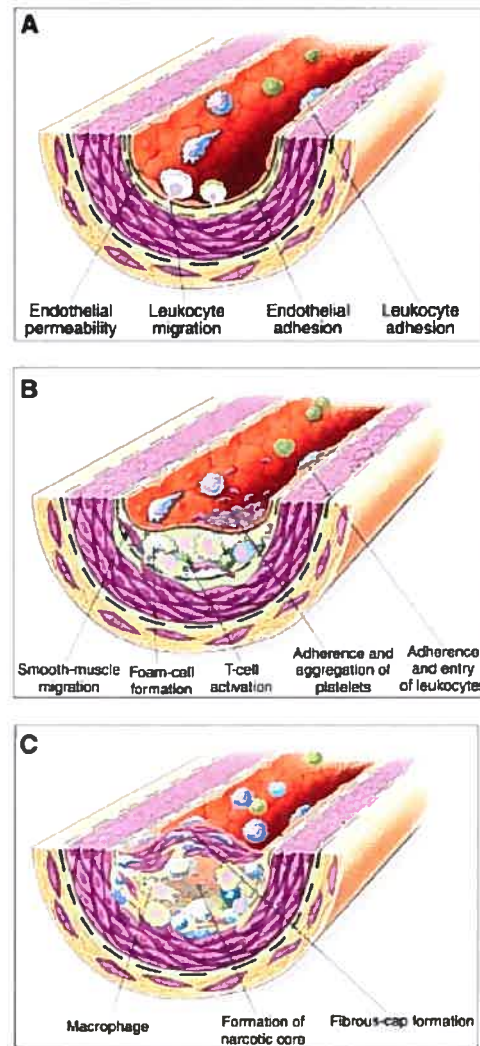


Figure 2. Hypothèse « *the response-to-injury* » (Tiré de Ross, 1999)

L'hypothèse « *the response-to-retention* » stipule que l'évènement déclencheur de l'athérogenèse est plutôt l'accumulation et la rétention de LDL dans l'intima. Tout d'abord, les LDL sont transportées par transcytose (Simionescu et Simionescu, 1993) à travers

l'endothélium vers l'espace sous-endothélial, où elles s'associent avec les protéoglycans par l'intermédiaire de l'apolipoprotéine B-100 (B-48 chez la souris) (Camejo et al., 1993; Veniant et al., 1997; Yla-Herttuala et al., 1987) (Figure 3). Cette association avec les protéoglycans assure la rétention des LDL dans l'intima. Les LDL sont par la suite libérées et forment des micro-agrégats qui sont capturés par les macrophages et les cellules musculaires lisses (Ismail et al., 1994). Les micro-agrégats de LDL induisent également l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, ce qui engendre l'adhésion ainsi que l'infiltration de leucocytes et de monocytes. Lorsque localisés dans la paroi, ces monocytes se différencient en macrophages et capturent les LDL afin de se transformer en cellules spumeuses. La saisie des LDL par les cellules musculaires lisses provoque la prolifération incontrôlée de celles-ci ainsi que leur migration de la média vers l'intima. Tous ces événements contribuent à la formation de lésions athérosclérotiques (Stocker et Keaney, 2004) (Figure 3).

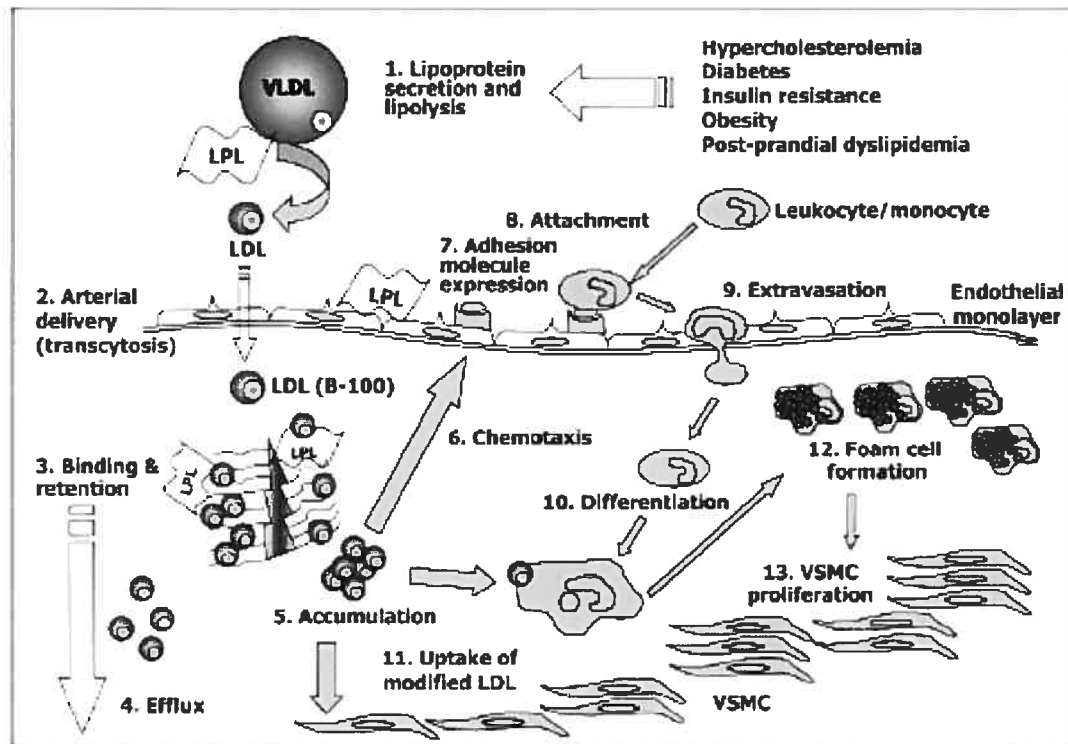


Figure 3. Hypothèse « *the response-to-retention* » (Tiré de Proctor *et al.*, 2002)

L'hypothèse « *the oxidative modification* » propose que les LDL natives ne sont pas athérogéniques en soi, mais que leur oxydation par l'environnement cellulaire est essentiel au déclenchement de l'athérogenèse (Proctor *et al.*, 2002; Stocker *et Keaney*, 2004). Comme illustré sur la figure 4, en premier lieu, les LDL traversent l'endothélium et se logent dans l'intima à des sites favorables au développement de lésions. Pendant et suite à ce déplacement, les LDL sont susceptibles à l'oxydation par leur environnement. Les LDL oxydées stimulent l'adhésion ainsi que l'infiltration des leucocytes et des monocytes (McMurray *et al.*, 1993; Quinn *et al.*, 1987) et empêchent la sortie du côté luminal des macrophages résidents. Les LDL oxydées induisent la formation de cellules spumeuses à partir des macrophages ayant été recrutés, favorisent l'apparition de la dysfonction

endothéliale et la prolifération des cellules musculaires lisses (Stiko-Rahm et al., 1992; Stocker et Keaney, 2004).

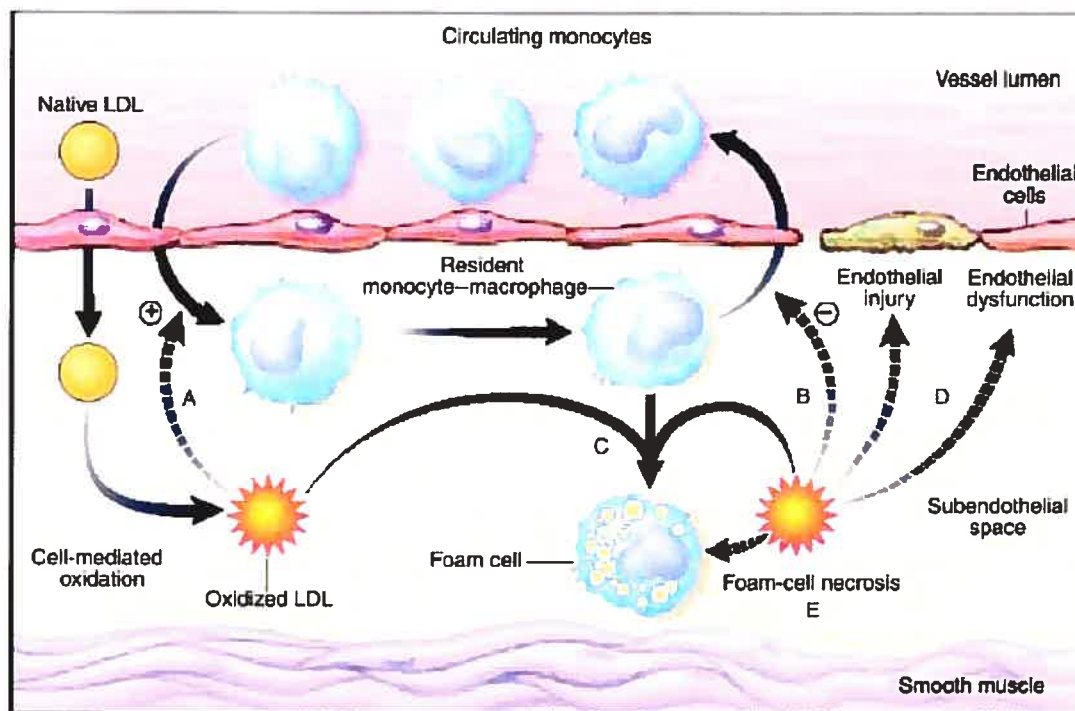


Figure 4. Hypothèse « *the oxidative modification* » (Tiré de Diaz *et al.*, copyright 1997 National Academy of Sciences USA).

Les hypothèses présentées précédemment sont distinctes, en ce sens que l'évènement déclencheur menant à l'athérosclérose est différent pour chacune d'entre elles. Cependant, les trois hypothèses soutiennent que l'inflammation et les LDL sont des éléments centraux. L'hypothèse « *the oxidative modification* » est particulière puisqu'elle est la seule à accorder une importance majeure à l'oxydation, une composante de l'athérogenèse de plus en plus reconnue.

1.4.1. Implication du stress oxydant

Plusieurs études suggèrent que le stress oxydant contribue à l'athérogenèse. Comme mentionné dans la section précédente, l'oxydation des LDL est un élément clé dans l'athérogenèse. En effet, les LDL doivent être oxydées afin d'être internalisées par les « *scavenger* » récepteurs des macrophages (A1, A2, CD68, CD36, SR-B1 et LOX-1) (Krieger, 1997; Krieger et al., 1993). De plus, on retrouve au niveau des lésions athérosclérotiques, plusieurs types de lipides (Brooks et al., 1971; Carpenter et al., 1993; Gilber et al., 1969; Glavind et al., 1952; Harland et al., 1971) et de protéines oxydés (Fu et al., 1998; Heinecke, 1999), indice que le stress oxydant est impliqué dans l'athérogenèse. Les acides gras et le cholestérol sont les principaux lipides oxydés retrouvés dans la paroi vasculaire de sujets ou d'animaux présentant des lésions athérosclérotiques.

Différents antioxydants ont été utilisés afin d'évaluer la contribution des radicaux libres dans le développement de l'athérosclérose. Ceux-ci préviennent l'athérosclérose chez des souris déficientes pour le récepteur aux LDL et l'apolipoprotéine E (Witting et al., 1999). Le *N,N'*-diphényl-phenylenediamine, un composé aniline, réduit l'athérosclérose chez des lapins nourris avec une diète riche en cholestérol (Sparrow et al., 1992) et chez des souris athérosclérotiques (Tangirala et al., 1995). Le BO-653, un antioxydant synthétique dont la structure s'apparente à celle de la vitamine E, prévient l'athérosclérose chez la souris et le lapin athérosclérotique (Cynshi et al., 1998). Le probucol, un agent hypocholestérolémiant possédant des propriétés antioxydantes (Marshall, 1982; Parthasarathy et al., 1986), ralentit (Kita et al., 1987) ou inhibe (Kritchevsky et al., 1971; Sasahara et al., 1994; Tawara et al., 1986; Wissler et Vesselinovitch, 1983) l'apparition de l'athérosclérose dans plusieurs modèles animaux. Afin de s'assurer que les résultats observés n'étaient pas entièrement dus à l'effet hypocholestérolémiant du probucol, plusieurs études ont été contrôlées par un groupe traité avec une statine (Carew et al., 1987) ou avec un analogue du probucol (MDL-29.311) sans propriétés hypocholestérolémiantes.

(Mao et al., 1991) : dans tous les cas, les études ont conclu que le probucol prévient la formation d'athérosclérose par son effet antioxydant.

Le stress oxydant est caractérisé par un déséquilibre entre les sources oxydantes et les défenses antioxydantes en défaveur de ces dernières. Il a été démontré que l'expression de la NADPH oxydase (Barry-Lane et al., 2001; Hathaway et al., 2002; Kalinina et al., 2002; Sorescu et al., 2002; Warnholtz et al., 1999), de la iNOS (Buttery et al., 1996; Luoma et al., 1998), des myéloperoxydases (Heinecke et al., 1993; Podrez et al., 2000), des lipoxigénases (Cyrus et al., 1999; George et al., 2001; Mehrabian et al., 2002; Sendobry et al., 1997; Yla-Herttuala et al., 1990) ainsi que le découplage de la eNOS (Laurson et al., 2001) est augmentée en présence d'athérosclérose. À l'opposé, il a été démontré que l'expression des défenses antioxydantes telles que la SOD ('t Hoen et al., 2003; Luoma et al., 1998; Sentman et al., 2001; Tribble et al., 1997), la catalase ('t Hoen et al., 2003), le glutathion ('t Hoen et al., 2003; Lapenna et al., 1998) et la hème oxygénase (Wang et al., 1998) est réduite, inchangée ou augmentée dépendamment des conditions expérimentales, des tissus étudiés et du stade de la pathologie. Par exemple, les niveaux de EC-SOD, Cu,Zn-SOD, Mn-SOD et de catalase sont augmentés chez des animaux présentant un stade précoce de l'athérosclérose, cependant ils sont diminués à un stade avancé ('t Hoen et al., 2003; Luoma et al., 1998).

Le stress oxydant contribue à l'athérogenèse, non seulement en oxydant les LDL, mais également en augmentant la prolifération des cellules musculaires lisses (Rao et Berk, 1992), en activant les MMP (Rajagopalan et al., 1996b) et en altérant les fonctions endothéliales (voir section 1.4.3.). Ces changements induits par les radicaux libres contribuent également à l'étape finale et possiblement mortelle de l'athérosclérose : la rupture de la plaque. Les radicaux libres, lorsque générés en quantités excessives, induisent l'apoptose et la nécrose des cellules musculaires lisses (Deshpande et al., 2002). Comme la production de radicaux libres est considérable au niveau de la plaque et de la capsule fibreuse, ceux-ci induisent l'apoptose et la nécrose des cellules musculaires lisses s'y

retrouvant, diminuant le nombre de cellules et contribuant ainsi à l'affaiblissement de la plaque. De plus, la production de radicaux libres au sein de la plaque athérosclérotique altère l'intégrité de celle-ci en activant les MMP qui dégradent la matrice, ce qui amoindrit la stabilité de la plaque et peut mener à sa rupture. L'intégrité structurelle de la plaque athérosclérotique est importante, puisque la rupture de la plaque est un événement critique pouvant mener à des événements cardiovasculaires cliniques graves tel qu'un accident vasculaire cérébral (Stocker et Keaney, 2004).

1.4.2. Implication de l'inflammation

L'athérosclérose est une pathologie complexe dont la progression passe par plusieurs étapes, chacune impliquant des aspects concernant l'inflammation (Libby, 2002; Libby et al., 2002). La dysfonction endothéliale associée à l'athérogenèse augmente la perméabilité des cellules et favorise l'adhésion des leucocytes et des plaquettes. De plus, l'endothélium dysfonctionnel génère des substances actives, des cytokines ainsi que des facteurs de croissance et présente des propriétés de pro-coagulation. Une réponse inflammatoire complexe s'en suit, ce qui stimule la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses. La suite des événements est caractérisée par un recrutement supplémentaire de cellules inflammatoires et la relâche massive de cytokines, chemokines et facteurs de croissance (Ross, 1999).

Au début, la réponse inflammatoire tente de protéger l'intégrité de la paroi vasculaire. La séquestration des LDL oxydées par les macrophages est une étape initiale importante du processus inflammatoire qui tente de protéger l'environnement vasculaire (Diaz et al., 1997; Han et al., 1997). Cependant, si cette réponse inflammatoire initiale ne réussit pas à neutraliser la situation, les conditions s'aggravent et le processus inflammatoire vasculaire devient incontrôlable. Advenant ce cas, les médiateurs de l'inflammation tels que le facteur de nécrose tumorale- α (TNF α), l'IL-1 et le *monocyte colony stimulating factor-1* (MCSF-1) augmentent la liaison des LDL à l'endothélium ainsi

qu'au muscle lisse et favorisent la transcription du gène des récepteurs aux LDL (Hajjar et Haberland, 1997; Stopeck et al., 1993). Un cercle vicieux s'ensuit, puisque la liaison des LDL oxydées aux « *scavenger* » récepteurs induit l'activation d'une série d'évènements intracellulaires (Hajjar et Haberland, 1997) tels que la formation et la relâche subséquente de cytokines (Geng et Libby, 1995; Palkama, 1991; Palkama et al., 1993).

La localisation du site inflammatoire est, entre autre, déterminée par les forces de cisaillement et la turbulence du sang. À la bifurcation des artères la turbulence est élevée, ce qui induit l'expression de plusieurs molécules d'adhésion et la production de facteurs de croissance (Lin et al., 1997; Mondy et al., 1997; Nagel et al., 1994; Resnick et al., 1993). Ainsi, le débit sanguin est un élément important qui détermine les sites artériels propices au développement de la plaque athérosclérotique.

Finalement, l'athérosclérose est caractérisée par une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion. L'expression de ICAM-1 et de VCAM-1 est augmentée significativement chez des souris déficientes pour l'apolipoprotéine E (Nakashima et al., 1998). De plus, les souris déficientes pour ICAM-1, la P-sélectine ou CD18, indépendamment ou en combinaison, présentent des lésions moins importantes (Hynes et Wagner, 1996).

1.4.3. La dysfonction endothéliale

Il est généralement accepté que l'athérosclérose est associée à une dysfonction endothéliale caractérisée par une augmentation de la perméabilité, des propriétés pro-coagulantes et pro-adhésives ainsi qu'une diminution de la dilatation induite, entre autre, par le NO. Comme le NO est anti-inflammatoire et anti-agrégant, sa perte contribue au développement de l'athérosclérose. L'inhibition de la eNOS ou l'utilisation de souris déficientes pour la eNOS conduisent à une augmentation de l'adhésion des monocytes sur l'endothélium (De Caterina et al., 1995; Lefler et al., 1999; Tsao et al., 1994). Le NO prévient l'adhésion en empêchant l'expression des molécules d'adhésion et de diverses

chemokines (Tomita et al., 1998; Zeiher et al., 1995). Une relation directe existe entre la perte de NO et la progression de l'athérosclérose. Chez des souris déficientes pour le récepteur aux LDL, l'inhibition de la eNOS accélère l'apparition des lésions athérosclérotiques, cependant l'ajout de L-arginine, le substrat des NOS, ralentit le développement des plaques (Aji et al., 1997). Les propriétés anti-athérosclérotiques du NO ont également été subséquentement démontrées (Chen et al., 2001; Kuhlencordt et al., 2001). En effet, les souris déficientes pour l'apolipoprotéine E et pour la eNOS développent de l'athérosclérose plus rapidement et intensément que les souris uniquement déficientes pour l'apolipoprotéine E (Kuhlencordt et al., 2001).

La dysfonction endothéliale et la perte de NO en présence d'athérosclérose semblent être dus à la formation accrue de radicaux libres (Cai et Harrison, 2000; Landmesser et Harrison, 2001). Le NO réagit rapidement avec le O_2^- ce qui résulte en la production de ONOO $^-$ et une baisse de la biodisponibilité du NO. De plus, une forte production de radicaux libres induit la dégradation du BH $_4$, un cofacteur essentiel au fonctionnement adéquat de la eNOS, menant à un découplage de la eNOS et à une réduction conséquente de la production de NO ainsi qu'à une augmentation de la formation de O_2^- (Landmesser et al., 2003; Laursen et al., 2001; Tiefenbacher et al., 2000; Vasquez-Vivar et al., 2002). De plus, les radicaux libres inhibent la diméthylarginine diméthylaminohydrolase (DDAH), ce qui augmente les niveaux de l'inhibiteur endogène des NOS, l'ADMA, et réduit l'activité de la eNOS (Cooke, 2000). Comme mentionné précédemment, le surcroît de radicaux libres est principalement attribuable à l'augmentation de l'expression ou à l'activation de la NADPH oxydase (Spiekermann et al., 2003). La NADPH oxydase produit des quantités importantes de O_2^- et peut être induite par plusieurs stimuli pro-athérogéniques tels que l'angiotensine II, l'étirement mécanique et les cytokines (Griendling et al., 2000). Barry-Lane *et al* ont démontré que des souris déficientes pour l'apolipoprotéine E et la sous-unité p47^{phox} de la NADPH oxydase développent moins aisément des plaques athérosclérotiques (Barry-Lane et al., 2001).

1.4.4. Les modèles animaux expérimentaux

Plusieurs modèles animaux sont disponibles afin d'étudier l'athérosclérose (Getz et Reardon, 2006). Ces modèles animaux diffèrent en ce qui concerne les niveaux de cholestérol sanguins, le profil lipoprotéique ainsi que la nature et la distribution des lésions. Comme pour les modèles animaux de vieillissement et de dyslipidémie, seuls les modèles murins seront présentés dans cette section. Une caractéristique commune à tous les modèles présentés dans les prochains paragraphes est l'élévation des niveaux de VLDL et de LDL plasmatiques. Il est intéressant de noter que plusieurs modèles développent de l'athérosclérose sans la présence d'une diète riche en cholestérol et matières grasses, les modifications génétiques les caractérisant étant suffisantes.

La souris ApoE^{-/-} est le modèle animal le plus couramment utilisé pour l'étude de l'athérosclérose. Ces souris sont déficientes pour l'apolipoprotéine E, diminuant ainsi la clairance du cholestérol et des LDL. Lorsque nourries avec une diète normale, ces souris développent des lésions diffuses dans tout l'arbre vasculaire (Nakashima et al., 1994). Les niveaux de cholestérol plasmatiques de ces animaux sont d'environ 600 mg/dL et les lipoprotéines dominantes sont les VLDL et les IDL (Plump et Breslow, 1995). Lorsque soumises à une diète riche en cholestérol, ces souris développent des lésions plus complexes et présentent des niveaux plasmatiques de cholestérol 2 à 3 fois plus élevés (1300 – 2000 mg/dL).

La souris LDLr^{-/-} est déficiente pour le récepteur aux LDL, diminuant ainsi la clairance des LDL. Ce génotype mime celui retrouvé chez les patients souffrant d'hypercholestérolémie familiale. Lorsque nourries avec une diète régulière, ces souris développent de légères lésions dans la crosse aortique et/ou le long de l'aorte thoracique et abdominale (Moore et al., 2003; Sehayek et al., 2001). Elles présentent des niveaux de cholestérol sanguin modestes et un phénotype lipoprotéique principalement composé de LDL (Moore et al., 2003). Sous une diète riche en matières grasses et cholestérol, ce

modèle de souris quintuple ses niveaux de cholestérol plasmatiques (LDL et VLDL) et développe des lésions athérosclérotiques à travers toute la macrovasculature (Ishibashi et al., 1994; Reardon et al., 2003).

La souris $LDLr^{-/-}; apobec-1^{-/-}$ est à la fois déficiente pour le récepteur aux LDL et pour l'enzyme apobec-1 responsable de l'édition de l'ApoB. Cette dernière modification génétique permet l'élimination de l'ApoB-48, une variante tronquée de l'ApoB-100 pouvant être éliminée du plasma par d'autres récepteurs que le récepteur aux LDL classique, laissant seulement l'expression de l'ApoB-100 murine. Sous une diète régulière ces souris développent de façon distribuée des lésions athérosclérotiques complexes et présentent un phénotype lipoprotéique principalement composé de LDL avec des niveaux de cholestérol plasmatiques de l'ordre de 400-650 mg/dL (Powell-Braxton et al., 1998). Sous une diète riche en cholestérol, les niveaux de cholestérol plasmatiques quadruplent et sont accompagnés d'une augmentation des niveaux de VLDL (Powell-Braxton et al., 1998).

La souris $LDLr^{-/-}; hApoB^{+/+}$ est à la fois déficiente pour le récepteur aux LDL et exprime l'apolipoprotéine B-100 humaine par l'utilisation d'un transgène (Sanan et al., 1998). Sous une diète régulière, ces souris développent intensément des lésions complexes et avancées d'un bout à l'autre de l'arbre vasculaire. Elles présentent un profil lipidique principalement constitué de LDL et de très peu de VLDL. Les niveaux de cholestérol sont de 800 mg/dL et ceux de triglycérides de 600 mg/dL (Sanan et al., 1998).

1.5. Les radicaux libres

Les radicaux libres, incluant les espèces réactives oxygénées et azotées (ROS et RNS), sont des molécules possédant un ou plusieurs électrons appariés sur la couche externe. La présence d'un électron célibataire confère à ces molécules une grande instabilité et donc ont la possibilité de réagir de manière non-spécifique avec de nombreux composés (Halliwell et Gutteridge, 1999). Les ROS sont produits par le métabolisme

normal de la cellule. Dépendamment de leur concentration, les ROS peuvent être bénéfiques ou délétères pour l'organisme (Valko et al., 2006). Les effets bénéfiques des ROS se produisent à de faibles concentrations tandis que les effets délétères sont présents à de fortes concentrations. Les ROS participent aux fonctions physiologiques suivantes : le maintien du tonus vasomoteur, la régulation de la production d'érythropoïétine, la défense de l'organisme, la signalisation intracellulaire, le contrôle de l'adhésion cellulaire et l'apoptose. À l'opposé, les ROS peuvent être dommageables pour l'organisme, ce qui est le cas du stress oxydant (Kovacic et Jacintho, 2001; Ridnour et al., 2005; Valko et al., 2001). Le stress oxydant est caractérisé par un déséquilibre entre la production de ROS et les mécanismes de détoxification en défaveur de ces derniers. Ceci résulte en une concentration excessive de ROS, pouvant être néfaste pour l'ADN, les lipides et les protéines. Les dommages induits par le stress oxydant mènent à la formation et à la progression de plusieurs pathologies ainsi qu'au vieillissement. Il est donc primordial de maintenir un équilibre entre les sources oxydantes et antioxydantes, un phénomène nommé régulation rédox (Droge, 2002).

Les principaux ROS sont le superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyl ($OH\cdot$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les principaux RNS sont le monoxyde d'azote ($NO\cdot$) et le peroxyde d'azote ($ONOO\cdot$).

1.5.1. Les rôles physiologiques des radicaux libres

Un niveau faible mais stable de ROS est contrôlé par leur vitesse de production et de dégradation par les antioxydants. Le niveau de ROS à l'état normal est révélateur de l'« état rédox » du milieu environnant et est maintenu dans un intervalle étroit. En condition pathologique l'état rédox est augmenté ou diminué.

1.5.1.1. La signalisation intracellulaire

Il est connu que les ROS produits par les cellules de manière constitutive participent à l'induction et la maintenance de plusieurs voies de signalisation. Il a été démontré que suite à une stimulation par une cytokine ou un facteur de croissance, la plupart des types cellulaires présentent une faible augmentation de ROS (Thannickal et Fanburg, 2000). Ceci suggère que l'initiation ou le fonctionnement adéquat de ces voies de signalisation nécessite des ROS. Les ROS sont impliqués dans les voies de signalisation des cytokines et des facteurs de croissance, impliquant les récepteurs tyrosine-kinase (Chapple, 1997; Neufeld et al., 1999). Ils activent les récepteurs non-tyrosine-kinase telles que les kinases Src et Janus (Abe et Berk, 1999). Les protéines tyrosine phosphatases sont, pour leur part, inhibées par les ROS (Salmeen et Barford, 2005). Les ROS sont aussi impliqués dans les voies des kinases sérine/thréonine telles que les récepteurs du TGF- β (Shaw et al., 1998), la voie PI₃K/Akt, la relâche de calcium impliquant la PKC (Parekh et Penner, 1997) et la voie des MAPK (Kyriakis et Avruch, 2001; Sun et Oberley, 1996). Finalement, plusieurs facteurs de transcription tels que NF- κ B, AP-1, p53, NFAT et HIF-1 sont activés par les ROS (Pande et Ramos, 2005; Valko et al., 2007). Plusieurs ROS peuvent participer à la signalisation intracellulaire, cependant le O₂⁻ et le H₂O₂ sont les principaux ROS ayant été identifiés (Valko et al., 2007). Les ROS contribuent à ces voies de signalisation, nécessaires au développement et à la croissance physiologique de l'organisme, à de faibles concentrations (Valko et al., 2007).

1.5.1.2. La défense et la destruction de pathogènes

Les neutrophiles et les macrophages utilisent les ROS pour détruire les pathogènes. Lors d'une agression par un pathogène, des quantités massives de O₂⁻ sont produites par la NADPH oxydase exprimée par les leucocytes (Keisari et al., 1983). Les leucocytes expriment également l'isoforme inductible de la NOS, la iNOS. Lorsque stimulée par des cytokines, des LPS ou d'autres agents, la iNOS produit des quantités toxiques de NO[•]. De

plus, l'expression de la iNOS est régulée au niveau transcriptionnel et posttranscriptionnel par des facteurs de transcription et des agents de signalisation sensibles aux ROS tels que le NF- κ B et les MAPK (Valko et al., 2007).

1.5.1.3. Le contrôle du tonus vasculaire

Le NO \cdot et le H₂O₂ peuvent activer la guanylate cyclase soluble au niveau du muscle lisse vasculaire et induire la formation de GMPc (Drouin et al., 2007; Ignarro et Kadowitz, 1985). Le GMPc est un amplificateur intracellulaire ainsi qu'un second messenger dans plusieurs processus physiologiques. Il peut moduler la fonction de certaines protéines kinases, de plusieurs canaux potassiques et ainsi modifier le tonus du muscle lisse (Drouin et al., 2007; Valko et al., 2007). En condition physiologique, les ROS contribuent également à induire des réponses vasculaires vasoconstrictrices. Dans l'artère basilaire de chien, les contractions dépendantes de l'endothélium sont prévenues par l'utilisation de la SOD, mais pas par la catalase ou la déféroxamine (chélateur du radical hydroxyle), suggérant que le superoxyde est responsable de la contraction (Katusic et Vanhoutte, 1989; Vanhoutte et Katusic, 1988). En condition pathologique, tel qu'en hypertension, la contribution des ROS comme facteur endothélial vasoconstricteur est augmentée (Auch-Schwelk et al., 1989; Rodriguez-Martinez et al., 1998).

1.5.1.4. Le contrôle de la concentration d'oxygène

Les concentrations d'oxygène dans le sang sont maintenues précisément par une régulation serrée du nombre de globules rouges et de la ventilation respiratoire. Certaines études proposent que les changements en oxygène dans le sang soient détectés par différents cytochromes capables de produire des ROS (Acker, 1994). D'autres études suggèrent plutôt que les taux de ROS produits par les mitochondries soient impliqués dans le processus de détection des niveaux d'oxygène par les chémorécepteurs situés sur les carotides (Bunn et Poyton, 1996; Prabhakar, 2000). De plus, les changements en oxygène induisent des altérations dans la production d'érythropoïétine, de VEGF et de IGF-II par

l'intermédiaire du facteur de transcription sensible aux ROS, HIF-1 (Valko et al., 2007; Wang et al., 1995).

1.5.1.5. Le contrôle de l'adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire est impliquée dans des processus tels que l'embryogenèse, la croissance cellulaire, la différenciation et la réparation tissulaire. Tous ces événements sont régulés par l'environnement rédox (Albelda et al., 1994; Frenette et Wagner, 1996). De plus, l'expression des molécules d'adhésion et l'adhésion des leucocytes à la paroi vasculaire sont augmentées par plusieurs cytokines et par les ROS (Albelda et al., 1994; Sellak et al., 1994). Les ROS induisent l'expression de la kinase pp125^{FAK}, une tyrosine kinase cytosolique impliquée dans le processus d'adhésion (Schaller et al., 1992; Valko et al., 2007).

1.5.1.6. L'apoptose

L'apoptose ou la mort cellulaire programmée est essentielle au développement et à la destruction de cellules représentant une menace pour l'organisme (Wyllie et al., 1980). Pour certains, la production de ROS par la cellule est augmentée lors de l'apoptose induite par différents stimuli (Banki et al., 1999; Esteve et al., 1999; Hockenbery et al., 1993; Johnson et al., 1996; Korsmeyer, 1995; Um et al., 1996; Williams et Henkart, 1996; Zamzami et al., 1995). Le TNF- α induit l'apoptose *via* la production de ROS par les mitochondries (Hennet et al., 1993; Schulze-Osthoff et al., 1992) ou la NADPH oxydase dépendamment de la voie apoptotique utilisée et du type cellulaire (Klebanoff et al., 1986; Meier et al., 1989). Cependant, certains groupes ont publié des résultats inverses (Castedo et al., 1996; Hug et al., 1994; Jacobson et al., 1994). Ceci suggère que les ROS peuvent participer au processus d'apoptose, mais ne semblent pas nécessaire selon le modèle étudié. Toutefois, lorsqu'une cellule est exposée à une quantité importante de ROS ou que la concentration de ROS produite lors du processus d'apoptose est excessive, les ROS

induisent inévitablement l'apoptose. Ceci suggèrent que les ROS contribuent à la mort cellulaire (Dumont et al., 1999; Slater et al., 1995).

Le NO \cdot peut induire l'apoptose dans différents modèles expérimentaux et conditions pathologiques (Adamson et al., 1996; Albina et Reichner, 1998; Brune et al., 1997). L'apoptose induite par le NO \cdot est associée à la relâche dans le cytosol de cytochrome c à partir des mitochondries (Ushmorov et al., 1999). Certains types cellulaires tels que les cellules endothéliales sont résistants à l'apoptose induite par le NO \cdot (Lopez-Collazo et al., 1997), ce qui serait due à une concentration élevée en glutathion (Umansky et al., 2000).

1.5.2. Rôle pathologique des radicaux libres : le stress oxydant

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants, en faveur des oxydants. Le fait que les oxydants soient majoritaires prédispose la cellule, le tissu ou l'organisme à des dommages. Le stress oxydant est impliqué dans plusieurs conditions pathologiques telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, les pathologies neurologiques, le diabète, l'athérosclérose et le vieillissement (Dalle-Donne et al., 2006; Dhalla et al., 2000; Jenner, 2003; Sayre et al., 2001). Les radicaux libres sont produits par différentes enzymes, car il existe plusieurs sources oxydantes. De manière similaire, il existe tout autant de sources antioxydantes, qu'elles soient enzymatiques ou non-enzymatiques.

1.5.2.1. Les sources oxydantes

L'endothélium est en soi une source importante de ROS (Brandes et al., 1997; Gorlach et al., 2000; Hamilton et al., 2001; Jung et al., 2004). Le retrait de l'endothélium réduit considérablement la production de O $_2^{\cdot-}$ dans l'aorte de rat âgés (Hamilton et al., 2001). Dans la paroi vasculaire, les ROS proviennent principalement de sources cellulaires ou extracellulaires.

Avant d'être identifiée dans la paroi vasculaire, la NADPH oxydase a tout d'abord été découverte dans les phagocytes (macrophages, monocytes et neutrophiles). La NADPH oxydase des phagocytes est membranaire, composée de plusieurs sous-unités et requiert une activation afin de produire du O_2^- (Babior et al., 2002). Une fois activé, le phagocyte produit sur une courte période de temps une quantité accrue de O_2^- (10- 100 μ M) qui permet de détruire l'élément pathogène cible (Droge, 2002; Keisari et al., 1983). Tout comme les phagocytes, les fibroblastes de l'adventice, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales contiennent la NADPH oxydase. Plusieurs études démontrent que la NADPH oxydase représente une des principales sources de ROS dans la paroi vasculaire (Mohazzab et Wolin, 1994; Pagano et al., 1995; Rajagopalan et al., 1996a). Contrairement aux phagocytes dont le rôle est principalement d'éliminer les pathogènes externes, dans les cellules vasculaires, les ROS sont produits à l'intérieur plutôt qu'à l'extérieur de la cellule (Griendling et al., 2000). Toutefois, il a été démontré que les cellules endothéliales peuvent relâcher des ROS à l'extérieur de la cellule (Ushio-Fukai et al., 2002), suggérant que celles-ci pourrait contribuer à la défense de l'organisme. De plus, les sous-unités composant la NADPH oxydase sont différentes d'un type cellulaire à l'autre. Les principales sous-unités retrouvées au niveau de l'endothélium sont la gp91^{phox}, la p22^{phox}, la p47^{phox} et la p67^{phox} (Griendling et al., 2000). La NADPH oxydase retrouvée dans les cellules de la paroi vasculaire produit constitutivement de faibles quantités de ROS et ne nécessite donc pas d'induction (Pagano et al., 1997). Par contre, comme pour les phagocytes, la NADPH oxydase de la paroi peut être induite par des stimuli tels que l'angiotensine II, les interleukines, les forces de cisaillement ou le VEGF (Ushio-Fukai et al., 2002). Cependant, la concentration de O_2^- produite est minime comparativement à celle produite dans un phagocyte.

La xanthine oxydase est une autre source de ROS abondamment présente dans les cellules endothéliales (Jarasch et al., 1981). L'expression de la xanthine oxydase est induite par les forces de cisaillement similaires à celles que l'on retrouve aux bifurcations

artérielles et aux endroits où les plaques athérosclérotiques se développent (McNally et al., 2003). L'activité et l'expression de cette enzyme sont donc augmentées dans l'athérosclérose. Le rôle de la xanthine oxydase dans la production des ROS a principalement été étudié dans des contextes d'ischémie reperfusion (Stocker et Keaney, 2004).

Les NOS, dans des circonstances spécifiques comme le manque de BH_4 , peuvent être découplées et produire des ROS plutôt que du NO (Drouin et al., 2007; Vasquez-Vivar et al., 1998; Xia et al., 1998). Lorsque la NOS est couplée ou découplée, les cofacteurs (FAD et FMN) présents dans le domaine réducteur de la NOS acceptent les électrons de la NADPH et les envoient à l'hème situé dans les domaines oxygénases de la NOS. Lorsque les substrats (L-arginine et BH_4) sont présents en quantité suffisante, les dimères formant les NOS joignent leur hème respectif et réduisent l'oxygène afin de produire du NO. Cependant, en absence de substrats ou lorsqu'il y a oxydation de la NOS, l'hème génère du superoxyde (Forstermann et Munzel, 2006). Dans un environnement pathologique (pro-oxydant), le NO peut interagir rapidement avec le O_2^- pour former du $ONOO^-$, une espèce oxygénée capable d'endommager les tissus (Stocker et Keaney, 2004).

Les COX peuvent également produire des ROS. Il a été démontré que la stimulation de cellules avec le $TNF-\alpha$, l'interleukine-1 et les LPS induit les COX à générer des ROS (Feng et al., 1995; Munroe et al., 1995). Chez des patients hypertendus, l'indométhacine (inhibiteurs des COX) améliore la dilatation à l'acétylcholine et rétablit l'effet inhibiteur du L-NNA (inhibiteur des NOS). Dans ce contexte, ces observations indiquent que les COX produisent des substances pouvant réduire la biodisponibilité du NO (Taddei et al., 1997). Puisque l'administration intra-brachiale de vitamine C (chélateur de ROS) produit un effet similaire à l'indométhacine sur la réponse à l'acétylcholine et l'inhibition des NOS et que leur administration simultanée ne provoque pas d'effet synergique, il est suggéré que ces substances soient des ROS (Taddei et al., 1998). L'implication des COX comme sources de

ROS a aussi été démontré dans des situations d'insuffisance cardiaque et de ménopause (Taddei et Salvetti, 2002; Viridis et al., 2000; Vita et Keaney, 2002).

La myéloperoxydase et les lipoxygénases sont d'autres types d'enzymes capables de générer des ROS et d'induire des dommages cellulaires. La myéloperoxydase est une enzyme contenant un hème capable de catalyser la conversion de l'anion chlore en acide hypochloreux et de générer des produits d'oxydation à partir de lipides ou de protéines (Stocker et Keaney, 2004). Les lipoxygénases sont des enzymes capables de catalyser l'insertion d'une molécule d'oxygène dans un acide gras polyinsaturé afin de produire des prostaglandines, de la thromboxane et des leucotriènes (Schewe, 2002).

Les mitochondries sont aussi des sources importantes de ROS. La chaîne de transport d'électron mitochondriale transforme 1 à 2 % de l'oxygène moléculaire (O_2) consommé en O_2^- . La quantité de O_2^- apparente dépend de l'activité de la MnSOD, une enzyme située dans la matrice mitochondriale capable de convertir le O_2^- en H_2O_2 et en O_2 . De plus, la chaîne de transport d'électrons située dans la membrane mitochondriale interne et la monoamine oxydase située dans la membrane mitochondriale externe peuvent produire du H_2O_2 . Les ROS produits par les mitochondries sont impliqués dans l'athérogenèse (Ballinger et al., 2002) et il a été démontré que l'apparition d'une dysfonction mitochondriale est associée aux maladies cardiovasculaires (Ramachandran et al., 2002).

Il est hasardeux de déterminer la source de ROS principalement impliquée dans l'athérogenèse. Cependant, les enzymes les plus étudiées dans le contexte d'athérosclérose sont la NADPH oxydase, la xanthine oxydase et les NOS.

1.5.2.2. Les mécanismes d'action des radicaux libres

À haute concentration les ROS peuvent endommager l'ADN, les lipides et les protéines (Valko et al., 2006). Par exemple, le radical hydroxyl peut réagir avec l'ADN et

endommager les bases purine et pyrimidine ainsi que le squelette de désoxyribose (Halliwell et Gutteridge, 1999). Cette interaction induit la formation de 8-hydroxy-guanine, un marqueur des attaques oxydatives des acides nucléiques. L'attaque de l'ADN par les ROS contribue à des phénomènes tels que la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement. Les lipides sont également sensibles aux attaques oxydatives (Siems et al., 1995). Les principales conséquences de l'oxydation des lipides sont la formation de malondialdéhyde (MDA) et de 4-hydroxy-2-nonal (HNE), deux produits mutagéniques, carcinogéniques et toxiques. Les protéines, plus particulièrement les résidus cystéine et méthionine, sont susceptibles à l'oxydation par les ROS (Stadtman, 2004). L'attaque des protéines par les radicaux libres engendre la formation de groupes carbonyles, ce qui altère l'intégrité de la protéine et son fonctionnement. Les ROS, plus spécifiquement le superoxyde, lorsque présent en quantité abondante peut interagir avec le NO pour former du peroxynitrite (Beckman et al., 1990). La réaction entre ces deux molécules se fait rapidement, soit à une vitesse de 6.7×10^9 L/mol par seconde (Huie et Padmaja, 1993). Cette vitesse de réaction est deux fois plus rapide que la vitesse de dégradation du superoxyde par la SOD. Ainsi, en présence accrue de superoxyde la formation de peroxynitrite est favorisée. Le peroxynitrite est à son tour un puissant oxydant pouvant endommager les protéines et produire des dommages dans plusieurs types cellulaires (Darley-Usmar et White, 1997; Radi et al., 1991; Wolin, 2000). Il peut également induire la peroxydation lipidique et participer au développement de l'athérosclérose (Buttery et al., 1996; Ferroni et al., 2004; Warnholtz et al., 2001). Le peroxynitrite peut augmenter les propriétés d'agrégation des plaquettes (Brown et al., 1998) et altérer les fonctions dilatatrices et vasoconstrictrices des vaisseaux sanguins (Graves et al., 2005; Lewis et al., 2005; Zou et al., 1999). Le peroxynitrite peut être dégradé et produire du dioxyde d'azote ($\text{NO}_2\cdot$), qui peut nitrosyler les résidus tyrosines (Graham et al., 1993). La nitrotyrosine peut également être formée par l'intermédiaire de la myéloperoxydase (Eiserich et al., 1998; Hazen et al., 1999). La nitrotyrosine est impliquée dans le développement de l'athérosclérose (Hogg et al., 1993; Pennathur et al., 2004) et plusieurs pathologies

inflammatoires telles que le diabète (Zou et al., 2004), le lupus, l'arthrite rhumatoïde, la pancréatite et la maladie de Crohn (Mohiuddin et al., 2006). Le tabagisme est également associé à une augmentation de nitrotyrosine (Pignatelli et al., 2001; Yamaguchi et al., 2002). Les ROS peuvent oxyder des protéines/enzymes responsables du maintien de l'équilibre rédox ainsi que des protéines responsables de la dégradation et la réparation de protéines endommagées. Ainsi, la présence abondante d'oxydation peut mener vers une défaillance cellulaire (Stadtman, 2004).

1.5.2.3. Les sources antioxydantes enzymatiques et non-enzymatiques

Parmi les sources antioxydantes enzymatiques se trouvent la SOD, la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT). En condition physiologique, l'activité et l'expression de ces enzymes sont élevées et en équilibre avec la concentration de ROS/RNS. L'acide ascorbique (vitamine C), l' α -tocophérol (vitamine E), le GSH et les flavonoïdes comptent parmi les sources antioxydantes non-enzymatiques les plus connues. En condition pathologique, l'expression et l'activité de ces enzymes sont diminuées, ce qui favorise la production de ROS et l'apparition du stress oxydant (Stocker et Keaney, 2004).

1.6. Les polyphénols

Les polyphénols sont les composés responsables du goût et de la couleur des fruits et des légumes. Ils contribuent également aux bénéfices sur la santé apportés par la consommation d'un régime riche en fruits, légumes, thé et vin (Cheynier, 2005). La grande famille des polyphénols renferme celles des flavonoïdes et des non-flavonoïdes. Les flavonoïdes sont formés de deux anneaux phénoliques et d'un hétérocycle oxygéné. Plus de 5000 flavonoïdes ont été identifiés à ce jour (Manach et al., 2004). Dépendamment de l'état d'oxydation de l'hétérocycle, les flavonoïdes sont divisés en plusieurs sous-familles telles que les flavanols, les flavonols, les flavanones, les flavones, les isoflavones et les anthocyanidines (Visioli et Hagen, 2007).

Plusieurs études épidémiologiques indiquent que la consommation régulière de fruits, légumes, thé et de vin est associée à une diminution de la mortalité due à une réduction de l'incidence de cancer et de maladies cardiovasculaires (Hertog et al., 1993; Keli et al., 1996; Renaud et de Lorgeril, 1992; Rice-Evans, 2001). Les effets bénéfiques associés à ce type de diète sont attribués, en partie, aux polyphénols (Hertog et al., 1995; Hertog et al., 1997; Knekt et al., 1996; Rimm et al., 1996). Les polyphénols préviennent l'oxydation des LDL (Frankel et al., 1993a), l'agrégation et l'adhésion des plaquettes (Freedman et al., 2001; Pignatelli et al., 2006; Wang et al., 2002b; Wollny et al., 1999), la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (Iijima et al., 2002; Iijima et al., 2000) ainsi que l'expression du VEGF (Oak et al., 2003). Ils induisent également la formation de NO, de PGI₂ et de l'EDHF (Anselm et al., 2007; Busse et al., 2002; Mombouli et Vanhoutte, 1999; Stoclet et al., 2004). Les polyphénols possèdent la capacité d'inhiber l'activité et l'expression des MMP, ce qui empêche la fragilisation des lésions et la formation de l'angiogenèse qui nourrit la plaque (Oak et al., 2004). En effet, les MMP sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire favorisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et provoquant également l'instabilité de la plaque athérosclérotique (Galis et Khatri, 2002). Par sa fragilité la plaque peut ultimement se détacher de la paroi artérielle et induire des événements ischémiques potentiellement mortels. De plus, les polyphénols augmentent l'efficacité ainsi que la quantité des sources antioxydantes et agissent en tant que chélateurs directs des radicaux libres ou donneurs d'atomes d'hydrogène (Hu et al., 1995; Nijveldt et al., 2001; O'Byrne et al., 2002; Robak et Gryglewski, 1988; Schroeter et al., 2002). Les polyphenols peuvent également diminuer l'expression des systèmes enzymatiques antioxydants étant donné que ces derniers sont inutiles lorsque la quantité de radicaux libre est faible (Xie et al., 2004; Zaslaver et al., 2005).

1.6.1. Les polyphénols et la fonction endothéliale

1.6.1.1. Le monoxyde d'azote

En plus d'augmenter la biodisponibilité du NO par leurs propriétés antioxydantes, les polyphénols augmentent la synthèse de NO par la eNOS. Plusieurs études ont démontré que les polyphénols induisent des dilatations dépendantes de l'endothélium dont l'effet était parallèlement associé à une augmentation de GMP cyclique et/ou bloqué par un inhibiteur des NOS (Aldini et al., 2003; Lorenz et al., 2004; Mendes et al., 2003; Ndiaye et al., 2003; Soares De Moura et al., 2002). L'augmentation de NO a également été démontrée par résonance paramagnétique et par l'utilisation de micro-senseurs spécifiques au NO dans des segments intacts d'aorte de rat et d'artères coronaires de porcs (Andriambelason et al., 1997; Stoclet et al., 1999; Taubert et al., 2002). Il est connu que l'activation de la eNOS par divers stimuli chimiques implique la relâche de calcium intracellulaire. Il a été démontré que les polyphénols augmentent la concentration de calcium intracellulaire et l'activation de la eNOS (Andriambelason et al., 1999; Martin et al., 2002; Stoclet et al., 1999) spécifiquement dans les cellules endothéliales (Stoclet et al., 1999). Toutefois, certains auteurs suggèrent aussi l'implication de la voie PI₃K/Akt dans la dilatation induite par les polyphénols, puisque la dilatation induite par des extraits phénoliques associée à une augmentation de calcium intracellulaire est réduite par des inhibiteurs de la voie de la PI₃K (Ndiaye et al., 2005). De plus, la formation de NO et de GMPc induite par des polyphénols est également réduite par l'utilisation d'inhibiteurs de la voie de la PI₃K (Ndiaye et al., 2005). Finalement, la phosphorylation d'Akt et de la eNOS est augmentée par les polyphénols et réduite par les inhibiteurs de la voie de la PI₃K (Lorenz et al., 2004; Ndiaye et al., 2005; Ndiaye et al., 2003) (Figure 5).

En plus d'augmenter l'activité de la eNOS, les polyphénols peuvent induire son expression. Cependant, une concentration élevée en polyphénols est nécessaire (Hsieh et al., 1999; Leikert et al., 2002; Wallerath et al., 2002; Wallerath et al., 2003).

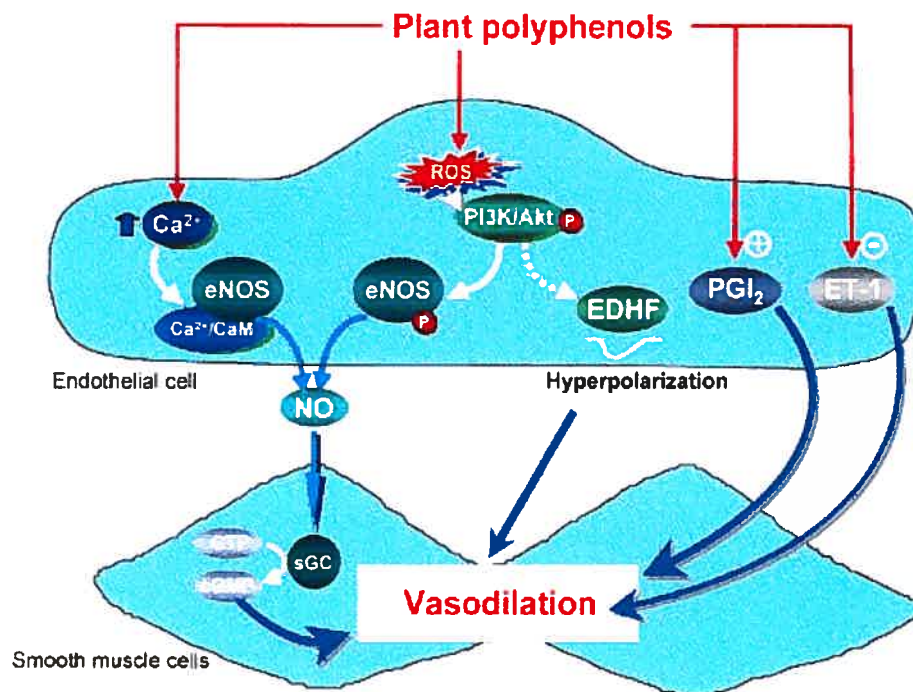


Figure 5. Influence des polyphénols sur les facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium (Tiré de Stoclet *et al.*, 2004).

1.6.1.2. La prostacycline

Certains polyphénols tels que les procyanidines induisent une dilatation dépendante de l'endothélium de l'artère mammaire interne humaine qui peut être réduite de 50% par l'ajout d'indométhacine, un inhibiteur des cyclooxygénases (Aldini *et al.*, 2003). Ces observations suggèrent que la PGI₂ contribue à la dilatation induite par les procyanidines. Ces résultats ont été confirmés par l'augmentation de la production de 6-keto-prostaglandine-F_{1α}, le métabolite stable de la PGI₂, suite une stimulation par les procyanidines (Aldini *et al.*, 2003). Ces observations ont été corroborées par plusieurs

groupes (Mizugaki et al., 2000; Schramm et al., 2001) utilisant les procyanidines ou les catéchines, mais également réfutées par d'autres qui ont utilisé un autre polyphénol, la quercétine (Zhao et al., 1999).

1.6.1.3. Le facteur hyperpolarisant

Les polyphénols peuvent induire la relaxation des artères coronaires porcines isolées et hyperpolariser le muscle lisse en absence de NO et de PGI₂ (Ndiaye et al., 2003; Ndiaye et al., 2004). Ces observations démontrent une participation potentielle de l'EDHF dans la dilatation induite par les polyphénols. La contribution de l'EDHF a été également observée dans des artères mésentériques de rat et des cellules endothéliales suite à une stimulation avec des polyphénols (Deyama et al., 2001; Kwan et al., 2004; Li et al., 2000). Des auteurs suggèrent un rôle du O₂⁻ dans les relaxations dépendantes de l'EDHF induites par les polyphénols (Figure 5). Il a été observé que les relaxations dépendantes de l'EDHF sont réduites par l'ajout de l'antioxydant N-acétyl-L-cystéine (NAC) ou d'analogues de la SOD. Une augmentation de la production de O₂⁻, mesurée par la sonde fluorescente hydroéthidine, a également été observée dans des cellules endothéliales en culture stimulées par des polyphénols (Ndiaye et al., 2003). Ces données suggèrent que l'environnement rédox contribue à la relaxation dépendante de l'EDHF induite par les polyphénols. L'implication de la voie PI₃K/Akt, une protéine kinase sensible à l'environnement rédox, a été étudiée (Ndiaye et al., 2004). Il a été observé que l'inhibition de cette kinase par la wortmannine et le LY294002 réduit considérablement la dilatation des artères coronaires dépendante de l'EDHF induite par les polyphénols. Toutefois, l'implication de la MAPK p38 et de ERK1/2, deux autres protéines kinases sensibles à l'environnement rédox, dans la dilatation induite par l'EDHF suite à une stimulation par les polyphénols n'a pas été démontrée (Ndiaye et al., 2004) (Figure 5).

1.6.1.4. L'endothéline

Plusieurs groupes ont montré que les extraits de vin rouge, tel que le resvératrol et la quercétine diminuent la libération, les niveaux d'ARN messager et l'activité promotrice de l'endothéline ainsi que la transcription de la prépro-endothéline (Corder et al., 2001; Khan et al., 2002; Liu et al., 2003; Zhao et al., 1999).

1.6.1.5. L'angiogenèse

L'angiogenèse est caractérisée par plusieurs étapes et éléments distincts sur lesquels les polyphénols peuvent avoir un impact. Avant de former de nouveaux vaisseaux, la matrice extracellulaire doit être dégradée par des MMP. Plusieurs polyphénols peuvent inhiber l'activation de la MMP-2, une gélatinase impliquée dans l'athérogenèse (Annabi et al., 2002; El Bedoui et al., 2005; Oak et al., 2004). Les polyphénols empêchent également l'expression du VEGF, un facteur de croissance essentiel à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins matures. Le VEGF assure également la migration et la prolifération des cellules vasculaires (Ferrara et Davis-Smyth, 1997). De faibles concentrations de polyphénol sont nécessaires afin de prévenir l'expression et la libération de VEGF (Masuda et al., 2002; Oak et al., 2003; Oak et al., 2005; Sartippour et al., 2002). L'effet des polyphénols sur le VEGF pourrait être attribuable à leur effet inhibiteur sur l'activation de la MAPK p38 sensible à l'environnement rédox (Oak et al., 2003). Finalement, les polyphénols inhibent la migration et la prolifération des cellules vasculaires en augmentant l'expression de la protéine suppresseur de tumeur p53 ou de l'inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines p21, en induisant l'apoptose, en réduisant l'expression de la cycline A et/ou en inhibant les voie de la MAPK p38 et de la PI₃K (Favot et al., 2003; Fotsis et al., 1997; Hsieh et al., 1999; Iijima et al., 2002; Iijima et al., 2000; Martin et al., 2003; Paper, 1998; Yoo et al., 2002). Des expérimentations *in vivo* corroborent l'effet inhibiteur des polyphénols sur l'angiogenèse (Brakenhielm et al., 2001; Cao et Cao, 1999; Maiti et al., 2003) (Figure 6).

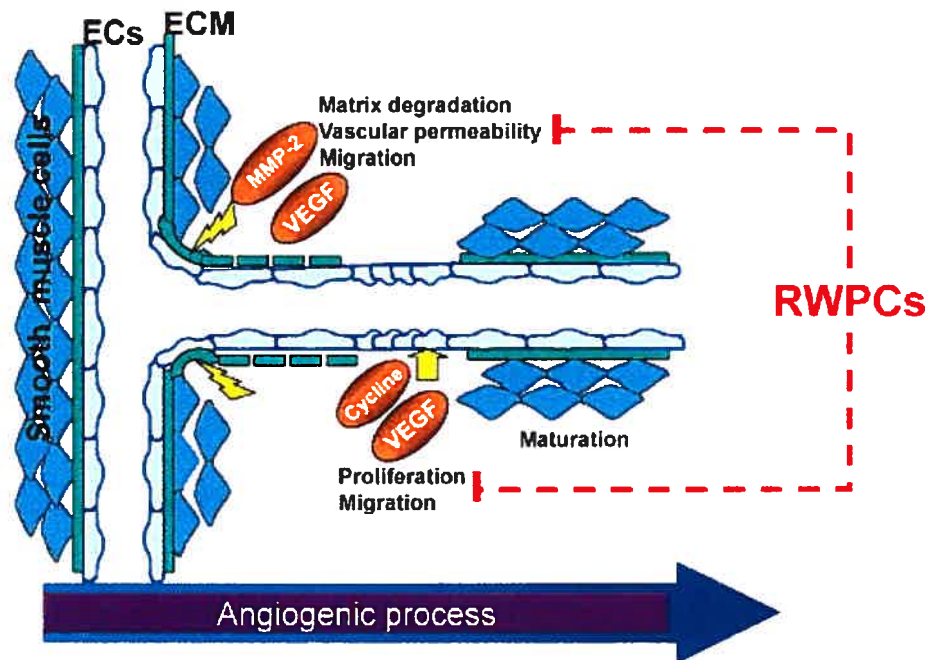


Figure 6. Influence des polyphénols sur l'angiogenèse (Tiré de Stoclet *et al.*, 2004).

1.6.2. Le resvératrol

Le resvératrol est un composé polyphénolique faisant partie de la famille des non-flavonoïdes. Il est présent dans plusieurs espèces de plantes, dont plusieurs composent notre diète : les mûres, les arachides, les raisins et le vin rouge. Le resvératrol existe sous deux formes isomériques : *trans* et *cis*. Sa structure est constituée de deux anneaux phénoliques liés par un double lien styrène. L'isomère *trans* du resvératrol induit des effets pharmacologiques dans plusieurs modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, toutefois le profil pharmacologique de son homologue *cis* n'est pas bien connu (de la Lastra et Villegas, 2005).

L'élan de recherche entourant le resvératrol est né de l'observation que la population Française présente une faible incidence de maladie cardiovasculaire malgré qu'elle ait adopté une diète riche en matières grasses (Richard, 1987). Cette contradiction, appelé « Paradoxe Français », pourrait être expliquée par le fait que les Français consomment régulièrement du vin rouge au repas (150-300 ml/jour) (Renaud et de Lorgeril, 1992; Renaud et Gueguen, 1998; Soleas et al., 1997). Cette observation a eu pour effet d'étendre la recherche concernant les applications et les effets pharmacologiques du resvératrol.

De part ses propriétés antioxydantes, le resvératrol prévient ou ralentit la progression du cancer (Jang et al., 1997), des maladies cardiovasculaires (Bradamante et al., 2004; Frankel et al., 1993b; Mizutani et al., 2001) et des dommages ischémiques cérébraux (Sinha et al., 2002; Wang et al., 2002a). Il peut augmenter la résistance au stress et rallonger la durée de vie de plusieurs organismes allant de la levure aux vertébrés (Howitz et al., 2003; Valenzano et al., 2006). Les effets bénéfiques du resvératrol sont variés. Cette molécule peut inhiber les cyclooxygénases (Jang et al., 1997; Khanduja et al., 2004; Subbaramaiah et al., 1998), la décarboxylase ornithine (Khanduja et al., 2004), l'angiogenèse (Brakenhielm et al., 2001; Kimura et Okuda, 2001; Tseng et al., 2004) et augmente l'apoptose (Aggarwal et al., 2004), quatre éléments impliqués dans la carcinogenèse. Le resvératrol augmente efficacement les défenses antioxydantes et élimine directement les radicaux libres (Miura et al., 2003a; Sengottuvelan et al., 2006; Wenzel et al., 2005). Le resvératrol prévient les maladies cardiovasculaires car il diminue l'agrégation plaquettaire (Bertelli et al., 1995; Wang et al., 2002b), augmente la vasodilatation (Jager et Nguyen-Duong, 1999; Naderali et al., 2000; Orallo et al., 2002), diminue la formation des plaques athérosclérotiques (Wang et al., 2005) et possède des propriétés similaires aux estrogènes (Gehm et al., 1997). Gehm et collaborateurs ont démontré que le resvératrol possède une structure s'apparentant à celle de l'estradiol et du diéthylstilbestrol, qu'il peut lier les récepteurs humains de l'estrogène, qu'il agit en tant qu'agoniste et qu'il stimule

l'expression de gènes régulés par l'estrogène (Gehm et al., 1997). Puisqu'il a été démontré dans différents modèles animaux et chez la femme pré-ménopausée que l'estrogène peut protéger contre les maladies cardiovasculaires (Ling et al., 2006), il est possible de croire que le resvératrol puisse induire certains de ses effets cardio-protecteurs *via* les récepteurs des estrogènes. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer cette hypothèse et une attention particulière aux conditions expérimentales est primordiale étant donné que les effets cardio-protecteurs sont discutables chez des patientes post-ménopausées recevant l'hormonothérapie (études HERS et WHI) (Grady et al., 1998; Rossouw et al., 2002). Les effets de l'estrogène sur le système cardiovasculaire sont donc complexes.

Comme mentionné précédemment, le resvératrol peut augmenter l'espérance de vie de plusieurs organismes allant de la levure aux vertébrés (Baur et Sinclair, 2006; Howitz et al., 2003; Valenzano et al., 2006). Il est connu que la restriction calorique augmente l'espérance de vie de plusieurs espèces par l'intermédiaire des sirtuines (SIRT) (Koubova et Guarente, 2003; Lin et al., 2000; Masoro, 2000). Il a donc été proposé que le resvératrol augmente la durée de vie *via* ces protéines. Les sirtuines (SIRT-1 à -7) sont une famille de déacétylases NAD-dépendantes présentes dans de nombreuses espèces. Par la déacétylation, entre autres d'histones et de facteurs de transcription, les sirtuines provoquent un remodelage de la structure chromatinienne et modulent l'activité transcriptionnelle (Baur et Sinclair, 2006). Les principales fonctions des sirtuines seraient d'assurer la survie et la résistance à différents stress environnementaux (Guarente et Picard, 2005). Le resvératrol, parmi plusieurs molécules, est le plus puissant inducteur de la sirtuine-1 (SIRT-1) (Howitz et al., 2003).

1.6.3. Les catéchines

Les catéchines sont des polyphénols appartenant à la famille des flavonoïdes et à la sous-famille des flavanols. Elles sont les principaux composés du thé vert et consistent en

la (+)-catéchine, la (+)-gallocatéchine, l'(-)-épicatéchine, l'(-)-épicatéchine-3-gallate, l'(-)-épigallocatéchine et l'(-)-épigallocatéchine-3-gallate. Comme pour le resvératrol, plusieurs études démontrent les bienfaits des catéchines sur la carcinogénèse, les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires (Crespy et Williamson, 2004; Zaveri, 2006). Les catéchines possèdent des propriétés permettant l'inhibition des MMP et de l'angiogénèse (Cao et al., 2002; Garbisa et al., 1999). Les catéchines peuvent également induire l'apoptose (Ahmad et al., 1997; Ahn et al., 2003), diminuer la prolifération cellulaire, agir comme antioxydant (Hakim et al., 2003; Kumari et al., 1996; Leanderson et al., 1997), inhiber les enzymes impliquées dans la réplication et la synthèse d'ADN (Agarwal et al., 1992; Bachrach et Wang, 2002), arrêter la division cellulaire (Isemura et al., 2000) et favoriser la dilatation (Gendron et Thorin, 2007; Widlansky et al., 2007).

1.6.4. Les mécanismes de protection vasculaire par les polyphénols

1.6.4.1. Les polyphénols et le vieillissement

Selon la théorie du vieillissement par les radicaux libres (« *The free radical theory of aging* ») proposée par Harman (Harman, 1956), la production de radicaux libres et le stress oxydant sont responsables des changements menant à la détérioration des fonctions et à la neurodégénération observées lors du vieillissement. Les maladies associées au vieillissement telles que le cancer, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires et le diabète sont associés à des déséquilibres du rapport oxydants/antioxydants et à des dommages induits par les radicaux libres (Junqueira et al., 2004; Polidori, 2003). Le thé vert protège du stress oxydant des souris âgées, en empêchant l'oxydation des lipides et des protéines du sérum (Luczaj et al., 2004). De plus, la consommation de catéchine par des souris âgées améliore la fonction cognitive et l'atrophie cérébrale (Unno et al., 2004). Les polyphénols ont également pour effets de ralentir l'apparition des maladies associées au vieillissement, permettant de conserver un meilleur état de santé plus longtemps. En effet, plusieurs études démontrent que le thé vert amoindrit

les effets de la maladie de Parkinson en empêchant la perte de neurones dopaminergiques, en prévenant partiellement l'accumulation de fer et d'alpha-synucléine et en maintenant des niveaux adéquats de dopamine (Choi et al., 2002; Levites et al., 2001; Mandel et al., 2004). Plusieurs études réalisées chez les animaux et à l'aide de cultures cellulaires suggèrent que les polyphénols peuvent ralentir la progression de la maladie d'Alzheimer. Ces études démontrent que certains polyphénols, telle que la catéchine, préviennent la formation de plaques β -amyloïdes ou protègent de la neurotoxicité induite par ces plaques (Choi et al., 2001; Jeon et al., 2003; Levites et al., 2003). Les propriétés des polyphénols, incluant le resvératrol et les catéchines, permettent de prévenir, en plus des maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, le cancer et le diabète (Baur et Sinclair, 2006; Zaveri, 2006). Ainsi, la consommation de fruits, de légumes et de vin rouge participe à la prévention des dommages qui surviennent habituellement avec le vieillissement.

1.6.4.2. Les polyphénols et l'athérosclérose

Dans un contexte d'athérogenèse, les effets bénéfiques des polyphénols sont en partie attribuables à leur capacité à retarder la progression des lésions précoces, comme il a été observé dans des artères coronaires de jeunes patients, vers un stade avancé lors duquel la plaque devient fragile et prône à la rupture et à la thrombose (da Luz et al., 1999; Hayek et al., 1997; Miura et al., 2001; Vinson et al., 2001). Lors de l'athérogenèse, la vascularisation de la paroi vasculaire change et est principalement contrôlée par les MMP qui dégradent la matrice extracellulaire (Galis et Khatri, 2002; Visse et Nagase, 2003). Les principales MMP impliquées dans la dégradation du collagène au sein des plaques athérosclérotiques sont les MMP-2 et -9 (Galis et Khatri, 2002; Li et al., 1996; Pasterkamp et al., 2000). Un traitement aux polyphénols inhibe l'expression et l'activité des MMP par l'inhibition directe de leur activateur, la MT-MMP, ce qui réduit l'invasion de la matrice par les cellules musculaires lisses (Oak et al., 2004). Comme mentionné dans la section 1.4.1., l'oxydation des LDL est un événement clé de l'athérogenèse menant à la formation de cellules spumeuses et favorisant un état inflammatoire favorable au développement de

plaques. De façon intéressante, il a été observé que les polyphénols préviennent l'oxydation des LDL (Andrikopoulos et al., 2002; Yamakoshi et al., 1999) ou augmentent la résistance de l'organisme aux LDL oxydées (Chopra et al., 2000; Jenkins et al., 2000; Kurosawa et al., 2005; O'Byrne et al., 2002; Wan et al., 2001). Il est connu que la dysfonction endothéliale participe à l'apparition de la plaque. Cette dysfonction favorise l'agrégation plaquettaire, l'adhésion des leucocytes et exhibe un phénotype pro-inflammatoire. Il est reconnu que les polyphénols, tels que des suppléments de cacao, réduisent l'agrégation plaquettaire induite par un agoniste comme le collagène (Innes et al., 2003; Murphy et al., 2003). Il a également été démontré chez l'humain que les polyphénols diminuent le rapport leucotriènes/prostacycline, indiquant un renversement de l'état inflammatoire (Schramm et al., 2001). L'expression des ARN messager de COX-2, de l'INF- γ , de l'IL-4 et de VCAM-1 est réduite par certains polyphénols (Carluccio et al., 2003; Lin et al., 2003; Nair et al., 2002; O'Leary et al., 2004). C'est en favorisant la vasodilatation et en diminuant la vasoconstriction, les dommages induits par le stress oxydant, l'agrégation plaquettaire, l'adhésion des leucocytes, l'expression de protéines ainsi que de gènes pro-inflammatoires, l'expression du VEGF et l'activité des MMP que les polyphénols peuvent empêcher l'athérogenèse.

L'effet d'un régime riche en polyphénols a été étudié dans différents modèles animaux d'athérosclérose. Il a été démontré que différents extraits phénoliques peuvent empêcher le développement de l'athérosclérose chez des lapins recevant une diète riche en cholestérol (Chen et al., 2003; Kim et al., 2003; Yamakoshi et al., 1999). Des résultats similaires ont été observés dans des modèles de lapins hypercholestérolémiques (les lapins Kurosawa et Kusanagi) (Kurosawa et al., 2005). Des expérimentations ont été également réalisées chez des souris déficientes pour l'apolipoprotéine E démontrant que les polyphénols contenus dans le vin rouge préviennent la formation de lésions athérosclérotiques (da Luz et al., 1999; Hayek et al., 1997; Miura et al., 2001). De même, ces observations ont été notées chez le hamster (Vinson et al., 2001).

Toutefois, il a été démontré dans un modèle de souris déficientes pour l'apolipoprotéine E que le vin rouge est incapable de réduire l'athérosclérose lorsque les plaques sont matures (Bentzon et al., 2001; Chyu et al., 2004).

2. Raisonnement de l'étude

Il est connu que le vieillissement est un facteur de risque de l'athérosclérose, au même titre que le diabète, l'hypertension et l'hypercholestérolémie. L'intérêt du présent projet de thèse visait principalement le système cardiovasculaire et plus spécifiquement le système macrovasculaire, c'est-à-dire les artères de conductance. Le vieillissement et les facteurs de risque de l'athérosclérose contribuent, entre autres, à altérer les fonctions physiologiques des différents types cellulaires qui composent la paroi vasculaire. Ceci engendre une modification de la fonction vasodilatatrice et vasoconstrictrice, une augmentation des propriétés de pro-agrégation et de prolifération. De plus, le vieillissement vasculaire est caractérisé par une augmentation de la production de radicaux libres potentiellement nuisibles et une diminution des défenses antioxydantes, favorisant l'apparition d'un stress oxydant. Ces changements favorisent un phénotype pro-inflammatoire et pro-athérogénique. Cependant, quoique maintes fois étudiée, la dysfonction vasculaire associée au vieillissement et à un état pro-athérogénique n'est encore à ce jour que sommairement caractérisée, notamment dans un contexte évolutif. Il est raisonnable de supposer que la nature de la fonction/dysfonction endothéliale soit constamment changeante. Dépendamment de l'âge, des facteurs de risque et de plusieurs facteurs environnementaux (radicaux libres) et biologiques (hormones, interleukines) présents, la nature dynamique de l'endothélium devrait être modifiée.

2.1. Hypothèse générale de l'étude

L'hypothèse générale de cette étude était que la fonction endothéliale d'artères rénales de souris est dynamique et que son évolution dans le temps est caractérisée par des changements dans la contribution des différents facteurs vasomoteurs. Nous avons également émis l'hypothèse que la dyslipidémie et l'athérosclérose associées au vieillissement accélèrent, à des niveaux différents, l'apparition de la dysfonction endothéliale. Finalement, nous avons proposé qu'une thérapie antioxydante avec un polyphénol (catéchine) permet de préserver un phénotype vasculaire sain, et ce dépendamment du moment d'initiation du traitement et de la condition pathologique.

2.2. Les objectifs de l'étude

- Étudier l'évolution de la fonction endothéliale de l'artère rénale isolée à partir de souris de type sauvage C57bl/6 et dyslipidémiques lors du vieillissement. Déterminer la contribution du stress oxydant dans l'apparition de la dysfonction endothéliale chez la souris dyslipidémique et les mécanismes compensatoires s'y rattachant.
- Évaluer le rôle de la thromboxane A_2 dans la diminution de la dilatation de l'artère rénale suite à l'inhibition pharmacologique de la production de NO et étudier l'implication des radicaux libres dans ce processus. Estimer sa pertinence comme marqueur prédictif de l'apparition future de la dysfonction endothéliale associée au vieillissement.
- Étudier l'impact d'une thérapie antioxydante, débutée avant ou après la période de maturation, sur l'apparition de la dysfonction endothéliale associée au vieillissement ainsi que sur les processus d'inflammation, sachant que les mécanismes de maturation de l'organisme dépendent de l'environnement rédox.
- Étudier l'impact d'une thérapie antioxydante préventive et curative sur la formation de plaques athérosclérotiques et l'apparition de la dysfonction endothéliale associée à l'athérosclérose. Comparer la sensibilité des différents systèmes physiologiques (dilatation et adhésion) à l'athérogenèse ainsi qu'aux différents traitements antioxydants.

3. La méthodologie

Dans cette section, je définirai les modèles animaux dont nous nous sommes servis dans les quatre études réalisées. Par la suite, je décrirai précisément les méthodes, le matériel et les méthodes analytiques utilisés pour les différents types d'expérimentations.

3.1. Les modèles animaux

Le modèle animal utilisé dans chacune des études est la souris mâle de souche C57bl/6. La souris C57bl/6 est utilisée à son état sauvage (WT: *Wild-Type*) ou en présence de modifications génétiques. Le premier modèle de souris transgénique utilisé mime les caractéristiques de la dyslipidémie légère, car les souris expriment l'apolipoprotéine B-100 humaine (hApoB^{+/+}) (Sanan et al., 1998). Le second modèle de souris transgénique utilisé exprime également l'apolipoprotéine B-100 humaine et est en plus déficient pour le récepteur des LDL (LDLr^{-/-}; hApoB^{+/+}) (Sanan et al., 1998). Ces modifications génétiques permettent de développer, sans aucune diète particulière, des lésions athérosclérotiques et de présenter des niveaux de cholestérol et de triglycérides très élevés. Ainsi, les souris LdLr^{-/-}; hApoB^{+/+} représentent un excellent modèle de dyslipidémie sévère et d'athérosclérose.

3.1.1. Les souris C57bl/6 (WT)

Les souris mâles WT ont été utilisées à différents âges, soit à 3, 6 et 12 mois. Dans la première étude, l'utilisation de souris à différents âges a permis d'étudier l'évolution de la fonction endothéliale tout au long du processus du vieillissement et de déterminer, à l'aide d'inhibiteurs et de bloqueur spécifiques, la contribution des différents facteurs vasorelaxants. Dans la plupart des études, ces souris ont servi de groupe de référence.

3.1.2. Les souris dyslipidémiques C57bl/6 hApoB^{+/+}

La souris dyslipidémique est un modèle de souris transgénique exprimant, par l'utilisation d'un transgène, l'apolipoprotéine B-100 humaine (Purcell-Huynh et al., 1995:

Sanan et al., 1998). Sous une diète régulière, ces souris développent une dyslipidémie légère, mais notable. Les niveaux de cholestérol sont 50% (160 mg/dL) plus élevés chez les souris dyslipidémiques comparativement aux souris WT. Les niveaux de triglycérides sont, quant à eux, 100% plus élevés (200 mg/dL) (Gendron et al., 2007). Les souris dyslipidémiques ne développent pas de lésions athérosclérotiques. Il s'agit d'un modèle adéquat afin d'étudier l'impact d'une dyslipidémie légère. Des souris mâles dyslipidémiques âgées de 3, 6 et 12 mois ont été utilisées dans la première étude afin d'évaluer l'impact de la dyslipidémie sur l'évolution de la fonction endothéliale tout au long du processus de vieillissement. L'évolution de la fonction endothéliale de ces souris a été comparée à celle des souris WT.

3.2.3. Les souris athérosclérotiques C57bl/6 LdLr^{-/-}; hApoB^{+/+}

La souris athérosclérotique est à la fois déficiente pour le récepteur aux LDL et exprime l'apolipoprotéine B-100 humaine (Sanan et al., 1998). Tel que mentionné dans la section 1.4.4., sous une diète régulière, ces souris développent intensément des lésions complexes et avancées d'un bout à l'autre de l'arbre vasculaire. Elles présentent un profil lipidique principalement constitué de LDL et de très peu de VLDL. Des souris mâles athérosclérotiques âgées de 3, 6 et 12 mois ont été utilisées dans la quatrième étude afin d'évaluer l'impact de l'athérosclérose sur l'évolution de la fonction endothéliale tout au long du processus de vieillissement et de déterminer l'effet d'une thérapie antioxydante sur celle-ci. L'évolution de la fonction endothéliale de ces souris a été comparée à celle des souris WT.

3.2. Les études de réactivité vasculaire

Les études de réactivité vasculaire permettent d'évaluer la fonction dilatatrice et constrictrice des vaisseaux sanguins. La fonction vasculaire peut être étudiée à l'aide d'un myographe à fils (myographe isométrique), un système dont les résultats générés sont basés

sur la mesure de changements de tension induit par une stimulation pharmacologique. Ce système est pratique et facile d'utilisation, cependant il ne tient pas compte de certains aspects physiologiques des vaisseaux, tels que la présence d'une pression transmurale constante et le maintien de la forme naturelle du vaisseau. L'artériographe ou le myographe pressurisé est un système avec lequel les changements de diamètre induits par un agent pharmacologique, une variation de pression, de débit ou de volume, sont mesurés. Ce dernier système a été utilisé dans nos études.

3.2.1. Isolation et préparation de l'artère rénale

Le jour de l'expérimentation, la souris est placée dans une chambre hermétique et sacrifiée par inhalation de dioxyde de carbone (CO_2). Par la suite, les régions de l'abdomen et du thorax de la souris sont incisées. La graisse abdominale, les intestins et le foie sont retirés afin d'exposer l'aorte abdominale. La graisse recouvrant les reins est délicatement enlevée en s'assurant de ne pas abîmer les artères rénales qui relient chacun des reins à l'aorte abdominale. Chacune des artères est minutieusement isolée en coupant à la jonction de l'artère et de l'aorte ainsi qu'aux points d'union des branches de l'artère rénale (deux branches par artère rénale) et du rein.

Les artères sont ensuite déposées dans une boîte de Pétri dont le fond est recouvert de Sylgard, un gel de silicone, et contenant une solution saline physiologique (PSS) froide (4°C). La composition de cette solution est la suivante (mmol l^{-1}): NaCl 130 ; KCl 4.7 ; CaCl_2 1.6 ; MgSO_4 1.17 ; NaHCO_3 14.9 ; KH_2PO_4 1.18 ; EDTA 0.026 ; glucose 10 ; et oxygénée avec 12% O_2 / 5% CO_2 / 83% N_2 (pH 7.4). Les artères sont fixées avec des aiguilles d'entomologie sur le Sylgard et nettoyées des gras et tissus conjonctifs restants à l'aide de pinces et de ciseaux pour microdissection.

3.2.2. Description de l'artériographe

L'artériographe est un système comprenant une cuve (2 mL) équipée de deux canules de verre se faisant face, un microscope inversé, une caméra vidéo, un moniteur vidéo, un servo contrôle, une pompe péristaltique, des capteurs de pression et un système de détection de zones de forte densité optique (Figure 7). Avant de débiter l'expérimentation, il est important de perfuser toutes les tubulures qui composent l'artériographe avec du PSS et de s'assurer que les canules de verre ne sont pas obstruées.

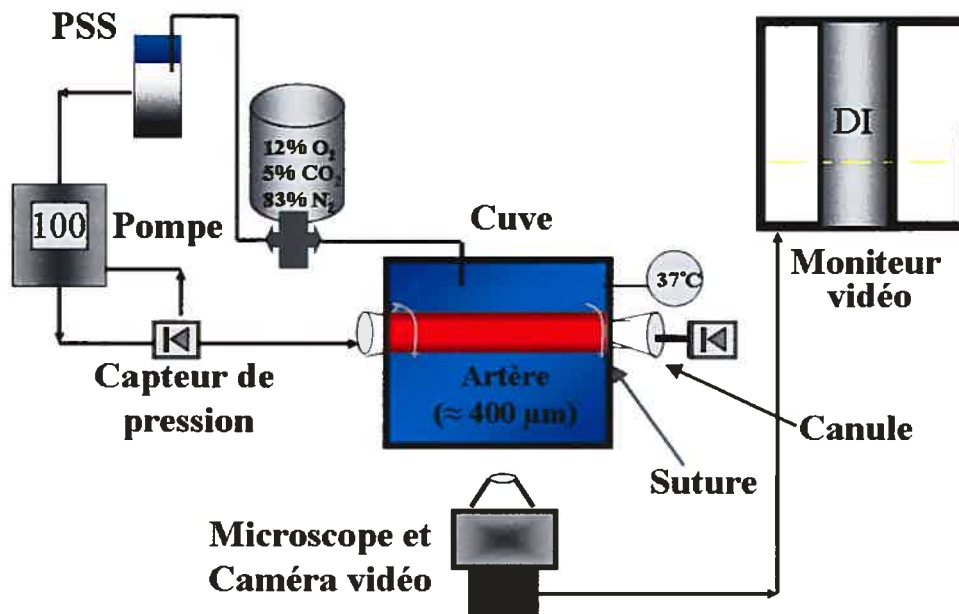


Figure 7. Représentation graphique de l'artériographe

Un segment d'environ 4 mm est coupé de l'artère rénale et immergé rapidement dans la cuve contenant du PSS. L'artère est délicatement glissée sur la canule de verre

reliée à la pompe péristaltique et ligaturée avec un fil chirurgical. Ensuite, un faible débit est amorcé par l'activation de la pompe péristaltique, permettant de libérer la lumière du segment d'artère de toutes traces de sang. La pompe est arrêtée et la deuxième extrémité de l'artère est glissée et ligaturée à l'autre canule. Cette deuxième canule est fermée et le système est donc utilisé en circuit fermé, sans débit. La pompe est activée en mode automatique et le servo contrôle est ajusté de manière à maintenir une pression transmurale de 100 mm Hg. La pression optimale est déterminée à l'aide de courbes pression-diamètre (voir section 3.2.4. « Optimisation de la pression transmurale »). S'il y a présence d'une fuite, causée par exemple par une petite collatérale, la pression n'est pas maintenue et la pompe tente de compenser afin de maintenir la pression. À ce moment, la collatérale doit être ligaturée ou, préférablement, le segment entier doit être remplacé.

La température dans la cuve est maintenue à 37°C et est oxygénée. L'artère est gardée dans ces conditions pour 40 minutes. Si des agents pharmacologiques sont utilisés, tels que des bloqueurs ou des inhibiteurs, ceux-ci sont ajoutés au début de la période d'équilibration.

3.2.3. Réalisation du protocole

Comme l'artère est soumise à une pression transmurale constante, un tonus myogénique se développe (vasoconstriction de l'artère en réponse à la pression exercée sur les parois). Dans la plupart des cas, le niveau de constriction n'est pas suffisant et l'artère doit être contractée davantage. Dans le présent cas, les artères rénales ont été contractées à l'aide de la phényléphrine, un agoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques. Ensuite, des concentrations croissantes d'acétylcholine, ou de tous autres agents pharmacologiques vasodilatateurs (bradykinine, nitroprussiate de sodium), sont ajoutés afin d'obtenir une courbe concentration-réponse. La dilatation maximale est induite en changeant la solution de PSS dans la cuve pour une solution de PSS dépourvue de calcium et contenant du SNP (Figure 8).

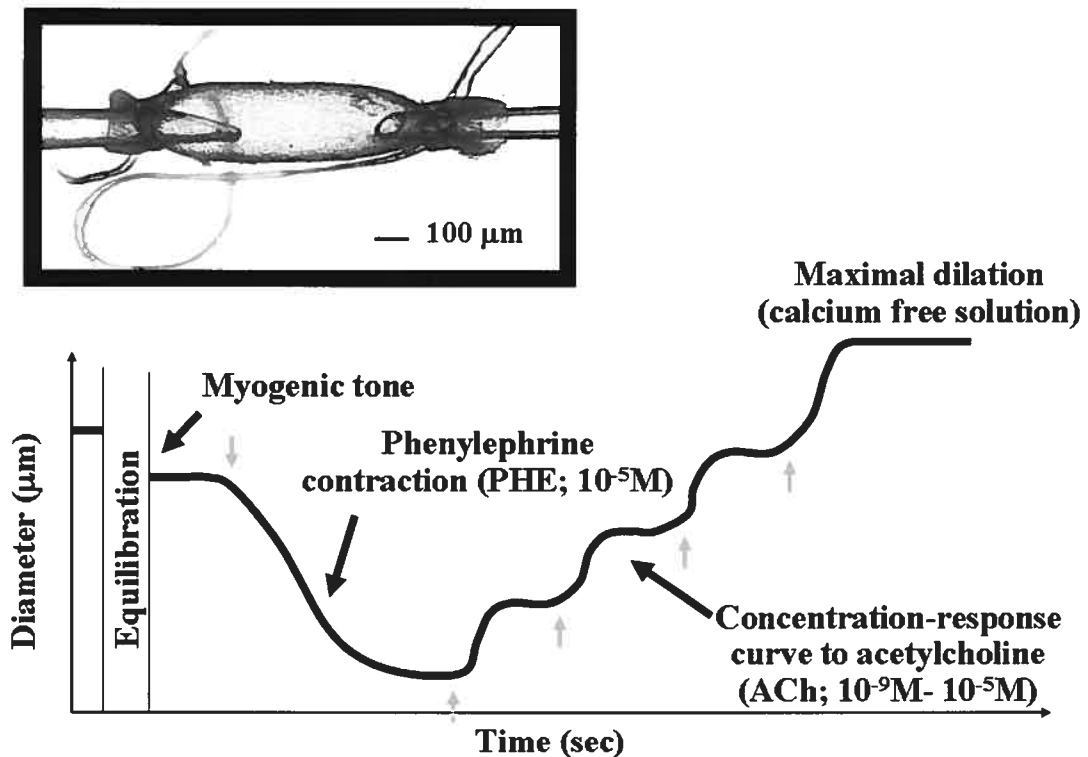


Figure 8. Représentation graphique d'un protocole

3.2.4. Optimisation de la pression transmurale

L'optimisation de la pression transmurale est une étape essentielle avant le début de l'expérimentation. Seule, l'utilisation d'une pression transmurale adéquate permet d'obtenir des réponses vasoconstrictrices et vasodilatatrices appropriées à des agents pharmacologiques ou à une variation de débit. La pression transmurale optimale est obtenue à l'aide de courbes pression-diamètre. Pour ce faire, l'artère est fixée dans l'artériographe et pressurisée à une faible pression, par exemple 5 mm Hg. Le diamètre est noté à cette pression. Ensuite, la pression est lentement augmentée à 10 mm Hg et ainsi de suite par tranche de 5 mm Hg. Le diamètre de l'artère est noté après qu'une période de 15 minutes se soit écoulée suivant l'augmentation de pression. Le diamètre est maintenu (formation d'un plateau) dans un certain intervalle de pression qui correspond au tonus

myogénique (Figure 9). C'est à une pression contenue dans cet intervalle que l'artère doit être pressurisée.

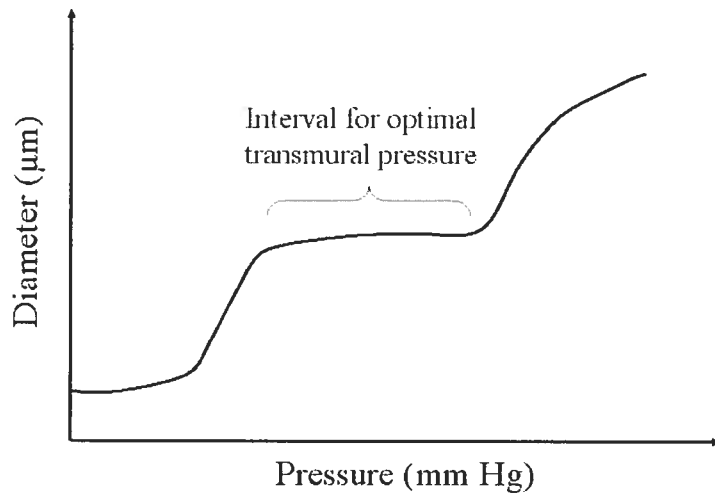


Figure 9. Courbe pression-diamètre

3.2.5. Présentation des résultats sous la forme de courbes concentration-réponse

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de courbes concentration-réponse. L'abscisse représente le logarithme des concentrations molaires (M) croissantes de l'agoniste (acétylcholine) utilisées. L'ordonnée représente la dilatation exprimée en pourcentage du diamètre maximal (Figure 10).

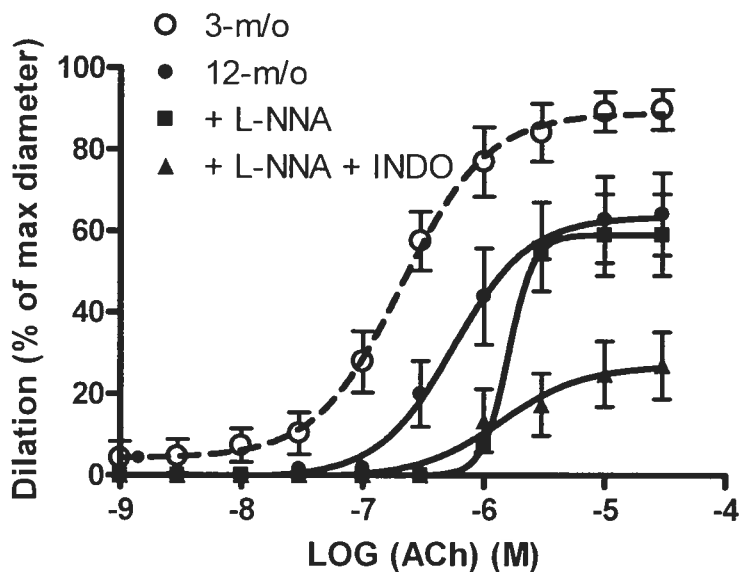


Figure 10. Exemple de courbes concentration-réponse

3.2.5.1. Puissance de l'agoniste (Effet maximal)

La dilatation maximale induit par un agoniste représente l'effet maximal (E_{max}) induit par cet agoniste. La dilatation maximale indique la puissance d'un agoniste. La dilatation maximale induite par un même agoniste peut varier selon le type d'artère utilisé, l'âge, la présence d'agents pharmacologiques (bloqueurs et inhibiteurs), les conditions pathologiques et expérimentales. Par exemple, nous pouvons remarquer sur le graphique de la Figure 10 que l'âge a provoqué une diminution de la dilatation maximale des artères rénales provenant de souris âgées de 12 mois (64%) comparativement aux artères rénales provenant de souris âgées de 3 mois (90%). De plus, l'ajout combiné d'inhibiteurs tels que le L-NNA (N ω -nitro-L-arginine), un inhibiteur des NOS, et l'indométacine (INDO), un inhibiteur des cyclooxygénases, a diminué la dilatation maximale (27%) des artères rénales provenant des souris âgées de 12 mois.

3.2.5.2. Sensibilité à l'agoniste (EC_{50})

La sensibilité d'une artère à un agoniste est défini par l' EC_{50} de la courbe concentration-réponse. L' EC_{50} est la concentration nécessaire afin d'obtenir la moitié de l'effet maximal. La sensibilité peut également varier selon le type d'artère utilisé, l'âge, les conditions pathologiques et expérimentales et la présence d'agents pharmacologiques. Les valeurs d' EC_{50} peuvent aussi être exprimées en pD_2 , le logarithme de l' EC_{50} . En se référant à la Figure 10, nous remarquons que la sensibilité vasculaire à l'acétylcholine des artères rénales provenant de souris âgées de 12 mois (pD_2 : 6.3) est plus faible que celle observée avec les artères rénales provenant de souris âgées de 3 mois (6,7). Le déplacement de la courbe concentration-réponse vers la droite (vers des concentrations plus élevés d'acétylcholine) permet de visualiser cette baisse de sensibilité associé au vieillissement. Nous pouvons également noter que l'ajout de L-NNA n'a pas modifié la puissance de l'agoniste, mais a diminué la sensibilité vasculaire à l'acétylcholine des artères rénales isolées des souris âgées de 12 mois (5.8).

3.2.5.3. Utilisation de bloqueurs et d'inhibiteurs spécifiques

Plusieurs bloqueurs ou inhibiteurs spécifiques peuvent être utilisés afin de caractériser l'implication des différentes voies vasodilatatrices et vasoconstrictrices. Les principaux agents pharmacologiques utilisés dans les travaux présentés dans cette thèse sont résumés dans le tableau 1 :

Tableau 1. Agents pharmacologiques

Nom de l'agent	Cible de l'agent	Voie impliquée
Nω-nitro-L-arginine (L-NNA) 10 μ M (Vequaud et Thorin, 2001)	NO synthases	L'ajout de L-NNA inhibe l'activité des NO synthases en entrant en compétition avec le substrat naturel de l'enzyme, la L-arginine, provoquant une diminution de la production de NO.
Indométacine (INDO) 10 μ M (Thorin, 2001)	Cyclooxygénases (COX)	L'ajout d'indométacine inhibe non-spécifiquement les cyclooxygénases-1/2 et diminue ainsi la production de prostacycline, de prostaglandines (PGD ₂ , E ₂ et F _{2α}) ainsi que de thromboxane A ₂ (TXA ₂).
Valeryl salicylate (VS) 1 mM (Lan et al., 2001; Secchiero et al., 2002)	Cyclooxygénase-1 (COX-1)	L'ajout de VS inhibe spécifiquement la COX-1 et diminue la libération de ses produits spécifiques (différent selon le type cellulaire et les conditions).

NS-398 10 μ M (Sun et al., 2006)	Cyclooxygénase-2 (COX-2)	L'ajout de NS-398 inhibe spécifiquement la COX-2 et diminue la libération de ses produits spécifiques (différent selon le type cellulaire et les conditions)
Furegrelate 10 μ M (Bolla et al., 2004)	TXA ₂ synthase	L'ajout de Furegrealate inhibe spécifiquement la TXA ₂ synthase et diminue la libération de TXA ₂ .
SQ 29,548 10 μ M (Bolla et al., 2004)	Récepteur TP	L'ajout de SQ 29,548 bloque le récepteur TP et empêche ainsi la liaison de ses agonistes naturels (TXA ₂ , PGH ₂).
N-acetyl-L-cystein (NAC) 1 μ M (Krummen et al., 2006)	Radicaux libres	Le NAC réduit l'action des radicaux libres en les piégeant et en augmentant le glutathion, un tripeptide possédant des propriétés antioxydantes.
Catalase (CAT) 100 U/ml (Drouin et al., 2007)	Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	L'ajout de catalase diminue spécifiquement la production de H ₂ O ₂ en le métabolisant en eau et oxygène.

3.3. Mesure des radicaux libres par le CM-H₂DCF-DA

3.3.1. Mécanisme d'action du CM-H₂DCF-DA

Le 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H₂DCF-DA) est un indicateur non-spécifique des radicaux libres. Le CM-H₂DCF-DA est une sonde qui diffuse facilement à travers les membranes cellulaires et qui devient fluorescente lorsque qu'un groupe acétate est retiré par des estérases intracellulaires et lorsqu'il y a oxydation dans la cellule.

3.3.2. Description de la méthode

L'artère rénale est isolée et pressurisée dans un artériographe. Le CM-H₂DCF-DA (5 µmol/L) est ajouté au PSS de la cuve 30 minutes avant le début de la réalisation de la courbe concentration-réponse, ce qui permet l'incorporation de l'indicateur fluorescent dans l'artère. L'excédent de CM-H₂DCF-DA est lavé en changeant plusieurs fois le PSS de la cuve. Les intensités de fluorescence à 492-495 nm (excitation) sont mesurés à 520 nm à l'aide d'un système d'acquisition IonOptix (IonOptix, MA, U.S.A.). La fluorescence basale est fixée à un même niveau arbitraire pour toutes les artères au début de chaque expérience. Les changements de fluorescence peuvent être mesurés suite à une stimulation par un agoniste, un changement de débit ou tout simplement suite à l'ajout d'inhibiteurs ou de bloqueurs. La spécificité de la sonde est évaluée en ajoutant du H₂O₂ (500 µmol/L) dans la cuve.

Ce type de protocole a été réalisé dans la deuxième étude afin d'étudier l'implication des radicaux libres dans la contraction induite par la TXA₂.

3.4. Immunofluorescence par microscopie confocale

3.4.1. Étude #1

Dans le premier article, les études d'immunofluorescence ont été réalisées à l'aide de coupes d'aorte de souris. Le but de ces expériences était d'observer la localisation ainsi que le niveau d'expression de certaines protéines en particulier.

3.4.1.1. Prélèvement et préparation des tissus

Tout d'abord, les aortes sont isolées et nettoyées soigneusement pour ensuite être déposées dans une tube contenant du 2-méthyl-butane ayant été préalablement congelé dans de l'azote liquide. Les tubes de 2-méthyl-butane contenant les aortes sont une fois de plus rapidement déposés dans l'azote liquide et conservés à -80°C . Le jour de l'expérimentation, des coupes d'aorte sont effectuées à l'aide d'un cryostat : les aortes sont enrobées de milieu de montage (Tissue-Tek® OCT), sectionnées en coupes d'une épaisseur de $14\ \mu\text{m}$ et déposées sur des lames préalablement traitées avec la poly-L-lysine, permettant une adhérence ferme. À cette étape, les lames peuvent être conservées à -80°C .

3.4.1.2. Description de la méthode

Le jour du marquage immuno-fluorescent, les coupes sont fixées avec une solution de 4% de paraformaldéhyde (pH 7.25) pendant 15 minutes. Les lames sont ensuite lavées 3 fois avec une solution de *Phosphate buffered saline* (PBS) (5 minutes pour chaque lavage). Une période de blocage des sites non-spécifiques est ensuite réalisée pendant 1 heure, avec une solution de 2% de sérum normal (sérum de l'hôte avec lequel est réalisé l'anticorps secondaire, dit « normal » puisqu'il provient d'animaux normaux) et de 0.5% de triton X-100 (agent perméabilisant). Par la suite, le marquage avec l'anticorps primaire est réalisé pendant 12 heures : l'anticorps est dilué dans une solution de 1% de sérum normal et de

0.1% de triton X-100 (anti-COX-1 (dilution 1:100; Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA), anti-COX-2 (dilution 1:300; Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA) et anti-HNE (dilution 1:400; Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA)). Cette étape est suivie de 3 lavages au PBS et du marquage avec l'anticorps secondaire lié à une molécule fluorescente. L'anticorps secondaire (dilution 1:500; Alexa 647-conjugated donkey anti-rabbit antibody, Invitrogen) est dilué dans la même solution que l'anticorps primaire. Pour chaque anticorps secondaire, un contrôle négatif est réalisé en omettant l'incubation avec l'anticorps primaire (utilisation du diluant seulement). Suite à 3 lavages au PBS, les coupes sont finalement montées entre lame et lamelle avec un milieu de montage contenant 0.2% de DABCO dans du glycérol.

3.4.2. Étude #3

À la différence de la première étude, la visualisation du marquage immuno-fluorescent dans le troisième article n'a pas été réalisée à l'aide coupes transversales, mais avec des segments entiers d'aorte observés *en face*. Le but de cette étude était d'observer l'expression de molécules d'adhésion localisées à la surface de l'endothélium et de visualiser l'adhésion des splénocytes (lymphocytes isolés à partir de la rate de la souris) sur l'endothélium.

3.4.2.1. Préparation des tissus

Chacun des segments d'aorte ayant été exposé aux splénocytes et fixé avec un fixateur pour tissus (voir la section 3.7. « Étude d'adhésion des splénocytes à l'endothélium ») est déposé dans un puits d'une plaque de 24 puits, dont le fond a été préalablement recouvert de Sylgard. Une aiguille pour entomologie est utilisée afin de fixer le segment au fond du puits à une seule extrémité.

3.4.2.2. Description de la méthode

Premièrement, les segments sont lavés avec du chlorure d'ammonium (NH_4Cl), permettant de réduire l'auto-fluorescence des tissus due à l'agent fixateur. Par la suite, les segments sont lavés 3 fois (lavages de 5 minutes chacun) avec du PBS. Une période de blocage des sites non-spécifiques est ensuite réalisée pour une période de 1 heure avec une solution de 2% de sérum normal (sérum de l'hôte avec lequel est réalisé l'anticorps secondaire) et de 0.5% de triton X-100 (agent perméabilisant). Par la suite, le marquage avec l'anticorps primaire est réalisé pendant 12 heures. L'anticorps est dilué dans une solution de 1% de sérum normal et de 0.1% de triton X-100 (anti-CD45 FITC conjugué (dilution 1:20; Beckman Coulter), anti-VE-Cadherine (dilution 1:50; Santa Cruz), anti-ICAM-1 (dilution 1:50; Santa Cruz) ou anti-P-sélectine (dilution 1:50; Santa Cruz)). Cette étape est suivie de 3 lavages au PBS et du marquage avec l'anticorps secondaire lié à une molécule fluorescente. L'anticorps secondaire (dilution 1:500; Alexa 647-conjugated donkey anti-rabbit antibody, Alexa 546-conjugated donkey anti-goat antibody, Invitrogen) est dilué dans la même solution que l'anticorps primaire. Pour chaque anticorps secondaire, un contrôle négatif est réalisé en omettant l'incubation avec l'anticorps primaire. Cette étape est suivie de 3 lavages au PBS et finalement les segments sont délicatement déposés sur une lame de manière à exposer l'endothélium vers le haut et sont recouverts d'un milieu de montage contenant 0.2% de Dabco dans du glycérol et d'une lamelle.

3.4.3. Analyse et optimisation des images

La fluorescence est visualisée à l'aide d'un microscope confocal à balayage LSM 510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Pour la première étude un objectif 63x/1.4 Plan-Apochromat a été utilisé. Des images en série (Z-stack) ont été observées sur une épaisseur de 14 μm . Pour la troisième étude un objectif 63x/1.4 Plan-Apochromat a été utilisé. Les Z-stack ont été observées sur une épaisseur de 40 μm (0.2 μm x 0.2 μm x 0.3 μm in XYZ). Les Z-stacks ont été déconvolués dans les deux cas à l'aide du programme Huygens

Professionnal 2.10 (Scientific Volume Imaging, Alexanderlaan, The Netherlands). Dans la troisième étude, les images en 3-dimensions ont été réalisées avec le programme Velocity 4.0 (Improvision, Quorum Technologies, Guelph, Canada).

3.4.3.1. Le principe de la microscopie confocale à balayage et à fluorescence

Le microscope confocal à balayage est un microscope optique qui a la propriété de réaliser des images de très faible profondeur de champ (environ 600 nm) appelées « sections optiques ». En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon, il est possible de réaliser des séries d'images (Z-stack) à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle de l'objet. En microscopie optique classique, pour qu'une image soit nette, il faut que l'objet soit dans le plan focal du système optique. Lorsqu'un objet est épais ou bien lorsqu'il est incliné par rapport à l'objectif, seule une partie de l'objet est nette dans l'image.

Pour résoudre ce problème, on éclaire la surface non plus par un faisceau de lumière blanche, mais par un rayon laser, concentré par une lentille, qui balaie la surface en positionnant une sténopée (*pin hole*) devant le détecteur, dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif (plans confocaux). De cette manière, seuls les photons provenant du plan focal passent la sténopée et participent à la formation de l'image, d'où le nom « confocal » (Figure 11).

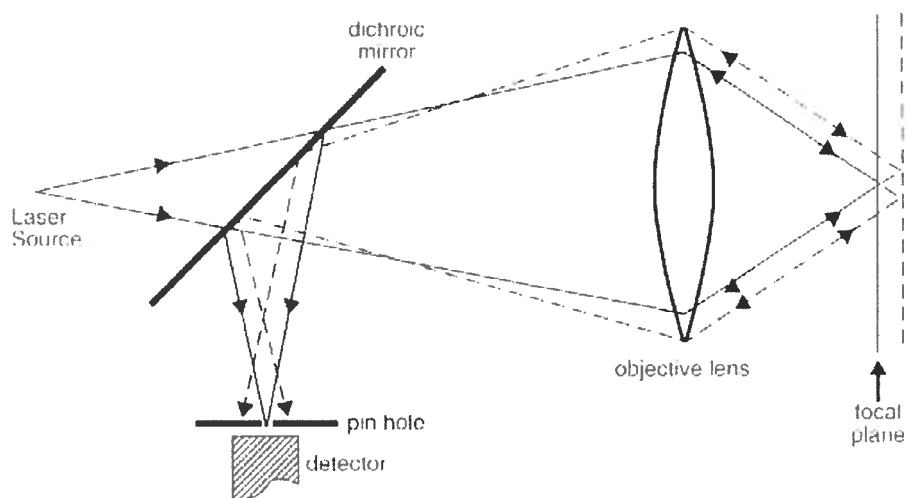


Figure 11. Principe du microscope confocal

Le balayage par le laser se fait à l'aide de deux miroirs orthogonaux. Les détecteurs utilisés sont des tubes photo-multiplieurs (PMT), l'intensité lumineuse est mesurée et numérisée en fonction de la position du laser dans l'échantillon : on obtient directement des images numériques.

En microscopie de fluorescence on peut visualiser des cellules, des substances, des molécules non fluorescentes en les marquant avec des fluorochromes. Il est donc possible de marquer des protéines avec des anticorps spécifiques liés à une molécule fluorescente comme décrit dans les sections précédentes. Lorsqu'un spécimen est illuminé avec un laser à la bonne longueur d'onde (longueur d'onde d'excitation se trouvant dans le spectre d'absorption de la molécule fluorescente), celui-ci émet de la lumière à une longueur d'onde plus élevée (longueur d'onde d'émission). Cette lumière émise peut être détectée. Les lasers utilisés le plus fréquemment sont les suivants : argon-ion (longueurs d'onde : 457nm, 488nm, 514nm), hélium-néon (543nm), hélium-néon (633nm).

3.4.3.2. La déconvolution

La déconvolution est une opération mathématique utilisée afin de retrouver une image qui a été dégradée par un processus physique (appelé convolution). Cette situation est rencontrée lors de la formation d'images par des systèmes optiques comme ceux utilisés en microscopie et astronomie ainsi que pour les mesures sismiques. La convolution décrit la formation d'une image dégradée par le brouillement et les bruits de fond. L'aspect trouble d'une image est causé par la faible capacité de diffraction de l'instrument. Le bruit de fond est pour sa part causé par les photons.

Les Z-stacks ont été déconvolués par le logiciel Huygens Professionnal 2.10 (Scientific Volume Imaging, Alexanderlaan, The Netherlands). Les billes de fluorescence (170 nm de diamètre, Invitrogen) ont été utilisées afin de construire une fonction de *point spread* (PSF) correspondant à chaque marqueur fluorescent. Le rapport signal sur bruit a été quantifié pour chaque marqueur et pour chaque Z-stack. Les images déconvoluées ont été par la suite sauvées en images en séries TIFF et une projection transparente (en utilisant toutes les coupes de l'image déconvoluée en respectant l'axe des Y) a été calculée en utilisant les instruments de projection du logiciel LSM 510 software (Zeiss). Un exemple d'une bille de fluorescence non-déconvoluée et déconvoluée est illustré sur la Figure 12.

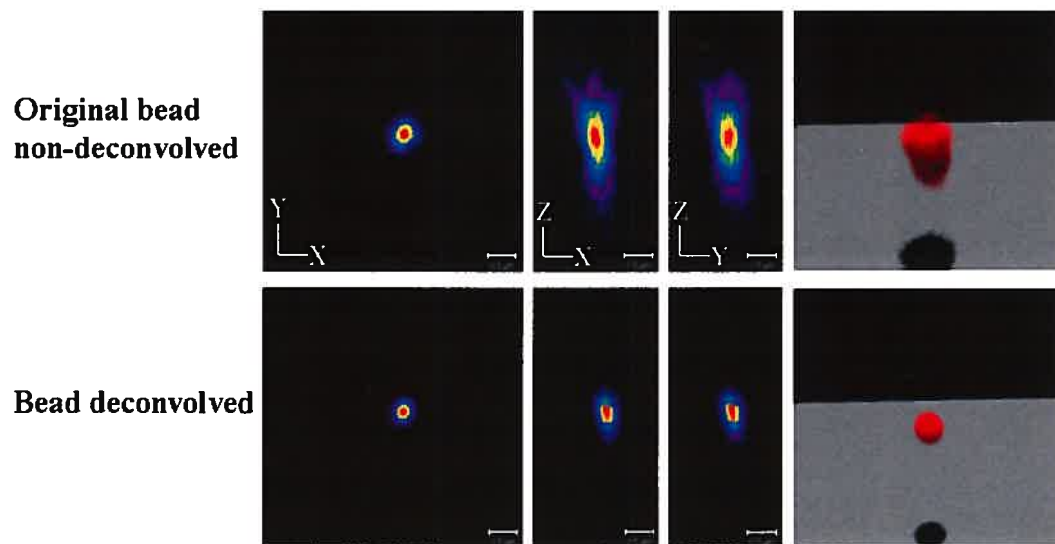


Figure 12. Exemple d'une bille de fluorescence non-déconvoluée et déconvoluée

3.5. Immunobuvardage de type Western

Des immunobuvardages de type Western ont été réalisés dans la première étude afin d'évaluer les niveaux d'expression protéiques de la eNOS, de la COX-1 et de la COX-2. L'expression protéique de la β -actine a été utilisée afin de normaliser les niveaux d'expression.

3.5.1. Culture cellulaire

Les extraits protéiques ont été isolés à partir de cellules endothéliales aortiques de souris (MAEC) mises en culture. L'aorte fraîchement isolée sous la hotte stérile est ouverte délicatement dans le sens de la longueur, afin de ne pas endommager l'endothélium. L'aorte est ensuite sectionnée en petits morceaux de 1 mm^2 (Shi et al., 2000; Thorin et al., 1997). À l'aide d'un binoculaire, les segments d'aorte sont disposés sur une surface de Matrigel (Beckton Dickinson) préalablement coulée dans une boîte de Pétri (35 mm^2) et

recouvert de milieu de culture Dubelcco's modified Eagle (DMEM) additionné de sérum et de facteurs de croissance (10% sérum foetal bovin, 10% de sérum de veau, 1% pénicilline-streptomycine, 90 µg/ml sodium heparin salt (Sigma-Aldrich), 60 µg/ml supplément de croissance pour cellules endothéliales (Beckton Dickinson), et 100 U/ml fungizone (Gibco)). Les boîtes de Pétris sont déposés dans un incubateur (37°C: 95% air/5% CO₂) et les milieux sont changés tous les trois jours. Lorsqu'un tapis cellulaire entoure bien les segments aortiques, ceux-ci sont délicatement retirés du Matrigel. Lorsque le nombre de cellules est suffisamment important, le Matrigel est digéré avec la dispase (Beckton Dickinson) et les cellules sont transférées dans une boîte de Pétri plus large (100 mm²). La nature endothéliale des cellules a été confirmée par microscopie confocale (cellules adhérentes sur une lame) en utilisant les marqueurs endothéliaux CD31 et le facteur de von Willbrand (Thorin et al., 1997).

À confluence, les cellules sont décollées de la boîte de Pétri avec de la trypsine (Invitrogen), une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé basique (Lysine ou Arginine) engage sa fonction acide. La digestion par la trypsine est arrêtée par l'addition excessive de milieu de culture. Les cellules sont ensuite centrifugées et le culot est lavé à l'aide de plusieurs lavages avec du PBS. Le culot cellulaire est soit immédiatement utilisé afin d'isoler les protéines ou conservé à -80°C.

3.5.2. Préparation des échantillons

Nous avons effectué une extraction standard de protéines totales avec un tampon de lyse dénaturant ayant la composition suivante (mM): Tris-HCl pH 7.5 50, β-glycérophosphate 20, Sodium fluoride 20, EDTA 5, EGTA 10, Na₃VO₄ 1, triton 1% v/v, cocktail d'inhibiteur de protéases: microcystéine 1 µM, DTT 5 mM, leuptyne 10 µg/ml, PMSF 0.5mM et benzamidine 10 mM. Le volume de tampon de lyse utilisé variait selon le culot cellulaire obtenu. La quantification protéique a été réalisée en se servant de la

technique de Bradford. Nous avons utilisé 35 µg de protéines pour chacun des échantillons, le volume final étant complété par l'utilisation de tampon de lyse.

3.5.3. Description de la méthode

Les protéines ont été séparées sur un gel d'acrylamide SDS-PAGE avec un gradient 10-20% (w/v). Par la suite, les échantillons protéiques ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose à 100 V pendant 90 minutes et maintenus à 4°C dans un tampon ayant la composition suivante : 25 mM de Tris base, 192 mM de glycine et 5% de méthanol. Les membranes ont ensuite été bloquées pendant 2 heures avec du lait 5% (Carnation) dans : 25 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM de NaCl ainsi que 0.05% de Tween 20 (TBST). Les membranes ont été incubées pendant 12 heures avec l'anticorps primaire (rabbit polyclonal anti-COX-2, 1:1000, Cayman Chemical, Arbor, MI; rabbit polyclonal anti-COX-1, 1:250, Cayman Chemical, Arbor, MI; rabbit polyclonal anti-eNOS, 1:200, BD Transduction Laboratories, San Jose, CA) dilué dans du lait 5% pour ensuite être lavées avec du TBST (3 X 10 minutes) et re-bloquées dans une solution contenant du lait 5% et du TBST (1 X 10 min). Les membranes ont par la suite été incubées pendant 2 heures avec leur anticorps secondaire respectif dilué dans du lait 5% (horseradish peroxidase-conjugated, 1:20 000). Suite à un lavage intensif avec du TBST les bandes ont été visualisées par chemiluminescence (Renaissance Plus, Perkin-Elmer Life Sciences) sur des films Bio-Max selon les instructions du producteur. L'expression de chacune des protéines étudiées a été normalisée selon l'expression de la β-actine (rabbit polyclonal anti-β-actine, 1:1.000, Abcam, Cambridge, MA).

3.6. Dosage par ELISA de TXB₂

Le dosage de la thromboxane A₂ (TXA₂) a été réalisé dans le cadre de la deuxième étude, puisque celle-ci ciblait un mécanisme impliquant potentiellement cette prostaglandine vasoconstrictrice. La TXA₂ est produite à partir de l'AA par plusieurs types

cellulaires et peut induire de manière irréversible l'agrégation plaquettaire et la contraction des muscles lisses du système vasculaire et respiratoire (Ellis et al., 1976; Hamberg et al., 1975; Salzman et al., 1980). La TXA_2 est une prostaglandine qui est rapidement hydrolysée de manière non-enzymatique en TXB_2 , son métabolite stable. Il est commun d'estimer les niveaux de TXA_2 en mesurant les niveaux de TXB_2 . Comme les concentrations normales de TXB_2 circulant sont extrêmement faibles (1-2 pg/ml) et que la demi vie est courte ($t_{1/2} = 5-7$ minutes), ceci entraîne des erreurs lors des mesures (Lawson et al., 1986; Patrono et al., 1986). Afin de contourner ce problème il est donc nécessaire de mesurer un produit métabolique de la TXB_2 . Il est connu que la TXB_2 peut être métabolisé par la 11-hydroxy thromboxane déshydrogénase pour former du 11-dehydro TXB_2 , ou par la β -oxydation pour former du 2,3-dinor TXB_2 (Roberts et al., 1981). Des études utilisant la TXB_2 ont démontré que les deux métabolites sont formés en quantité égale, cependant le 11-dehydro TXB_2 possède une demi-vie plus longue ($t_{1/2} = 45$ minutes) (Ciabattoni et al., 1989; Lawson et al., 1986). Nous avons donc décidé de mesurer ce dernier métabolite afin d'évaluer la production de TXA_2 . Afin de corrélér le plus justement les résultats de réactivité vasculaire obtenus avec les mesures de TXA_2 , nous avons décidé de mesurer les niveaux de 11-dehydro TXB_2 directement dans la cuve de l'artériographe.

3.6.1. Description de la méthode

Comme présenté précédemment dans la section 3.2. intitulée « Les études de réactivité vasculaire », un segment d'artère rénale de souris est isolé et pressurisé dans un artériographe (cuve de 2 ml). Les agents pharmacologiques sont ajoutés au bain lors de la période d'équilibration (Figure 8). Les artères sont contractées avec la phényléphrine et ensuite dilatées avec une dose unique d'acétylcholine (30 μ mol/L). À la fin du protocole, le PSS contenu dans la cuve est collecté et entreposé à -80°C . Le niveau de métabolite stable de 11-dehydro TXB_2 a été évalué par ELISA (Cayman chemical company, Ann Arbor, MI, USA). Afin d'être dans les limites de détection de l'essai (20 pg/ml) les échantillons ont été

concentrés. Les échantillons (2 ml) ont été évaporés et dilués dans 150 μ L de tampon EIA fourni dans le kit ELISA.

L'essai utilisé est basé sur le principe de compétitivité entre le 11-dehydro TXB₂ et un conjugué de la 11-dehydro TXB₂ acétylcholinestérase (11-dehydro TXB₂ *tracer*) pour un nombre limité de sites de liaison de l'antisérum de lapin spécifique pour le 11-dehydro TXB₂. Comme la concentration de *tracer* est tenue constante et que la concentration de 11-dehydro TXB₂ varie, la quantité de *tracer* qui sera liée à l'antisérum de lapin sera inversement proportionnelle à la concentration de 11-dehydro TXB₂ présente. Le complexe antisérum-11-dehydro TXB₂ (*tracer* ou libre) se lie à un anticorps IgG monoclonal de souris anti-lapin fixé au fond du puits. Les puits sont ensuite lavés afin d'enlever tout réactif ne s'étant pas lié. Par la suite le réactif contenant le substrat de l'ACHé (lié au *tracer*) est ajouté à chacun des puits afin d'évaluer la concentration de *tracer* dans le puits. Le produit de cette réaction enzymatique induit une couleur jaunâtre qui absorbe la lumière à 412 nm. L'intensité de la couleur déterminée par spectrophotométrie est proportionnelle à la concentration de 11-dehydro TXB₂ *tracer* et donc inversement proportionnelle à la concentration de 11-dehydro TXB₂ libre (Figure 13).

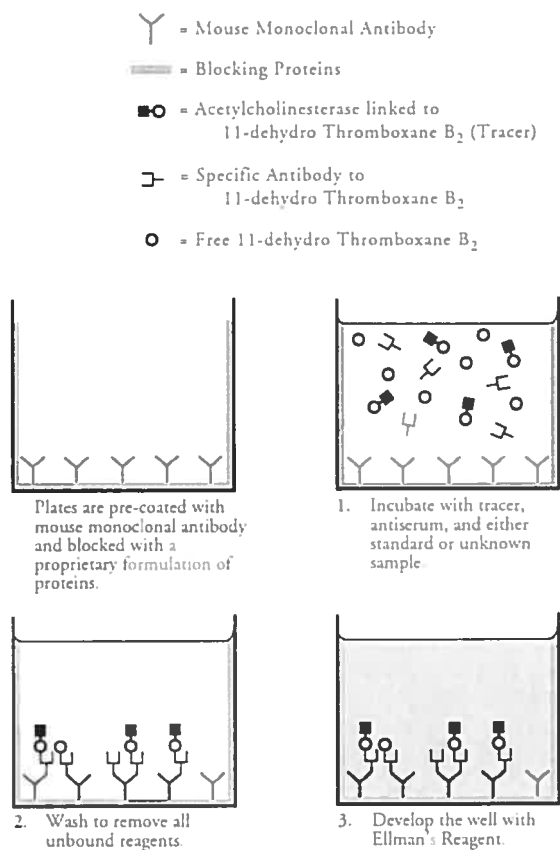


Figure 13. Représentation schématique de l'ELISA

3.7. Étude d'adhésion des splénocytes à l'endothélium

L'intégrité de l'endothélium vasculaire et des cellules circulantes peut être évaluée par leur capacité à adhérer l'un avec l'autre. Nous avons développé dans le laboratoire un essai qui nous permet d'étudier l'adhésion des splénocytes, cellules blanches sanguines isolées à partir de la rate, sur l'endothélium. Cet essai peut être réalisé avec des splénocytes et un endothélium provenant d'un même animal ou individu (adhésion homologue) ou

provenant d'animaux ou individus différents (adhésion hétérologue). Dans ce deuxième cas, il est possible d'évaluer, par exemple, l'adhésion de splénocytes sains sur un endothélium pathologique, abîmé ou régénéré, et vice-versa. Cet essai peut ainsi nous renseigner sur l'état d'activation, défini par l'apparition de molécules d'adhésion, et l'intégrité globale et spécifique de chacun des participants. Nous avons utilisé cet essai dans le cadre de la troisième et quatrième étude. Dans la troisième étude, nous avons utilisé cet essai afin d'étudier les changements d'adhésion durant le vieillissement et de déterminer quel était l'impact d'un traitement antioxydant de différentes durées sur l'adhésion. De plus, nous avons réalisé des études d'adhésion hétérologue entre des splénocytes et des endothéliums provenant de souris de différents âges afin de déterminer le rôle de chacun des participants. Dans la quatrième étude, nous avons utilisé cet essai afin d'étudier les changements d'adhésion durant le vieillissement associé à l'athérosclérose et de déterminer quel était l'impact d'un traitement antioxydant de différentes durées sur l'adhésion.

3.7.1. Préparation des tissus

L'aorte de la souris est délicatement et rapidement isolée et immergée dans du PSS froid (4°C) placé dans une boîte de Pétri pour dissection. L'aorte est ensuite immobilisée par les extrémités avec des aiguilles pour entomologie et nettoyée de tous tissus graisseux et conjonctifs. L'aorte est par la suite coupée délicatement, afin de ne pas endommager l'endothélium, dans le sens de la longueur, et divisée en deux segments. Un des segments sert à évaluer l'adhésion en condition basale et l'autre en condition de stimulation par l'ajout d'histamine (0,1 μ M), permettant ainsi de mieux comparer les niveaux d'adhésion. Les segments sont déposés dans un incubateur (37°C; 95% air/5% CO₂) pendant la préparation puis le marquage au chromium⁵¹ (100 μ Ci) des splénocytes (Figure 14).

3.7.2. Extraction des splénocytes

Parallèlement à la préparation des tissus, la rate de la souris est isolée et broyée au travers d'un filet de nylon (pores de 200 μm ; New York Biodesign) à l'aide d'un piston à seringue (5 cc) dans 5 ml de milieu de culture RPMI-1640 (Invitrogen). L'homogénat est ensuite centrifugé (20 min, 37°C, 1200 rpm). Le surnageant est jeté et le culot, contenant les globules rouges ainsi que les globules blancs, est exposé à 4 ml d'eau (création d'un milieu hypotonique provoquant un entrée d'eau massive dans les cellules) pendant précisément 15 secondes afin de ne faire éclater sélectivement que les globules rouges. Il est important de ne pas faire trop durer le temps de lyse car les globules blancs (comprenant les splénocytes) éclateront. En effet, les globules rouges, contrairement aux cellules blanches, sont riches en hémoglobine, protéine cytoplasmique transporteur d'oxygène, et possèdent un grand cytoplasme dépourvu de noyau, ceux-ci sont plus sensibles à la lyse. L'osmolarité est ensuite rétablie en ajoutant 4 ml d'une solution de NaCl 1,8%. Les débris des cellules éclatées sont retirés en filtrant le produit de lyse au travers d'un filet de nylon. L'homogénat est ensuite centrifugé (20 min, 37°C, 1200 rpm), le surnageant jeté et le culot (contenant les splénocytes (>95%)) est resuspendu dans 2 ml de milieu de culture RPMI-1640 (Figure 14).

3.7.3. Marquage des splénocytes au chromium⁵¹

Les splénocytes sont exposés à 100 μCi de chromium⁵¹ pendant 1 heure, à 37°C. La solution est agitée doucement à chaque 15 minutes afin d'éviter que les splénocytes ne sédimentent. La solution est ensuite centrifugée (10 min, 1800 rpm) et le culot lavé 3 fois avec du milieu de culture RPMI-1640 afin de retirer la radioactivité non-liée. Le culot est resuspendu dans environ 1 ml de milieu de culture RPMI-1640 et un compte cellulaire est effectué. Le compte est ajusté à 1×10^6 cellules/ml avec du milieu de culture RPMI-1640 (Figure 14).

3.7.4. Adhésion des splénocytes à l'endothélium

Les splénocytes marqués sont déposés (20 μ l; 20 000 splénocytes) sur les segments d'aorte préalablement préparés et stimulés ou non avec l'histamine (0,1 μ M, 10 minutes). Les splénocytes et les segments d'aorte sont mis à l'incubateur à 37°C pendant 30 minutes. Les segments sont ensuite doucement lavés dans du PSS afin de retirer les splénocytes n'ayant pas adhéré à l'endothélium. Les segments sont enfin déposés dans des tubes allant dans un compteur gamma contenant une solution de fixation pour tissus. Afin de pouvoir déterminer le nombre de splénocytes ayant adhéré, une courbe standard est réalisée avec le stock initial de splénocytes marqués. Sachant que ce stock est ajusté à une concentration de 1×10^6 cellules/ml, des dilutions sont réalisées et la radioactivité est mesurée au compteur gamma (Figure 14).

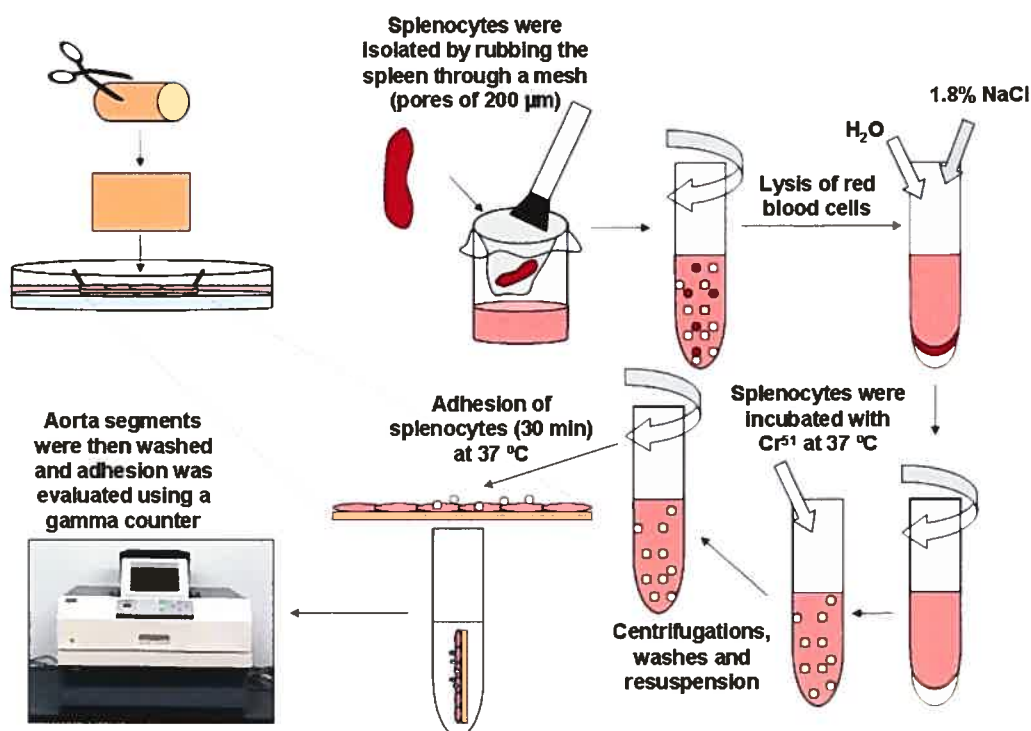


Figure 14. Protocole de marquage et d'adhésion des splénocytes sur l'endothélium

3.7.5. Acquisition, analyse et présentation des résultats

La courbe standard est tout d'abord analysée et le nombre de c.p.m. (compte par minute) est déterminé pour chacune des dilutions. Connaissant le nombre de splénocytes déposé dans chacun des tubes (calculé selon le volume), nous pouvons déduire le nombre de splénocytes par c.p.m.. La valeur de splénocytes par c.p.m. doit être la même quelle que soit la dilution. Une moyenne des ces valeurs est calculée et utilisée afin de déterminer le nombre de splénocytes ayant adhéré sur chacun des segments. En effet, le compteur gamma calcule le nombre de c.p.m dans l'échantillon inconnu et ce compte est multiplié par la valeur de splénocytes par c.p.m calculé avec la courbe standard, ce qui indique le nombre de splénocytes adhérents.

L'adhésion est ensuite calculée selon l'aire de surface du segment, qui est calculée à l'aide d'un binoculaire et d'une règle intégrée dans la lentille. Le nombre de splénocytes calculé est donc divisé par la surface calculée (splénocytes/ mm²).

3.8. Étude d'expression des molécules d'adhésion à la surface des splénocytes

Ces études ont été réalisées dans le cadre de la troisième et quatrième étude afin d'évaluer le niveau d'expression de différentes molécules d'adhésion (CD18, CD62L et CD162) à la surface des splénocytes. Dans la troisième étude nous voulions évaluer les changements d'expression de ces molécules durant le vieillissement et nous voulions savoir quel était l'impact d'un traitement antioxydant de différentes durées sur l'expression de celles-ci. Semblablement, dans la quatrième étude nous avons évalué les changements d'expression de ces molécules durant le vieillissement associé à l'athérosclérose, en absence et en présence d'un traitement antioxydant de différentes durées.

3.8.1. Préparation des splénocytes

Les splénocytes sont isolés et préparés comme expliqué dans la section précédente 3.7.2. intitulée « Extraction des splénocytes ». Avant de procéder au marquage radiocatif avec le chromium⁵¹ pour les études d'adhésion, une partie des splénocytes est ajusté à un compte de 5×10^6 cellules/ml avec du HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) contenant du calcium et du magnésium. De cette dilution, 33 μ l de splénocytes sont incubés dans le noir, à température pièce, avec des concentrations saturées d'anti-CD18 de souris conjugué à la phycoérythrine (PE), d'anti-CD62L de souris conjugué à la PE et d'anti-CD162 de souris conjugué à la PE ou, pour fin de contrôle, avec l'isotype respectif des immunoglobulines utilisées, pendant 30 minutes. Suite à l'incubation, les complexes splénocytes-anticorps sont lavés et fixés avec 1% de formaline.

3.8.2. Description de la méthode de cytométrie en flux et présentation des résultats

Les échantillons de splénocytes sont lus avec un cytomètre en flux (Altra, Beckman Coulter). Les splénocytes sont délimités selon leur taille (*forward characteristic*) et leur granularité (*side-scatter characteristic*). Le marquage des cellules est suivi par l'utilisation d'une immunofluorescence à couleur unique réalisée avec une concentration saturée d'anticorps monoclonaux conjugués à une molécule fluorescente. Le niveau de liaison de l'anticorps est représenté par le pourcentage de splénocytes positifs ou par l'intensité de fluorescence moyenne (MFI : *Mean Fluorescence Intensity*) au-delà d'un seuil déterminé par une population de splénocytes marqués avec l'isotype respectif de immunoglobuline utilisée (<2% de cellules positives). L'index de marquage (% de cellules positives x MFI) est ensuite calculé. Entre 3.000-5.000 splénocytes sont analysés pour chaque échantillon.

3.9. Étude d'expression génique par qPCR

Afin d'étudier les changements d'expression de l'ARN messager de plusieurs gènes (eNOS, COX-1/2, Sirtuin-1, p22^{phox}, MnSOD) des études de qPCR ont été réalisées. Ces études ont été effectuées dans le cadre du deuxième, troisième et quatrième article. Dans la deuxième étude, l'expression d'eNOS et des COX-1/2 a été étudiée, tandis que dans les deux dernières études tous les gènes énumérés plus haut ont été évalués.

3.9.1. Extraction de l'ARN total

L'ARN total est extrait à partir d'aorte abdominale de souris à l'aide d'un RNeasy mini kit (Qiagen) adapté pour tissus fibreux et élastiques (Figure 15). Une quantité maximale de 30 mg de tissu est utilisée. Une quantité supérieure aurait pour effet de diminuer l'efficacité de la colonne qui lie l'ARN et de réduire la capacité de lyse des tampons et de la protéinase K. En effet, l'extraction de l'ARN total à partir de tissus fibreux comme le muscle squelettique, le cœur et l'aorte peut être difficile dû à l'abondance de protéines contractiles, de tissus conjonctifs et de collagène. Il est donc nécessaire d'utiliser la protéinase K (endoprotéase: Qiagen) afin d'hydrolyser les protéines. Tout d'abord, les échantillons (30 mg) sont broyés dans le tampon RLT (thiocyanate de guanidine: fourni par le fournisseur) additionné de β -mercaptoéthanol, un puissant dénaturant chaotropique des protéines, puis les échantillons sont dilués afin d'être traités avec la protéinase K (activée à 55°C). Les échantillons sont ensuite centrifugés afin de faire sédimenter les débris, et le surnageant contenant les acides nucléiques est conservé. Ce dernier est mélangé vigoureusement avec de l'éthanol (100%) et est centrifugé à travers une colonne RNeasy, sur laquelle l'ARN peut se lier. Une série de lavages avec les tampons RW1 et RPE (à base d'alcool: fournis par le fournisseur) ainsi qu'une digestion de l'ADN avec la DNase I (Qiagen) sont ensuite effectuées. Finalement, l'ARN total est élué dans 30 μ l d'eau RNase-free (Figure 15).

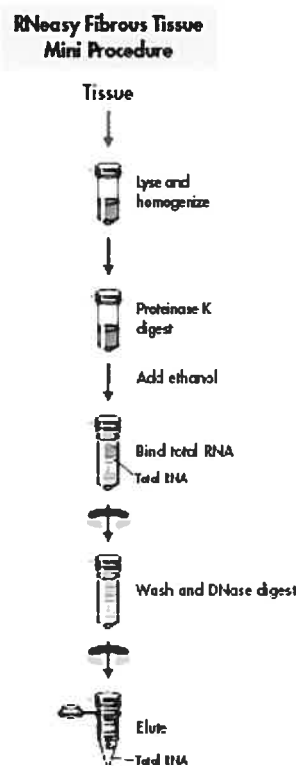


Figure 15. Protocol d'extraction d'ARN par le RNeasy mini kit pour tissus fibreux

3.9.2. Obtention de l'ADN complémentaire

L'ADN complémentaire (cDNA) est obtenu par transcription inverse à l'aide de la M-MLV (Invitrogen). La réaction finale de 20 μ l est effectuée avec 100 ng d'ARN total et produit 100 ng de cDNA (5 ng/ μ l). La réaction est réalisée soit à l'aide d'amorces spécifiques ou d'amorces aléatoires (*random primers*). Dans un tube propre et RNase-free les composants suivants sont ajoutés : oligo (dT) et les amorces aléatoires ou les amorces inverses spécifiques, l'ARN total, le mélange de dNTP et l'eau distillée et stérile (pour un total de 12 μ l). Le mélange est par la suite chauffé pendant 5 minutes à 65°C et refroidi rapidement sur la glace. Les composants suivants sont ensuite ajoutés : le tampon 5X first-

strand, le DTT, la M-MLV et l'eau distillée et stérile (pour un total de 20 µl). Le mélange est mélangé doucement à la pipette, centrifugé, chauffé à 25°C pour 10 minutes, incubé à 37 °C pour 50 minutes et la réaction est finalement inactivée à 70 °C pour 15 minutes.

3.9.3. Conceptualisation des amorces spécifiques

Les amorces pour les gènes d'intérêt ont été conceptualisées à l'aide du programme *Ensembl genome* (<http://www.ensembl.org>). Il est essentiel que les amorces pour chacun des gènes soient obtenues à partir de deux exons distincts chevauchant un intron. La spécificité des séquences de chacune des amorces a été vérifiée à l'aide du programme *Blast*, disponible à partir du National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Premièrement, les amorces sont testées à différentes concentrations (50 à 300 nM) et en présence de différentes quantités de cDNA (0.5 à 2 ng) afin d'évaluer la spécificité et la qualité des amorces. Les amorces utilisées sont les suivantes (Tableau 2) :

Tableau 2. Séquences des amorces utilisées

Genes	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Mouse Sirtuin-1	GAGCAGGTTGCAGGAA TCCA	CCTGATTA AAAAATGTCTCCA CGAA
mouse eNOS	CACGAGGCACTGGTGT TGGT	CTTGCGCCGCCAAGAGGAT A
mouse p22 ^{phox}	GGCTGCCCTCCACTTCC T	CTCCTTGGGTTTAGGCTCAA TG
mouse MnSOD	GGCCAAGGGAGATGTT ACAA	GCTTGATAGCCTCCAGCAA C
mouse COX-1	ACTCAGCGCATGACTA CATC	CTTCTCAGCAGCAGCTGTTG

mouse COX-2	GAACATGGACTCACTC AGTTTGTTG	CAAAGATAGCATCTGGACG AGGT
mouse cyclophilin A	CCGATGACGAGCCCTT GG	GCCGCCAGTGCCATTATG

La juste nature des produits de PCR obtenus avec chacune des amorces a été vérifiée par séquençage. Deux gènes de ménage ont été testés : Cyclophiline A et GAPDH. Quoique les résultats observés avec le GAPDH soient satisfaisants, ceux obtenus avec la Cyclophiline A sont supérieurs en termes d'absence de variabilité entre les différents groupes.

3.9.4. Obtention des courbes standards

Avant de débiter, une courbe standard pour chaque paire d'amorces a été obtenue. Une efficacité entre 90% et 110% ainsi qu'un r^2 égal à 1 (± 0.01) sont nécessaires (Figure 16). Les courbes standards sont obtenues à partir d'ARN et de cDNA provenant de cœur de souris, un tissu offrant une quantité abondante d'ARN et dans lequel l'expression des différents gènes d'intérêts est suffisamment présente.

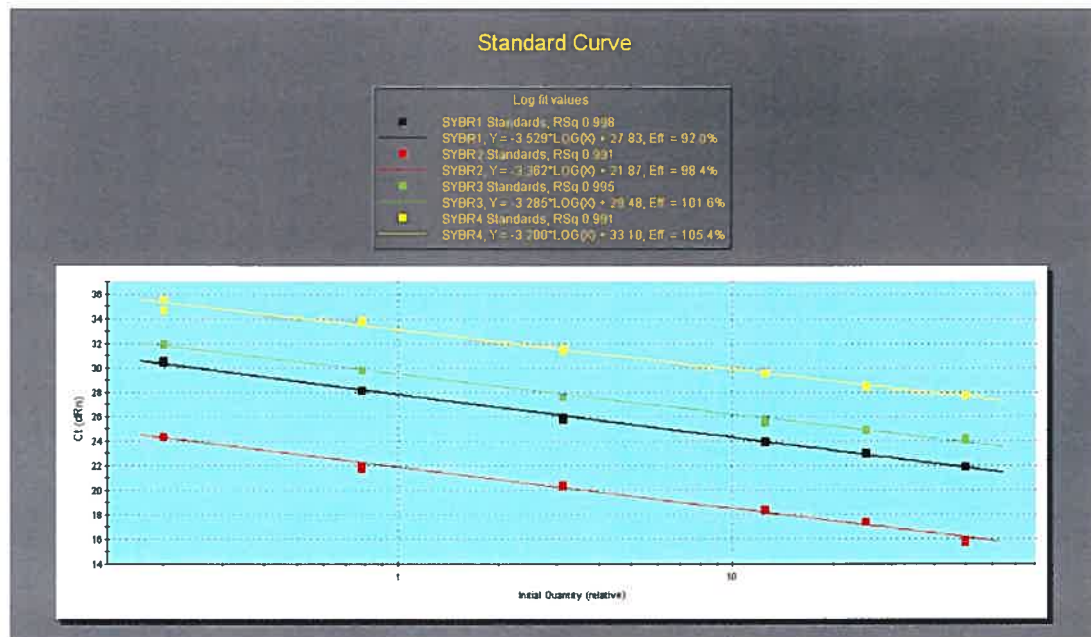


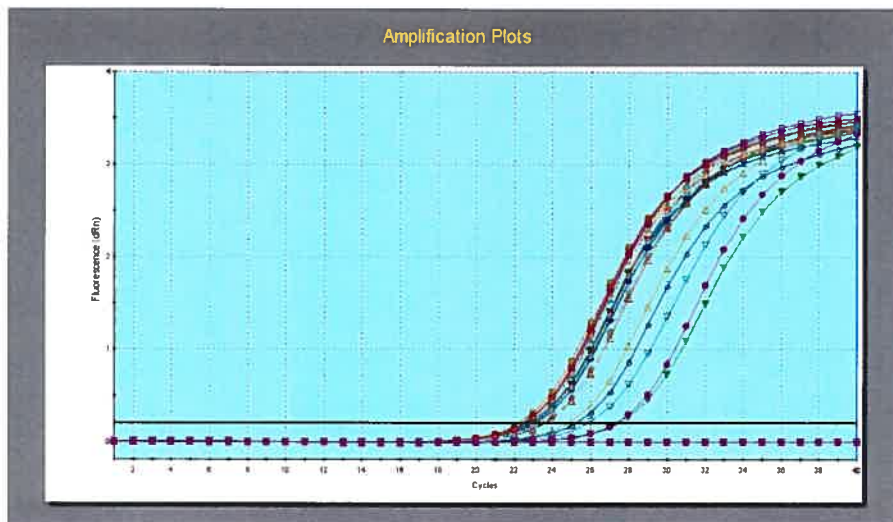
Figure 16. Exemple de courbes standards obtenues pour 4 gènes différents

3.9.5. Obtention des résultats à partir des échantillons

Les qPCR sont réalisés avec 1 ou 2 ng de cDNA. Les concentrations d'amorce utilisées varient selon le gène étudié: Sirtuine-1 (100 nM); eNOS (300 nM); p22^{phox} (300 nM); MnSOD (300 nM); COX-1 (300 nM); COX-2 (300 nM) et cyclophilin A (300 nM). Pour une réaction de qPCR les composants suivants sont introduits dans un même puits : le cDNA, le mélange d'amorces (*reverse et forward*), le ROX (30 nM final) et le SYBR Green PCR master mix (Stratagene). Les résultats sont analysés à l'aide de l'appareil MX300P[®] de Stratagene. Nous pouvons observer sur la Figure 17A les profils d'amplification de la MnSOD de différents échantillons et sur la Figure 17B les courbes de dissociation pour ces mêmes échantillons. Pour chaque gène, des puits « contrôle négatif »

(NTC ; *No Template Control*) sont réservés, dans lesquels de l'eau distillée et stérile est déposée au lieu du cDNA.

A. Profils d'amplification



B. Courbes de dissociation

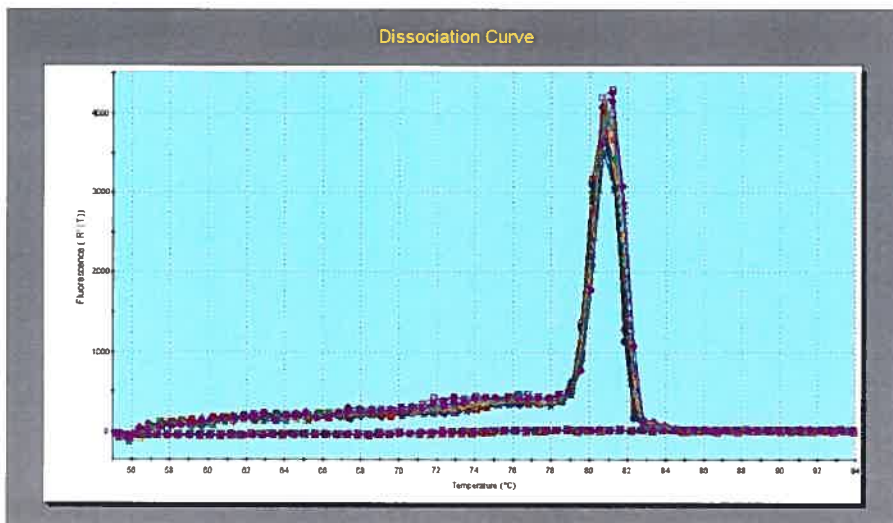


Figure 17. Exemple de résultats obtenus (MnSOD)

3.9.6. Acquisition et présentation des résultats

Les variations d'expression des différents gènes sont calculées à l'aide du logiciel MxPro fourni par Stratagene. Les résultats sont calculés en fluorescence relative. En effet, l'expression génique est calculée en mesurant la quantité relative du gène d'intérêt dans les échantillons en comparaison à un calibrateur (échantillon représentant l'état basal). Dans les études réalisées, le calibrateur est la valeur moyenne obtenue avec l'ARN des jeunes souris (3 mois) n'ayant pas été exposées au traitement. En utilisant cette approche, les différences des valeurs Ct (*Threshold cycle*) entre les échantillons et le calibrateur sont exprimées en augmentation ou diminution de changements relativement au calibrateur. En plus de comparer l'expression du gène d'intérêt dans différentes conditions (âge/pathologie vs calibrateur), il est important de normaliser les résultats avec un gène « normalisateur » (aussi appelé gène de référence ou de ménage, dans ce cas-ci la cyclophiline A). L'expression de ce gène normalisateur ne doit pas varier quelle que soit la condition (calibrateur, condition expérimentale). Cette normalisation a pour effet de contrôler les différences induites lors de l'extraction d'ARN ainsi que les divergences d'efficacité des réactions de transcription inverse.

Le programme MxPro calcule les différences de Ct du gène d'intérêt dans les échantillons expérimentaux et le calibrateur, puis corrige ceci en utilisant la différence de Ct du gène de ménage (cyclophiline A) dans les échantillons expérimentaux et le calibrateur. Ainsi, le rapport des quantités peut être estimé comme suit :

$$\frac{Unknown}{Control} = (1 + E_{target})^{-\Delta Ct_{target}(Control-Unknown)}$$

Où E correspond à l'efficacité de l'amplification du gène d'intérêt (une valeur entre 0 et 1 représentant le nombre de produits d'amplification générés lors de chaque cycle de la réaction par molécule de séquence d'intérêt). Ct représente le *Threshold cycle*, et *Control* représente le calibrateur. Il est important de noter que cette équation ne tient pas compte de

la normalisation par le gène de ménage. Si l'on tient compte de cet aspect l'équation devient :

$$\text{Normalized } \frac{\text{Unknown}}{\text{Control}} = \frac{(1 + E_{\text{target}})^{-\Delta Ct_{\text{target}}}}{(1 + E_{\text{norm}})^{-\Delta Ct_{\text{norm}}}}$$

Dans cette équation *norm* réfère au gène de ménage. Cette équation est souvent décrite comme la méthode du $\Delta\Delta Ct$ puisque l'équation peut être réduite à ceci :

$$\text{Normalized } \frac{\text{Unknown}}{\text{Control}} = \frac{2^{-\Delta Ct_{\text{target}}}}{2^{-\Delta Ct_{\text{norm}}}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

4. Articles

Étude #1

Apport original et contribution des co-auteurs:

La contribution du premier auteur, Marie-Eve Gendron, est majeure puisqu'elle a participé à toutes les expérimentations et à la rédaction du manuscrit. Dr Nathalie Trescases-Thorin a participé à la culture cellulaire et à la rédaction/révision du manuscrit. Monsieur Louis Villeneuve a participé à l'acquisition des images d'immunofluorescence par microscopie confocale et Dr Éric Thorin a supervisé l'étude et contribué à la rédaction/révision du manuscrit.

PERMISSION DE L'ÉDITEUR

1. Identification de la revue ou du livre

American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology, 9650 Rockville Pike,
Bethesda, MD, 20814- 3991, USA, 12 septembre 2007.

2. Identification de l'éditeur ou des éditeurs

R.C. Webb

3. Identification de l'article

Marie-Ève Gendron, Nathalie Thorin-Trescases, Louis Villeneuve, Eric Thorin. Aging
associated with mild dyslipidemia reveals that COX-2 preserves dilation despite endothelial
dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Jan;292(1):H451-8.

L'étudiant, Marie-Eve Gendron, est autorisé à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de
doctorat qui a pour titre « *Influence de l'âge sur la fonction vasculaire en condition pro-
athérosclérotique : Impact de l'environnement redox* ».

R. Clinton Webb

R. Webb

Oct 2, 2007

Éditeur

Signature

Date

Aging associated with mild dyslipidemia reveals that COX-2 preserves dilation despite endothelial dysfunction

Marie-Ève Gendron*, Nathalie Thorin-Trescases, Louis Villeneuve, Eric Thorin†§

*Department of physiology and †Department of Surgery, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal Heart Institute, 5000, Belanger street, Montreal, Quebec, Canada, HIT 1C8.

Running head: COX-2 and age-related endothelial dysfunction

§ To whom correspondence should be addressed:

Institut de Cardiologie de Montréal, centre de recherche, 5000 rue Bélanger, Montréal, Québec, HIT 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330; fax.: (514) 376-1355; Email: eric.thorin@umontreal.ca

Abstract: The endothelial function declines with age and dyslipidemia (DL) has been shown to hasten this process by favoring the generation of reactive oxygen species (ROS). Cyclooxygenase-2 (COX-2) can be induced by ROS, but its contribution to the regulation of the endothelial function is unknown. Since COX-2 inhibitors may be deleterious to the cardiovascular system, we hypothesized that DL leads to ROS-dependent endothelial damage and a protective up-regulation of COX-2. Dilations to acetylcholine (ACh) of renal arteries isolated from 3, 6 and 12 m/o wild type (WT) and DL mice expressing the human ApoB-100 were recorded with or without COX inhibitors and the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC). NO and EDHF were inhibited using L-NNA and a depolarizing solution, respectively. In WT mice, the dilation to ACh declined at 12 months but was insensitive to COX-2 inhibition alone or with NAC. DL led to an early endothelial dysfunction at 6 m/o, normalized however by NAC. At 12 m/o, vascular sensitivity to ACh was further reduced by DL. At this age, selective COX-2 inhibition reduced the dilation, while addition of NAC improved it. In 3 and 6 months old WT mice, L-NNA significantly reduced the dilation, while it limited the dilation only in 3 m/o DL mice. EDHF-dependent dilation remains identical in both groups. These data suggest that COX-2 activity confers endothelium-dependent vasodilatory function in aged DL mice in the face of a pro-oxidative environment. Up-regulation of this pathway compensates for the early loss of the contribution of NO in DL mice.

Key words: Oxidative stress, endothelial function, cyclooxygenase and N-acetyl-L-cysteine

Introduction

Risk factors for cardiovascular diseases are associated with an early endothelial dysfunction. Previous studies on diabetes, hypertension, atherosclerosis and hypercholesterolemia examined possible alterations in NO and PGI₂ responses (3, 8, 14, 19, 28, 34). It was reported that oxidative stress was a key element contributing to endothelial cell damage and enhancement of PGI₂ formation (17, 30). The recent clinical trials demonstrating that COX-2 inhibition was associated with cardiovascular events in an elderly population with combined risk factors for cardiovascular diseases (26, 32) strongly emphasizes the cardiovascular protective role of prostanoids, most likely PGI₂. COX-2 inhibition could have deleterious cardiovascular effects by reducing PGI₂ production (27) favoring TXA₂ function (1), increasing blood pressure (35), decreasing angiogenesis and destabilizing the plaque (12).

While some preclinical data incriminate COX-2 activity as deleterious and pro-atherogenic (5-7), others support the protective role of PGI₂ in atherogenic conditions (11, 12, 29). To increase the level of complexity, oxidative stress favors the expression of an inflammatory phenotype that leads to the induction of COX-2 (11, 22, 29). Thus far, the protective role of PGI₂ is opposed to the deleterious effects of TXA₂ by regulating platelet aggregation and thrombosis (27). The role of COX-2-derived PGI₂ as endothelium-derived relaxing factor still needs to be clarified. In animal models, large arteries such as the aorta and renal arteries are vessels of choice to study the contribution of prostanoids in the regulation of vascular tone. The contractile and dilatory responses of these vessels are sensitive to indomethacin and are affected by pathological conditions (34). We hypothesized that dyslipidemia is associated with oxidative stress that induces an endothelial damage characterized by a compensatory and protective up-regulation of COX-2. To validate this hypothesis, we investigated the evolution of the endothelial function of the renal artery isolated from wild type (WT) and dyslipidemic (DL) mice through age.

Materials and Methods

Three, 6 and 12 month-old (m/o) male C57bl/6 mice (WT, Charles River, St-Constant, Qc) were used as control and compared with 3, 6, and 12 m/o male DL mice expressing the human apolipoprotein B-100 gene (ApoB^{+/+}) (20). Cholesterol and triglycerides concentrations were increased in the plasma of DL compared to WT mice (Table 1). The procedures and protocols were performed in accordance with our institutional guidelines and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* of Canada.

Vascular reactivity studies

Experiments were conducted in isolated and pressurized (100 mm Hg) mouse renal arteries (external diameter \approx 400 μ m) as previously described (Living System, Burlington, Vermont) (16, 20). After 50 min equilibration period, the resting myogenic tone (a reduction in diameter induced by the rise in intraluminal pressure) was measured. Renal arteries were then pre-constricted by phenylephrine (PE; 30 μ mol/L, Sigma, St-Louis, MO) and concentration-response curves to ACh (0.001 μ mol/L - 30 μ mol/L, Sigma, St-Louis, Missouri) were constructed. The contribution of PGI₂ to ACh-induced dilation was determined using indomethacin (10 μ mol/L, Sigma, St-Louis, MO), a non selective inhibitor of cyclooxygenase, NS-398 (10 μ mol/L, Cayman chemical, Ann Arbor, MI), a selective COX-2 inhibitor or valeryl salicylate (1 mmol/L, Cayman chemical, Ann Arbor, MI), a selective COX-1 inhibitor. The contribution of NO to ACh-induced dilation was determined in the presence of L-NNA (10 μ mol/L, Sigma, St-Louis, MO), a NO synthase inhibitor. The contribution of EDHF to ACh-induced dilation was determined in the presence of a depolarizing solution containing 40 mM KCl. The effects of endogenous free radicals were inhibited by acute pretreatment of the vessel with N-acetyl-L-cystein (NAC; 1 μ mol/L, Sigma, St-Louis, MO) for 30 minutes prior the dose-response curve. Only one

concentration-response curve was performed on each vessel. The endothelium-independent dilation was assessed using sodium nitroprusside (SNP: 0.001 $\mu\text{mol/L}$ - 300 $\mu\text{mol/L}$, Sigma, St-Louis, Missouri).

Aortic endothelial cell culture and Western blot analysis

Endothelial cells were cultured from the mouse aorta (MAEC) by explant using a method slightly modified from a previous work (33). No difference in growth rate was detected. The endothelial origin of the cells ($>95\%$) was confirmed by double immunostaining for von Willebrand factor and platelet-endothelial cell adhesion molecule (CD31) (data not shown). MAEC were used after the first passage only. For Western blot analysis, proteins (35 μg per lane) were separated and transferred to nitrocellulose. Blots were incubated with the primary antibodies (rabbit polyclonal anti-COX-2, 1:1000, Cayman Chemical, Arbor, MI; rabbit polyclonal anti-COX-1, 1:250, Cayman Chemical, Arbor, MI; rabbit polyclonal anti-eNOS, 1:200, BD Transduction Laboratories, San Jose, CA). Equal protein loading was verified using β -actin (rabbit polyclonal anti- β -actin, 1:1,000, Abcam, Cambridge, MA).

Immunofluorescence studies

Sections (14 μm) of the aorta were incubated with anti-COX-1 (dilution 1:100; Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA), anti-COX-2 (dilution 1:300; Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA), or anti-HNE (dilution 1:400; Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA) diluted in PBS containing 1% normal donkey serum and 0.1% (v/v) triton X-100. The slides were washed and incubated with a 1:500 (v/v) dilution of the appropriate secondary antibody (Alexa 647-conjugated donkey anti-rabbit antibody, Invitrogen). For each secondary antibody, negative control experiments were performed in

the absence of primary antibody. Fluorescence was visualized using a scanning confocal microscope (LSM 510 Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Statistical Analysis

In every case, n refers to the number of animals used in each protocol. Continuous variables are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Half-maximum effective concentration (EC_{50}) of ACh was measured from individual concentration-response curves only when a maximal response was obtained. The pD_2 value, the negative log of the EC_{50} , was obtained. At the end of the protocol, the maximal diameter (D_{max}) was determined by changing the PSS to a Ca^{2+} -free PSS containing sodium nitroprusside (10 μ mol/L, Sigma, St-Louis, MO) and EGTA (ethylene glycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N'.N'-tetraacetic acid, 1 mmol/L, Sigma, St-Louis, MO). For each protocol, basal diameter in no-flow condition was determined at the end of the 50 minutes equilibration period. Myogenic tone was measured at 100 mm Hg and expressed as percentage of the passive diameter (D_{max}). Myogenic tone was calculated according to the following formula: ((passive diameter - diameter at equilibrium) / passive diameter) * 100. ACh-induced dilation is expressed as a percentage of the maximal diameter. ANOVA studies followed by a Scheffé's F test were performed to compare E_{max} and pD_2 of dose-response curves. Unpaired t-tests were performed for Western blot analysis. Differences were considered to be statistically significant for a P value <0.05 .

Results

Baseline parameters

After 50 min of equilibration at an intraluminal pressure of 100 mm Hg, internal diameters of isolated WT (n=32) and DL (n=32) renal arteries were 335 ± 25 and 354 ± 23 μm , 365 ± 17 and 412 ± 28 μm , and 321 ± 28 and 411 ± 30 μm at 3, 6 and 12 months of age, respectively ($P>0.05$). Significant ($P<0.05$) myogenic tone had developed without differences between groups (Table 2). Similarly, the contractions induced by PE or KCl were similar in all groups (Table 2). The pD_2 (6.2 ± 0.4 and 6.1 ± 0.3) as well as the maximal dilations (37 ± 7 and $35\pm 3\%$ of D_{max}) to sodium nitroprusside (SNP), a NO donor, were similar in vessels isolated from 3 month-old WT and 12 month-old DL mice, respectively.

Evolution of the endothelium-dependent dilation to ACh in renal arteries of WT mice through aging

In PE pre-contracted WT arteries, ACh induced a maximal endothelium-dependent dilation (E_{max}) of the renal artery isolated from 3 m/o WT mice, which was similar at 6 m/o (Fig. 1A and Tables 3A and 4A). The age-dependent decrease ($P<0.05$) in endothelial function was only apparent at 12 months and was accompanied by a reduced ($P<0.05$) vascular sensitivity (pD_2) to ACh when compared to 3 and 6 m/o WT mice (Tables 3A and 4A).

The lack of contribution of cyclooxygenase-derived dilatory products during ACh-induced renal artery dilation is highlighted by the use of indomethacin. In vessels isolated from WT mice, indomethacin did not reduce the dilation at all ages (Tables 3A and 4A).

To assess the potential deleterious impact of reactive oxygen species (ROS) during ACh-induced dilation, arteries were exposed to NAC in the presence of indomethacin. As revealed in Table 4A, NAC did not modify the dilatory response to ACh.

To assess the contribution of NO and the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) to the dilation of WT renal arteries, we used L-NNA and a 40 mM KCl depolarizing solution, respectively. At 3 and further at 6 m/o. L-NNA reduced ($P<0.05$) the sensitivity and the maximal dilation to ACh (Fig. 3). The use of a depolarizing solution also decreased ($P<0.05$) the sensitivity and the dilation to ACh in vessels isolated from 3 and 6 m/o mice. At 12 m/o, only the depolarizing solution reduced ($P<0.05$) the maximal dilation induced by ACh (Tables 3A and 4A, Fig. 3).

Evolution of the endothelium-dependent dilation to ACh in renal arteries of DL mice: importance of ROS and cyclooxygenase-2 activity

ACh induced a maximal endothelium-dependent dilation of the renal artery isolated from 3 m/o DL mice (Fig. 1B and Table 4B), which was identical to the response obtained in vessels isolated from 3 m/o WT mice (Table 4A). In contrast to WT however, the maximal dilation induced by ACh was prematurely reduced ($P<0.05$) in vessels isolated from 6 m/o DL mice (Fig. 1B and Table 4B). At 12 m/o, the maximal dilation was not further reduced – and similar in amplitude to that measured in WT mice – while a marked decrease ($P<0.05$) in vascular sensitivity to ACh (Table 3B) was observed.

The premature endothelial dysfunction observed in the renal artery of 6 m/o mice was insensitive to indomethacin but reversed to normal – a dilation similar in amplitude to that measured at 3 m/o – by acute exposure of the vessels to NAC (Table 4B).

At the age of 12 months, vascular sensitivity to ACh was reduced ($P<0.05$) demonstrating that the endothelial dysfunction further worsen with age in DL mice (Table 3B). At this age however, indomethacin strongly limited ($P<0.05$) the efficacy and potency of ACh (Tables 3B and 4B), contrasting with the lack of effect of this inhibitor in WT mice. To determine the COX isoform involved in this response, selective COX-1 and COX-2 inhibitors were

used. The deleterious effect of indomethacin on ACh-induced dilation of renal arteries isolated from 12 m/o DL mice was closely mimicked by the COX-2 inhibitor NS-398, while the COX-1 inhibitor valeryl salicylate had no effect (Fig. 2). In the presence of NS-398, the pD_2 was 5.0 ± 0.2 ($n=6$; $P < 0.05$ compared to the control condition without inhibitor, pD_2 5.7 ± 0.2 ; $n=6$) and similar to the pD_2 value obtained in the presence of indomethacin (pD_2 5.2 ± 0.1 ; $n=6$), while valeryl salicylate had no effect (pD_2 5.7 ± 0.2 ; $n=6$).

The protecting effect of NAC observed at 6 m/o in DL mice was conserved at 12 m/o in the presence of indomethacin (Tables 3B and 4B) and NS-398 (pD_2 5.6 ± 0.2 , maximal response of $64 \pm 8\%$; $n=6$).

Finally, we assessed the contribution of NO and EDHF to the dilation induced by ACh of arteries isolated from DL mice. At 3 m/o, L-NNA and the depolarizing solution reduced ($P < 0.05$) the dilation. At 6 and 12 m/o, only the depolarizing solution decreased ($P < 0.05$) the dilation (Tables 3B and 4B, Fig. 3).

Immunofluorescence and protein expression in cultured endothelial cells

Immunofluorescence and quantification of protein expression by Western blot in cultured endothelial cells demonstrate that COX-1 (Fig. 4A) and eNOS (Fig. 5) expression did not change between the age of 3 and 12 months in endothelial cells isolated from WT mice, while the expression of COX-2 increased ($P < 0.05$) significantly at 12 months (Fig. 4B).

In endothelial cells isolated from DL mice, the expression of COX-1 decreased ($P < 0.05$) only at 12 months (Fig. 4A). The expression of COX-2 was very low at 3 and 6 months but significantly ($P < 0.05$) increased at 12 m/o (Fig. 4B), while the level of expression of eNOS declined ($P < 0.05$) at 12 m/o compared to the expression quantified at 6 months (Fig. 5).

We observed a steady immunofluorescence for HNE, an indicator of lipid peroxydation, in aortic sections of WT mice while in DL mice it increased with age and was maximal at 12 months (Fig. 6).

Discussion

In the present study, we show that the endothelial dysfunction associated with aging is accelerated when associated with dyslipidemia. We report that COX-2 activity is mandatory to maintain some dilatory function in the pro-oxidative environment associated with dyslipidemia. The up-regulation of this pathway compensates for the early loss of the contribution of NO in DL mice.

The data obtained in isolated renal arteries from WT and DL mice confirm that aging is associated with a reduction of the endothelium-dependent dilation. Our results are therefore in line with the literature (for review see ref. (4)). In the C57Bl/6 background (WT) however, neither the antioxidant NAC nor COX inhibition by indomethacin had an impact on the dilatory response induced by ACh at all ages. The absence of effect of indomethacin suggests that during normal aging, dilatory prostanoids do not contribute to the dilation or that their inhibition is compensated by NO and/or EDHF. Our data reveal that the contribution of NO to the dilation induced by ACh increases from the age of 3 to 6 months, but is absent at 12 months, another demonstration of the deleterious effects of aging. In contrast, the contribution of EDHF appears to be constant during normal aging. On the other hand, the absence of effect of the antioxidant NAC on the dilatory response induced by ACh at all ages in WT mice suggests that the rise in oxidative stress is not sufficient to acutely limit the dilatory effects of NO and EDHF.

It is known that risk factors for cardiovascular diseases hasten endothelial dysfunction (2, 10, 13, 18). As we previously reported, dyslipidemia has no deleterious effects on the endothelial function at 3 m/o (20, 21). As in WT mice, neither indomethacin nor NAC influenced ACh-induced dilation of the renal artery. At 6 months of age however, arteries from DL mice showed impaired responses to ACh, 6 months earlier than in arteries isolated from WT mice. While the inhibition of COX-1/2 had no effect, NAC normalized the dilation, suggesting that oxidative stress plays a role in the limitation of the dilation to

ACh of arteries isolated from 6 m/o DL mice. This is confirmed by the sustained increase in the expression of HNE in aortic sections of DL mice (Fig. 6), a marker of the accumulation of oxidative damage (15). This is in agreement with our recent observations that ROS production is increased in arteries isolated from aging DL mice in response to angiotensin II compared to aged WT mice (20). The deleterious effects of ROS on the dilation induced by ACh may originate from the inactivation of NO (9) or EDHF (20, 23-25). The data obtained in the presence of L-NNA reveal that NO plays a significant dilatory role at 3 months but that its contribution is abrogated at 6 and 12 months. The contribution of EDHF however, appears to be conserved.

At the age of 12 months, arteries isolated from DL mice became highly sensitive to indomethacin: inhibition of COX-1/2 reduced by more than 50% the dilation induced by ACh. Most importantly, the effects of indomethacin were reproduced by the selective COX-2 inhibitor NS-398, but not by the selective COX-1 inhibitor (valeryl salicylate). This strongly suggests that COX-2-derived prostanoids are important dilators in the renal artery isolated from aging DL mice. The cumulative negative impact of ROS is however still present since NAC improved dilation in the presence of indomethacin or NS-398, demonstrating that the origin of the oxidative stress induced by dyslipidemia is independent of COX activity.

This contrast with the lack of effect of indomethacin as well as NAC in arteries isolated from 12 m/o WT mice. It is therefore tempting to speculate that dyslipidemia leads to an early excess of free radicals by inactivating the buffering anti-oxidative capacity of the cells and/or increasing their production: this may in turn induce the expression of COX-2 that would act as a protective mechanism. To confirm this hypothesis one would have to treat mice with a potent antioxidant from the age of 3 months onward. Our data collected in cultured endothelial cells and aortic sections however, reveals that the expression of COX-2 increases earlier in WT than in DL mice. Hence, oxidative stress (at least that associated with dyslipidemia) may not be directly responsible for the increased expression of COX-2.

It is more likely that by inactivating NO, ROS reveal the dilatory action of COX-2-derived prostanoids, possibly prostacyclin, although this was not determined in this study. In addition to potentially inactivate NO, we observed that the expression of eNOS decreases with age, a trend that is significant in DL mice. In healthy vessels isolated from WT mice, the lack of overt oxidative stress likely protects the “classical” dilatory pathways, *i.e.* NO and EDHF, although this latter appears rather insensitive to dyslipidemia.

While we observed a rise in COX-2 expression, we were unable to detect iNOS in our cultured endothelial cells as well as in intact arteries by immunohistochemistry (data not shown). An uncontrolled excessive NO production could lead to the formation of damaging peroxynitrites (9) which have been shown to favor nitration and inactivation of the prostacyclin synthase (31). The contrary has however, also been reported, that is an increased PGI₂ production in conditions of excess NO and ROS production in human sepsis and after LPS treatment of bovine aortic muscle cells (17, 30). Hence, the origin of the excess in free radicals sensitive to NAC, needs to be resolved.

In conclusion, our data highlight the importance of investigating the impact of dyslipidemia through age. To investigate such dynamic processes, one has to consider age and risk factors in the algorithm of the experimental design in order to be able to determine the biological changes that take place. Our data reinforce the current concept that uncontrolled oxidative stress takes place with risk factors and suggest that COX-2-derived prostanoids become essential endothelial-protecting autacoids in DL mice.

Acknowledgements

This work has been supported in part by the Foundation of the Montreal Heart Institute, the Heart and Stroke Foundation of Quebec, and the Canadian Institute for Health Research (MOP 14496). E. Thorin is a senior scholar of the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec*. ME Gendron is supported by a scholarship from the Canadian Institute for Health Research.

1. **Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, and Fitzgerald DJ.** Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 102: 840-845. 2000.
2. **Bracht C, Yan XW, Brunner-LaRocca HP, Sutsch G, Amann FW, and Kiowski W.** Isradipine improves endothelium-dependent vasodilation in normotensive coronary artery disease patients with hypercholesterolemia. *J Hypertens* 19: 899-905. 2001.
3. **Brandes RP, Behra A, Lebherz C, Boger RH, Bode-Boger SM, Phivthong-Ngam L, and Mugge A.** N(G)-nitro-L-arginine- and indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the rabbit renal artery: effect of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 135: 49-55. 1997.
4. **Brandes RP, Fleming I, and Busse R.** Endothelial aging. *Cardiovasc Res* 66: 286-294. 2005.
5. **Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, Marnett LJ, Morrow JD, Fazio S, and Linton MF.** Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 105: 1816-1823. 2002.
6. **Burleigh ME, Babaev VR, Patel MB, Crews BC, Rimmel RP, Morrow JD, Oates JA, Marnett LJ, Fazio S, and Linton MF.** Inhibition of cyclooxygenase with indomethacin phenethylamide reduces atherosclerosis in apoE-null mice. *Biochem Pharmacol* 70: 334-342. 2005.
7. **Burleigh ME, Babaev VR, Yancey PG, Major AS, McCaleb JL, Oates JA, Morrow JD, Fazio S, and Linton MF.** Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient and C57BL/6 mice. *J Mol Cell Cardiol* 39: 443-452. 2005.

8. **Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, and Dzau VJ.** Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 86: 228-234. 1990.
9. **de Nigris F, Tajana G, Condorelli M, D'Armiento FP, Sica G, Lerman LO, and Napoli C.** Glycooxidation of low-density lipoprotein increases TUNEL positivity and CPP32 activation in human coronary cells. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 710-715, 2003.
10. **Drexler H, and Hornig B.** Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol* 31: 51-60. 1999.
11. **Egan KM, Lawson JA, Fries S, Koller B, Rader DJ, Smyth EM, and Fitzgerald GA.** COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. *Science* 306: 1954-1957. 2004.
12. **Egan KM, Wang M, Fries S, Lucitt MB, Zukas AM, Pure E, Lawson JA, and FitzGerald GA.** Cyclooxygenases, thromboxane, and atherosclerosis: plaque destabilization by cyclooxygenase-2 inhibition combined with thromboxane receptor antagonism. *Circulation* 111: 334-342. 2005.
13. **Esper RJ.** The role of lipid-lowering therapy in multiple risk factor management. *Drugs* 56 Suppl 1: 1-7: discussion 33. 1998.
14. **Flavahan NA.** Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation* 85: 1927-1938. 1992.
15. **Furfaro AL, Menini S, Patriarca S, Pesce C, Odetti P, Cottalasso D, Marinari UM, Pronzato MA, and Traverso N.** HNE-dependent molecular damage in diabetic nephropathy and its possible prevention by N-acetyl-cysteine and oxerutin. *Biofactors* 24: 291-298. 2005.

16. **Gendron ME, Thorin E, and Perrault LP.** Loss of endothelial KATP channel-dependent, NO-mediated dilation of endocardial resistance coronary arteries in pigs with left ventricular hypertrophy. *Br J Pharmacol* 143: 285-291, 2004.
17. **Halushka PV, Reines HD, Barrow SE, Blair IA, Dollery CT, Rambo W, Cook JA, and Wise WC.** Elevated plasma 6-keto-prostaglandin F1 alpha in patients in septic shock. *Crit Care Med* 13: 451-453, 1985.
18. **Isles CG, and Paterson JR.** Identifying patients at risk for coronary heart disease: implications from trials of lipid-lowering drug therapy. *Qjm* 93: 567-574, 2000.
19. **Kolodgie FD, Virmani R, Rice HE, and Mergner WJ.** Vascular reactivity during the progression of atherosclerotic plaque. A study in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circ Res* 66: 1112-1126, 1990.
20. **Krummen S, Drouin A, Gendron ME, Falck JR, and Thorin E.** ROS-sensitive cytochrome P450 activity maintains endothelial dilatation in ageing but is transitory in dyslipidaemic mice. *Br J Pharmacol* 147: 897-904, 2006.
21. **Krummen S, Falck JR, and Thorin E.** Two distinct pathways account for EDHF-dependent dilatation in the gracilis artery of dyslipidaemic hApoB^{+/+} mice. *Br J Pharmacol* 145: 264-270, 2005.
22. **Kuhlencordt PJ, Chen J, Han F, Astern J, and Huang PL.** Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 103: 3099-3104, 2001.
23. **Liu Y, Bubolz AB, Shi Y, Newman PJ, Newman DK, and Gutterman DD.** Peroxynitrite reduces the endothelium derived hyperpolarizing factor component of coronary flow-mediated dilation in PECAM-1-knock out mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005.

24. **Liu Y, and Gutterman DD.** The coronary circulation in diabetes: influence of reactive oxygen species on K⁺ channel-mediated vasodilation. *Vascul Pharmacol* 38: 43-49. 2002.
25. **Liu Y, Terata K, Chai Q, Li H, Kleinman LH, and Gutterman DD.** Peroxynitrite inhibits Ca²⁺-activated K⁺ channel activity in smooth muscle of human coronary arterioles. *Circ Res* 91: 1070-1076. 2002.
26. **Mamdani M, Juurlink DN, Lee DS, Rochon PA, Kopp A, Naglie G, Austin PC, Laupacis A, and Stukel TA.** Cyclo-oxygenase-2 inhibitors versus non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs and congestive heart failure outcomes in elderly patients: a population-based cohort study. *Lancet* 363: 1751-1756. 2004.
27. **McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, and FitzGerald GA.** Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 272-277. 1999.
28. **Najibi S, Cowan CL, Palacino JJ, and Cohen RA.** Enhanced role of potassium channels in relaxations to acetylcholine in hypercholesterolemic rabbit carotid artery. *Am J Physiol* 266: H2061-2067. 1994.
29. **Pratico D, Tillmann C, Zhang ZB, Li H, and FitzGerald GA.** Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3358-3363, 2001.
30. **Schildknecht S, Bachschmid M, Baumann A, and Ullrich V.** COX-2 inhibitors selectively block prostacyclin synthesis in endotoxin-exposed vascular smooth muscle cells. *Faseb J* 18: 757-759. 2004.

31. **Schmidt P, Youhnovski N, Daiber A, Balan A, Arsic M, Bachschmid M, Przybylski M, and Ullrich V.** Specific nitration at tyrosine 430 revealed by high resolution mass spectrometry as basis for redox regulation of bovine prostacyclin synthase. *J Biol Chem* 278: 12813-12819, 2003.
32. **Solomon DH, Schneeweiss S, Glynn RJ, Kiyota Y, Levin R, Mogun H, and Avorn J.** Relationship between selective cyclooxygenase-2 inhibitors and acute myocardial infarction in older adults. *Circulation* 109: 2068-2073, 2004.
33. **Thorin E, Shatos MA, Shreeve SM, Walters CL, and Bevan JA.** Human vascular endothelium heterogeneity. A comparative study of cerebral and peripheral cultured vascular endothelial cells. *Stroke* 28: 375-381, 1997.
34. **Vanhoutte PM, and Scott-Burden T.** The endothelium in health and disease. *Tex Heart Inst J* 21: 62-67, 1994.
35. **Whelton A, White WB, Bello AE, Puma JA, and Fort JG.** Effects of celecoxib and rofecoxib on blood pressure and edema in patients \geq 65 years of age with systemic hypertension and osteoarthritis. *Am J Cardiol* 90: 959-963, 2002.

Figure legends

Figure 1. Acetylcholine-induced dilation of renal arteries isolated from 3, 6 and 12 m/o (A) WT and (B) DL hApoB^{+/+} mice. n = 6-8. *: P<0.05 compared to 3 m/o.

Figure 2. Effect of non-selective (indomethacin, 10 μ M), selective COX-1 (valeryl salicylate, 1 mM) and selective COX-2 (NS-398, 10 μ M) inhibitors on ACh-induced dilation of renal arteries isolated from 12 m/o DL hApoB^{+/+} mice. n = 6-8. *: Emax, P<0.05 compared to 12 m/o DL; †: pD₂, P<0.05 compared to 12 m/o DL.

Figure 3. Effect of L-NNA (10 μ M) and of a physiological depolarizing solution containing 40 mM KCl on ACh-induced dilation of renal arteries isolated from 3, 6 and 12 m/o WT and DL hApoB^{+/+} mice. n = 6-8. *: Emax, P<0.05 compared to the respective control conditions; †: pD₂, P<0.05 compared to the respective control conditions.

Figure 4. Immunofluorescence from aortic sections and Western blot for COX-1 (A) and COX-2 (B) from cultured MAEC of 3, 6 and 12 months old WT and DL hApoB^{+/+} mice. β -actin was used to normalize for loading variations. n = 3. *: P<0.05 compared to 3 m/o mice; †: P<0.05 compared to 6 m/o mice.

Figure 5. Western blot for eNOS from cultured MAEC of 3, 6 and 12 months old WT and DL hApoB^{+/+} mice. β -actin was used to normalize for loading variations. n = 3 blots. *: P<0.05 compared to 3 m/o mice.

Figure 6. Immunostaining for HNE from aortic sections of 3, 6 and 12 months old WT and DL hApoB^{+/+} mice. n = 3.

Table legends

Table 1. Body weight, total cholesterol and level of triglycerides in 3, 6 and 12 m/o WT and DL hApoB^{+/+} mice. Results are expressed as means±SEM. n = 10 per group. * : P<0.05 compared to 3 m/o ; †: P<0.05 compared to 3 and 6 m/o; ‡: P<0.05 compared to aged match WT.

Table 2. Level of myogenic tone (% of the maximal dilation induced by a calcium-free physiological saline solution), phenylephrine (PE)-induced pre-constriction and 40 mM-PSS-induced pre-constriction measured in renal arteries isolated from 3, 6 and 12 m/o WT and DL hApoB^{+/+} mice. Results are expressed as means±SEM. n = 6-8 per group.

Table 3. pD_2 values of ACh-induced dilation of pressurized renal arteries of 3, 6 and 12 month old wild type (WT) (A) and DL hApoB^{+/+} (B) mice pre-constricted with phenylephrine (30 μ M). Results are expressed as means±SEM. n = 6-8 per group. *: P<0.05 compared to WT mice: a: P<0.05 compared to 3 m/o; b: P<0.05 compared to 3 and 6 m/o; c: P<0.05 compared to 6 m/o; d: P<0.05 compared to control.

Table 4. Maximal dilation (E_{max}) values of ACh-induced dilation of pressurized renal arteries of 3, 6 and 12 month old wild type (WT) (A) and DL hApoB^{+/+} (B) mice pre-constricted with phenylephrine (30 μ M). Results are expressed as means±SEM. n = 6-8 per group. *: P<0.05 compared to WT mice; a: P<0.05 compared to 3 m/o; b: P<0.05 compared to 3 and 6 m/o; c: P<0.05 compared to 6 m/o; d: P<0.05 compared to control; e: P<0.05 compared to with Indo.

Table 1.

	Wild Type (WT)			hApoB ^{+/+} (DL)		
	weight (g)	Total cholesterol (mg/dl)	Triglycerides (mg/dl)	weight (g)	Total cholesterol (mg/dl)	Triglycerides (mg/dl)
3 m/o	27±1	107±8	147±24	32±1	159±14‡	204±38
6 m/o	38±1*	103±6	92±7	42±1*	168±12‡	305±47*‡
12 m/o	46±2**†	148±15†	64±7	51±2*†	227±18†‡	288±76*‡

Table 2.

	Wild Type (WT)			hApoB ^{-/-} (DL)		
	myogenic tone (%)	PE precontraction (%)	KCl precontraction (%)	myogenic tone (%)	PE precontraction (%)	KCl precontraction (%)
3 m/o	17±5	66±6	66±3	21±6	76±2	62±9
6 m/o	33±4	66±5	47±5	13±5	70±2	68±1
12 m/o	36±9	52±5	64±4	21±6	69±2	66±3

Table 3.**A.**

WT	Control	Indo	Indo + NAC	L-NNA	KCl
3 m/o	6.7±0.1	6.5±0.2	6.0±0.2d	5.8±0.2d	6.1±0.3d
6 m/o	7.0±0.2	6.6±0.2	6.4±0.1	5.9±0.2d	6.2±0.3d
12 m/o	6.1±0.2b	6.0±0.2	5.9±0.2c	5.9±0.2	5.5±0.2

B.

DL	Control	Indo	Indo + NAC	L-NNA	KCl
3 m/o	6.4±0.2	6.2±0.2	5.7±0.2	5.3±0.1d	6.3±0.2
6 m/o	6.2±0.1*	6.4±0.4	6.5±0.2	6.0±0.3	5.6±0.3
12 m/o	5.7±0.2b	5.2±0.1*a	5.8±0.3	5.0±0.3	6.1±0.5

Table 4.**A.**

WT	Control	Indo	Indo + NAC	L-NNA	KCl
3 m/o	90±5	88±3	86±4	68±4d	35±6d
6 m/o	81±6	95±8	87±3	38±11a,d	44±4d
12 m/o	64±10a	61±10b	64±9b	59±11	16±4c,d

B.

DL	Control	Indo	Indo + NAC	L-NNA	KCl
3 m/o	93±4	85±6	79±10	57±12d	34±9d
6 m/o	61±10*a	66±7*	95±1d,e	77±6*	36±8d
12 m/o	64±12a	29±13*a,d	65±13e	41±13c	17±9c,d

Figure 1.

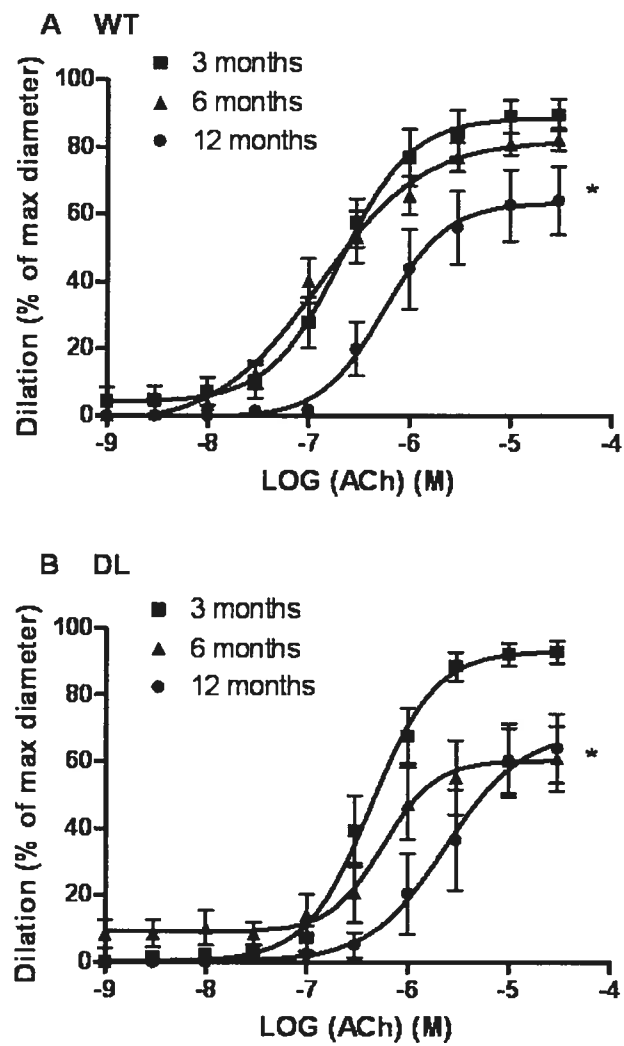


Figure 2.

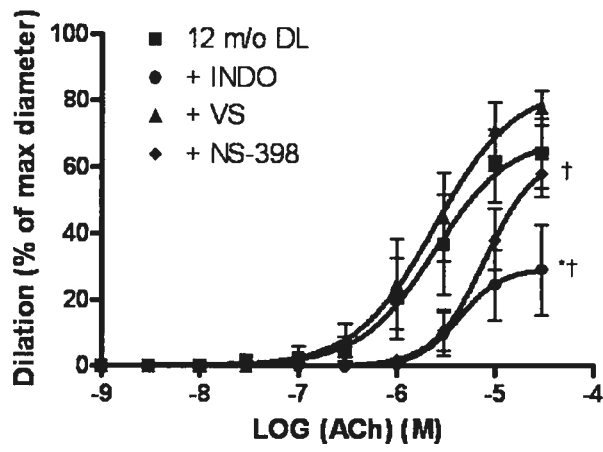


Figure 3.

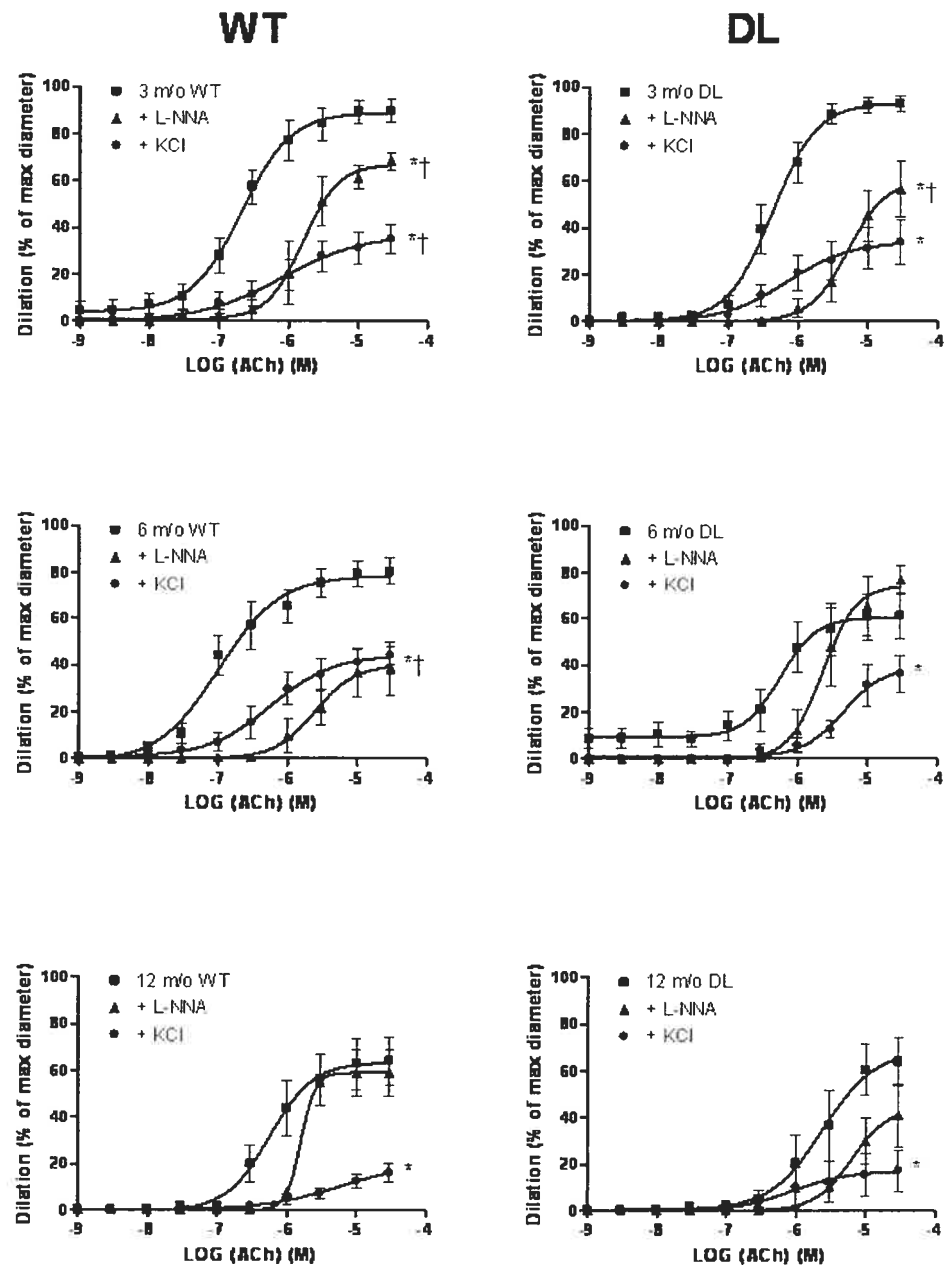


Figure 4.

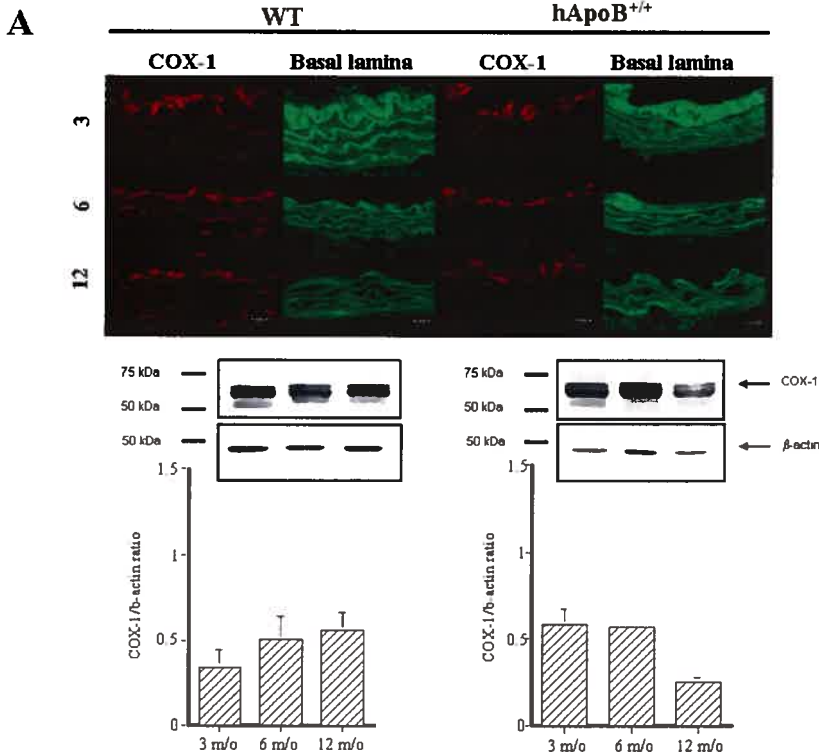


Figure 4.

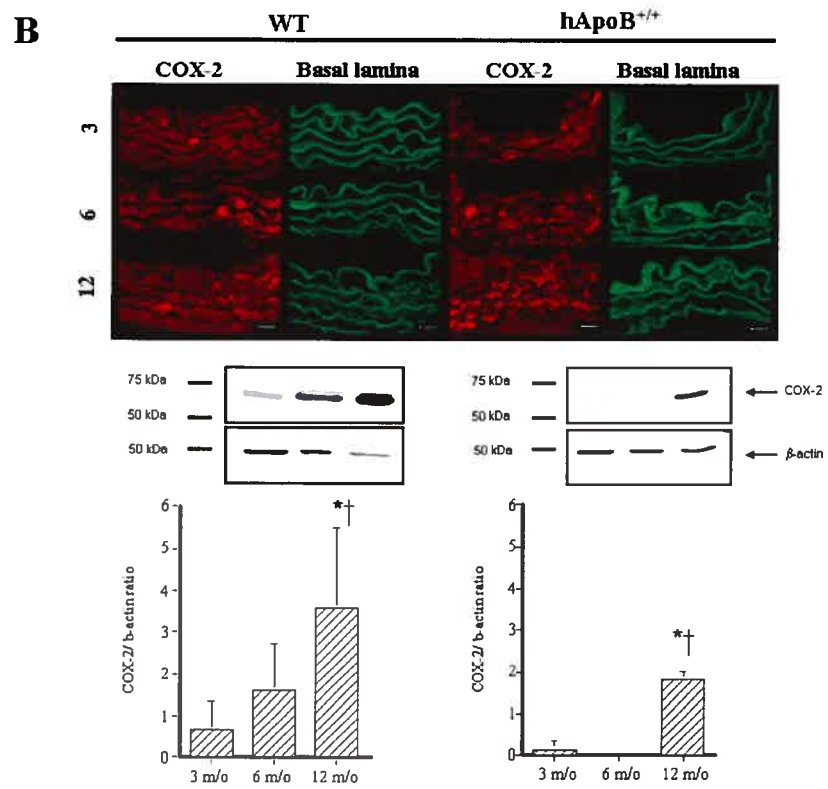


Figure 5.

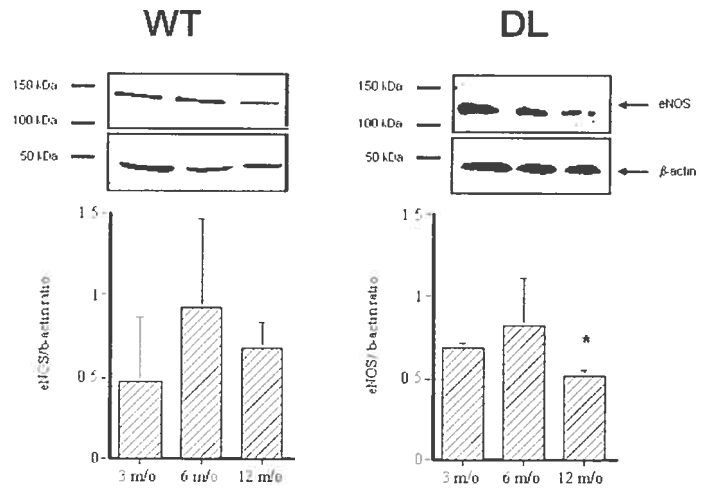
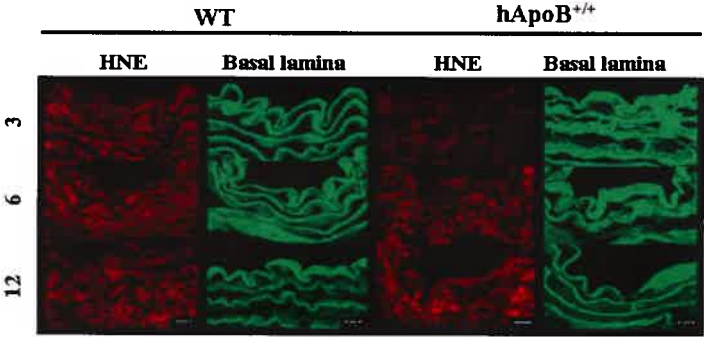


Figure 6.



Étude #2

Apport original et contribution des co-auteurs:

La contribution du premier auteur, Marie-Eve Gendron, est majeure et substantielle. Dr Éric Thorin a supervisé l'étude et contribué à la rédaction/révision du manuscrit.

PERMISSION DE L'ÉDITEUR

1. Identification de la revue ou du livre

American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology, 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20814- 3991, USA, 12 septembre 2007.

2. Identification de l'éditeur ou des éditeurs

Alberto Nasjletti

3. Identification de l'article

Marie-Eve Gendron, and Eric Thorin. A change in the redox environment and thromboxane A2 production precede endothelial dysfunction in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Jul 20; [Epub ahead of print]

L'étudiant, Marie-Eve Gendron, est autorisé à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre « *Influence de l'âge sur la fonction vasculaire en condition pro-athérosclérotique : Impact de l'environnement redox* ».

ALBERTO NASJLETTI 

Éditeur

10/1/2007

Date

A change in the redox environment and thromboxane A₂ production precede endothelial dysfunction in mice

Marie-Ève Gendron* & Eric Thorin†§

*Department of Physiology and †Department of Surgery, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal Heart Institute, 5000, Belanger street, Montreal, Quebec, Canada, HIT 1C8.

Running head: TXA₂ and endothelial function in mice

§ To whom correspondence should be addressed:

Institut de Cardiologie de Montréal, centre de recherche, 5000 rue Bélanger, Montréal, Québec, HIT 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330; fax.: (514) 376-1355; Email: eric.thorin@umontreal.ca

Total word count: 6013

Abstract

Objective: We reported that the endothelial dysfunction that develops with age was associated with a pro-inflammatory phenotype. In this study, we hypothesized that an increased production of pro-inflammatory cyclooxygenase (COX) products occurs before endothelial dysfunction.

Methods: Dilations to acetylcholine (ACh) were recorded from pressurised renal arteries isolated from 3- and 6-m/o C57Bl/6 male mice treated or not with the polyphenol catechin (30 mg/kg/day) in the drinking water for 3 months. TXB₂ release, the metabolite of TXA₂, was measured using immuno-enzymatic assays and free radical production was measured using the fluorescent dye CM-H₂DCF-DA. eNOS and COX-1/2 mRNA expression was quantified by qPCR.

Results: L-NNA reduced ($P<0.05$) ACh-induced dilation in vessels isolated from 3- and 6-m/o mice. In the presence of L-NNA, indomethacin normalised ($P<0.05$) the dilation in vessels from 6-m/o mice only. SQ 29,548 (TP receptor antagonist) and furegrelate (TXA₂ synthase inhibitor), in the presence of L-NNA, also improved ($P<0.05$) dilation. L-NNA increased TXA₂ release and free radical-associated fluorescence, the latter being prevented by SQ 29,548. In vessels from 6-m/o mice treated with catechin for 3 months, L-NNA-dependent reduction in ACh-mediated dilation was insensitive to indomethacin, while TXA₂ release and free radical-associated fluorescence were prevented. eNOS mRNA expression was significantly increased by catechin treatment.

Conclusion: Our results suggest that an augmented production of TXA₂ and the associated change in redox regulation precede the development of the endothelial dysfunction.

Key words: Thromboxane A₂, nitric oxide, cyclooxygenase, reactive oxygen species, endothelial dysfunction.

Introduction

Normal vascular endothelial function depends on a controlled balance between the production and the release of endothelium-derived relaxing and contracting factors. The contribution to the dilation of endothelium-derived nitric oxide (NO), prostacyclin (PGI₂) and the hyperpolarizing factor (EDHF) is in harmony with the release of constrictors such as endothelin, prostaglandins (PG) and thromboxane A₂ (TXA₂) (13, 20). The imbalance towards an increased release and/or functional impact of endothelium-derived contracting factors on the vascular function, however, is associated with an established endothelial dysfunction (2, 16), a hallmark of cardiovascular diseases and aging (13).

Cyclooxygenase (COX)-derived contracting factors are released from intact rat aorta (22) under circumstances where NO production is reduced (4, 8, 15, 22, 31, 32). In the aorta of hypertensive rats, the release of a COX-derived contracting factor limits the endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine (5, 19). Likewise, impaired vasodilation to acetylcholine in the forearm of hypertensive patients can be restored by a COX inhibitor (25).

Some studies suggest however, that COX-derived contracting factors could act in concert with reactive oxygen species (ROS) to induce vasoconstriction. ROS cause the contraction of rings of the thoracic aorta isolated from spontaneously hypertensive rats, which can be prevented by indomethacin (3). Tesfamariam and co-workers showed that activation of PGH₂ receptors causes contraction and impairment of endothelium-dependent relaxations in intact rat aorta by a mechanism involving the generation of ROS (26).

Recently, we reported that the endothelial pathways responsible for the dilation of mouse isolated vessels evolve during maturation and aging (13, 18), demonstrating that the endothelial biology is dynamic with time, most likely as a result of time-dependent injuries and repairs. We observed that in C57Bl/6 mice, these intrinsic changes were not associated with an endothelial dysfunction between the age of 3 and 6

months, but at 12 months of age only. Intriguingly, similar changes in endothelial biology occurred earlier in dyslipidemic mice with a significant increase in oxidative stress and impaired endothelial dilatory function at the age of 6 months (13, 18). We therefore speculated that the changes in the contribution of the various endothelium-derived vasoactive factors observed with maturation (up to 6 months of age) in C57Bl/6 mice may be adaptive to maintain function and therefore a reflection of the upcoming endothelial dysfunction in aging mice.

In the present study, we assessed the potential role of a COX-derived factor in the reduced dilation of the mouse renal artery during pharmacological inhibition of NO synthesis and studied the role of ROS generation in this process. We propose that the increased contribution of TXA₂ in the regulation of the vascular tone is a precursor of the future endothelial dysfunction associated with aging.

Material and Methods

Renal arteries were isolated from 3- and 6-month old (m/o) male C57Bl/6 mice (Charles River, St-Constant, Qc). Endothelial dysfunction is noticeable at 12-m/o (13). In a separated set of experiment, 3 m/o mice were treated with the antioxidant polyphenol catechin (30 mg/kg/day) in the drinking water for 3 months before study. At this time, animals were anesthetized with isoflurane (2.5%) in O₂ (0.5 L/min) and blood pressure measured using a Millar catheter inserted in the carotid artery. The procedures and protocols were performed in accordance with our institutional guidelines and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* of Canada.

Vascular reactivity studies. Experiments were conducted in isolated and pressurized (100 mm Hg) mouse renal arteries (external diameter \approx 400 μ m) as previously described (13). After 50 min of equilibration, myogenic tone had developed, i.e. the reduction in diameter induced by the intra-luminal pressure. Arterial segments were then pre-constricted with phenylephrine (PE; 30 μ mol/L) and concentration-response curves to acetylcholine (ACh; 0.001 μ mol/L - 30 μ mol/L) were constructed. Inhibition of NO production was achieved by using L-NNA (10 μ mol/L). PGI₂ and TXA₂ production were inhibited by indomethacin (INDO; 10 μ mol/L), a non selective inhibitor of COX. NS-398 (10 μ mol/L), a selective COX-2 inhibitor or valeryl salicylate (VS; 1 mmol/L), a selective COX-1 inhibitor (13). In addition, selective TXA₂ production was inhibited using furegrelate (10 μ mol/L), a TXA₂ synthase inhibitor (7). TXA₂ TP receptor was antagonized using SQ 29,548 (10 μ mol/L). The effects of endogenous free radicals were inhibited by acute pre-treatment of the vessel with N-acetyl-L-cystein (NAC; 1 μ mol/L) or catalase (CAT; 100 U/ml) for 30 minutes before the beginning of the dose-response curve (10, 13). Only one concentration-response curve was performed on each vessel.

Free radical measurement. Isolated and pressurized renal arteries were incubated in the presence of 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H₂DCF-DA; 5 µmol/L) added to the bath 30 min before the beginning of the experiment as previously described (10). Arteries were then washed with fresh PSS. Basal level of fluorescence was set at the same level for every artery at the beginning of the experiment. Changes in fluorescence were then measured: fluorescence intensity was assayed in vessels exposed to L-NNA alone or in combination with SQ 29,548, and U46619 (0.1 µmol/L) alone, an analogue of TXA₂. Specificity of the probe for free radicals was achieved using hydrogen peroxide (H₂O₂, 500 µmol/L) as previously demonstrated by our group (10). Addition of H₂O₂ in the bath increased by 30 folds the fluorescence intensity compared to the basal condition (data not shown).

Quantification of the vasoconstrictor TXA₂ (TXB₂) released by renal arteries. Vessels were pressurized in a 2 mL-chamber. Drugs were added to the bath during the equilibration period and prior the experiment (30 min). Phenylephrine-contracted vessels were then dilated with a single dose of ACh (30 µmol/L). The physiological salt solution (PSS) was collected from the chamber and frozen at -80°C. The level of the stable end-product of TXA₂ (TXB₂) was assayed by ELISA following the protocols provided by the manufacturer (Cayman chemical company, Ann Arbor, MI, USA).

eNOS, COX- and COX-2 mRNA quantification by qPCR. Total RNA was extracted from aorta using an RNeasy mini-kit (Qiagen Inc). Efficient extraction was possible by performing additional steps of digestion with proteinase K (Qiagen Inc) and by eliminating DNA with a treatment with DNase I (Qiagen Inc). The reverse transcriptase reaction contained 5 ng/µL total RNA (each sample), M-MLV reverse transcriptase (200 U, Invitrogen), pd(N)6 (5 ng/µL, Invitrogen), oligo (dT) (25 ng/µL, Invitrogen), dNTPs (0.5 mmol/L, MBI Fermentas), and supplied optimal buffers. The reaction protocol

consisted of 3 successive incubation steps: (1) 25°C for 10 minutes; (2) 37°C for 50 minutes; and (3) 70°C for 15 minutes.

qPCR was performed with 1 or 2 ng of cDNA template depending on the gene studied and containing the appropriate primer concentration; eNOS (300 nM); COX-1 (300 nM); COX-2 (300 nM); cyclophilin A (300 nM) and SYBR Green PCR master mix (Stratagene). Primers for each gene were obtained from distinct exons that spanned an intron by using the *Ensembl* genome browser (<http://www.ensembl.org>). The sequence specificity of each primer was verified with the *Blast* program derived from the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The primers used were as follows:

Genes	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
mouse eNOS	CACGAGGCACTGGTGTG GT	CTTGCGCCGCCAAGAG GATA
mouse COX-1	ACTCAGCGCATGACTACA TC	CTTCTCAGCAGCAGCTG TTG
mouse COX-2	GAACATGGACTCACTCAG TTTGTTG	CAAAGATAGCATCTGG ACGAGGT
mouse cyclophilin A	CCGATGACGAGCCCTTGG	GCCGCCAGTGCCATTAT G

PCR products were purified, sequenced and confirmed to be the genes of interest.

Statistical Analysis. In every case, *n* refers to the number of animals used in each protocol. Continuous variables are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Half-maximum effective concentration (EC_{50}) of ACh was measured from individual concentration-response curves only when a maximal response was obtained. The pD_2 value, the negative log of the EC_{50} , was obtained. At the end of the protocol, the maximal diameter (D_{max}) was determined by changing the PSS to a Ca^{2+} -free PSS containing sodium nitroprusside (SNP: 10 μ mol/L) and EGTA (ethylene glycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 1 mmol/L). Myogenic tone was measured

at 100 mm Hg and expressed as percentage of the D_{max} . Acetylcholine-induced dilation is expressed as a percentage of the D_{max} . ANOVA studies followed by a Scheffé's F test were performed to compare E_{max} and pD_2 of dose-response curves. Unpaired t-tests were performed for prostanoids and free radical measurements. Differences were considered to be statistically significant for a P value <0.05 .

Drugs. ACh, phenylephrine, L-NNA, INDO, SQ 29,548, furegrelate, CAT, NAC, SNP, EGTA and U46619 were purchased from Sigma (St-Louis, MO, USA). NS-398 and VS were purchased from Cayman chemical (Ann Arbor, MI, USA). CM-H₂DCFDA was obtained from Molecular probe (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and was diluted daily in DMSO. All drugs were prepared daily and diluted in Ultrapure water, except for INDO, U46619 and VS, which were prepared in ethanol. NS-398 was prepared in DMSO. All drugs were then directly inserted in the bath chamber and the final concentrations of ethanol or DMSO never exceeded 0.1%.

Results

Effect of L-NNA and INDO. Myogenic tone was insensitive to INDO in vessels isolated from 3- and 6-m/o mice, while L-NNA increased basal tone; in both groups, addition of INDO prevented the constrictor effects of L-NNA (Table 1). The endothelium-dependent dilation to ACh of renal artery isolated from 6-m/o mice was maximal ($83\pm 3\%$ of D_{\max}) and similar to the dilation of renal arteries isolated from 3-m/o mice ($90\pm 5\%$). At 3 months, L-NNA reduced ($P<0.05$) both the dilation ($68\pm 4\%$) and the vascular sensitivity ($pD_2 = 5.8\pm 0.2$) to ACh compared to the control conditions ($90\pm 5\%$ and 6.7 ± 0.1 , respectively). INDO did not alter the inhibitory effect of L-NNA on the maximal dilation induced by ACh ($67\pm 5\%$ and 5.9 ± 0.2) (Fig. 1A).

Likewise, at 6 months, inhibition of NO synthesis by L-NNA reduced ($P<0.05$) the maximal dilation to ACh ($58\pm 8\%$) (Fig. 1B) as well as the vascular sensitivity (5.9 ± 0.1) to ACh, when compared to the control conditions ($83\pm 3\%$ and 6.4 ± 0.2) (Table 2 and Fig. 1B). Addition of INDO in the presence of L-NNA however, normalised ($P<0.05$) the maximal dilation and vascular sensitivity to ACh (Table 2 and Fig. 1B). INDO alone had no effect on the maximal dilation and sensitivity to ACh of vessels isolated from mice of 3 (E_{\max} : $88\pm 3\%$ and $pD_2 = 6.5\pm 0.2$) and 6 months of age (E_{\max} : $95\pm 8\%$ and $pD_2 = 6.6\pm 0.2$). None of the experimental conditions affected the contraction induced by PE (Table 1).

Effect of the preferential COX-1 (NS-398) and COX-2 (valeryl salicylate) inhibitors. In the presence of L-NNA, addition of either NS-398, a selective inhibitor for COX-2, or VS, a selective inhibitor for COX-1, mimicked the effect of INDO: both inhibitors restored ($P<0.05$) the maximal dilation and the vascular sensitivity to ACh of vessels isolated from 6-m/o mice (Table 2 and Fig. 2A). Likewise, both selective inhibitors prevented L-NNA-induced rise in basal tone (Table 1).

Effect of the TXA₂ synthase inhibitor (furegrelate) and the TP receptor antagonist (SQ 29,548). To evaluate the potential contribution of TXA₂ to the reduced dilation induced by ACh in the presence of L-NNA, we tested the effects of furegrelate, a TXA₂ synthase inhibitor, and SQ 29,548, a TP receptor antagonist. Both pharmacological agents prevented ($P<0.05$) the inhibitory effects of L-NNA on the dilation induced by ACh in arteries isolated from 6-m/o mice (Table 2 and Fig. 2B and 2C). In contrast, neither furegrelate nor SQ 29,548 prevented L-NNA-induced basal contraction suggesting that TXA₂ is not involved in this basal mechanism (Table 1).

Production of TXA₂ (TXB₂) by renal arteries. During the experimentation using vessels isolated from 6-m/o mice, the production of TXB₂, the metabolite of TXA₂ was quantified. TXB₂ levels only increased ($P<0.05$) when the arteries were incubated in the presence of L-NNA (Fig. 3). The increase in TXB₂ release was prevented ($P<0.05$) by addition of either INDO or furegrelate (Fig. 3).

Free radical measurement. To test the relationship between NOS activity, TXA₂ and oxidative stress, free radicals were measured using the fluorescent dye CM-H₂DCF-DA (10) in pressurised renal arteries exposed to L-NNA, SQ 29,548 and U46619, a synthetic analogue of TXA₂. In renal arteries isolated from 6-m/o mice, addition of L-NNA increased ($P<0.05$) free radical-associated fluorescence compared to the basal condition (Fig. 4). The effect of L-NNA was prevented ($P<0.05$) by SQ 29,548. Addition of U46619 strongly increased ($P<0.05$) the production of free radicals from isolated and pressurised mouse renal arteries (Fig. 4).

Effect of NAC and catalase on ACh-induced dilation. To validate the functional importance of TXA₂-dependent free radical production on the dilatory response induced by ACh in isolated vessels, we pre-treated the arterial segments either with the

antioxidant NAC or with catalase. Both acute interventions prevented ($P<0.05$) the diminution of the dilation induced by ACh in the presence of L-NNA. Only NAC however, normalised ($P<0.05$) the vascular sensitivity to ACh (Table 2 and Fig. 5). Furthermore, both antioxidants prevented the rise in tone induced by L-NNA (Table 1) demonstrating that the redox equilibrium contributes to basal tone regulation.

Effects of L-NNA and INDO, quantification of TXA₂ (TXB₂) and free radical measurement in renal arteries isolated from 6-m/o mice treated with catechin. To test the hypothesis that a change in the redox environment contributes to TXA₂-mediated reduction in dilation to ACh observed in the presence of L-NNA, we used renal arteries isolated from 6-m/o mice previously treated for 3 months with the polyphenol catechin.

Blood pressure and heart rate were not significantly different between 3-m/o mice (367 ± 40 mm Hg and 72 ± 4 b.p.m., $n=5$) and 6-m/o mice treated for 3 months with catechin (334 ± 20 mm Hg and 70 ± 3 b.p.m., $n=5$). In isolated renal vessels, however, the basal myogenic tone was increased (Table 1). It was, however, reduced to normal control values by INDO. Addition of L-NNA doubled myogenic tone but this rise was not sensitive to INDO, revealing a significant change in vascular physiology after 3-month catechin treatment.

In renal arteries isolated from these mice, L-NNA decreased ($P<0.05$) the dilation induced by ACh (Fig. 6A). Addition of INDO however, did not normalize this response (Fig. 6A), in contrast to what was observed in arteries isolated from untreated 6-m/o mice (Fig. 1B). In agreement with these functional data, the 3-month treatment period with catechin strongly reduced ($P<0.05$) TXA₂ release by renal arteries under control conditions (Fig. 6B) compared to TXA₂ release from vessels of untreated animals (Fig. 3). Furthermore, the addition of L-NNA neither stimulated the production of TXA₂ (Fig. 6B) nor increased free radical-associated fluorescence (Fig. 6C), while U46619 still increased free radical production (Fig. 6C).

COX-1/2 and eNOS mRNA expression in the aorta of catechin-treated mice. As shown by figure 7, 3-month therapy with catechin significantly increased eNOS and COX-2 mRNA expression. In contrast, COX-1 mRNA expression did not change.

Discussion

In the present study, we show that in the absence of NO, ROS production induced by COX-derived TXA₂ functionally limits endothelial dilation in renal arteries isolated from 6-m/o mice by decreasing EDHF release and/or efficacy (see Fig. 8). In addition, we have evidences that a change in the redox environment between the age of 3 and 6 months is responsible for the expression of TXA₂-dependent ROS production. We propose therefore, that TXA₂ production is indicative of the endothelial dysfunction that will develop later with normal aging.

In renal arteries isolated from 3- and 6-m/o mice, inhibition of NO production similarly reduced ACh-induced dilation. L-NNA reduced dilation by 25% in 3-m/o and by 30% in 6-m/o mice, demonstrating that NO production is not altered between the two groups. Cyclooxygenase inhibition (irrespective of the isoform) however, re-established the normal dilation only in 6-m/o mice. This confirms that maturation and aging are associated with changes in the mechanisms involved in the regulation of the vascular reactivity (13). We have previously reported that the P450-epoxygenase/EDHF pathway was functionally expressed at 12 but not 3 months of age in the *gracilis* artery of C57Bl/6 mice (18). In our experiments, in the presence of L-NNA and indomethacin, the dilation at 6-m/o is normal demonstrating that, in contrast to what we observed at 3 months, the EDHF pathway is most likely activated and compensates in the absence of NO; indomethacin, however, needs to be present to reveal the full dilatory potential of the endothelium. Inhibition of NO indeed unmasks the production of TXA₂ and ROS-associated production, which limits ACh-induced dilation. Others have reported this phenomenon in vessels isolated from spontaneously hypertensive rats (4, 12, 14). Addition of indomethacin alone tended to increase the maximal dilation induced by ACh without altering vascular sensitivity (Table 2), suggesting that inhibition of NO stimulates TXA₂ production rather than facilitating an already augmented TXA₂ production.

Inhibition of either COX-1 or COX-2 maintained the dilation in the presence of L-NNA at 6 months. We previously showed by Western blot and confocal microscopy

that both isoforms are expressed while the expression of COX-2 is up-regulated at 6 months (13). Our present data showing that COX-2 mRNA expression is increased at 6 months compared to 3 months and that COX-1 is present but stable (Fig. 7) is therefore consistent. Nonetheless, the augmented expression of the COX-2 isoform may be responsible for the functional change in reactivity observed at 6 months. Both isoforms contribute to the production of TXA₂ (6, 21, 27, 28) and recently TXA₂ has been associated to atherogenicity in LDL receptor knockout mice (9).

Both TXA₂ receptor antagonism and TXA₂ synthase inhibition restored the dilation induced by ACh in the presence of L-NNA in renal arteries isolated from 6-m/o mice. L-NNA leads to an increase in the production and release of TXA₂ measured by ELISA in the bathing solution, an effect that was prevented by furegrelate and indomethacin. Several groups have suggested that an unidentified endothelium-derived constricting factor induced vasoconstriction by acting on the PGH₂/TXA₂ receptor (TP receptor) (5, 12, 17, 19, 29, 30, 33). Our data extend these earlier findings and demonstrate that TXA₂ limits the dilation induced by ACh by acting on its TP receptor, which leads to the production of free radicals. NAC and catalase normalised the dilatory response, mimicking the effects of furegrelate, indomethacin and SQ 29,548. NAC, a broad ROS scavenger and precursor of glutathione, was more effective in preventing L-NNA-dependent vasoconstriction than catalase: this suggests that binding of TXA₂ to its TP receptor induces the release of a precursor of H₂O₂, likely superoxide. Works by Gao and Lee showed that H₂O₂ is an endothelium-dependent contracting factor in the rat renal artery (11). This group also demonstrated that exogenous H₂O₂-induced contraction was attenuated by antagonism of TP receptors and inhibition of TXA₂ synthase, suggesting that H₂O₂ stimulates TXA₂ release. In our experimental conditions this sequence of events is however unlikely since the TXA₂ analogue U46619 induced free radical production and TP receptor antagonism prevented L-NNA-induced free radical production as well. Others have shown that free radicals are involved in cyclooxygenase-dependent contractions, but in most studies, the contracting factor was not identified and only observed in pathological models (1, 5, 29, 30, 33). We have no indication that the rise in TXA₂-dependent free radical production limits ACh-induced

dilation in the presence of L-NNA by constricting the vessels. We previously reported that the P450-epoxygenase / EDHF pathway was highly sensitive to oxidative stress, which inhibited its dilatory role (18). It is therefore more likely that in our experimental conditions, the increase in TXA₂ production stimulates free radical production inactivating EDHF, which is fully functional after inhibition of the TXA₂ pathway (Fig. 8). In support of this proposal, we observed that the increase in basal tone (myogenic response) induced by L-NNA was normalized by indomethacin but not furegrelate and SQ 29,548 (Table 1) demonstrating that other prostaglandins, such as PGH₂, constrict the renal artery upon NO inhibition but not TXA₂ which effect is associated with the rise in free radical production.

To test the hypothesis that a change in the redox environment contributes to TXA₂-mediated reduction in dilation to ACh observed in the presence of L-NNA, we treated 3-m/o mice with the antioxidant catechin for 3 months. At 6 months of age, renal arteries isolated from catechin-treated mice responded to ACh by a dilatory response similar to those isolated from untreated mice, both in control conditions and in the presence of L-NNA. Indomethacin however, did not restore the normal dilatory response to ACh, while L-NNA neither increased TXA₂ nor free radical production. Hence, catechin prevented the evolutionary change that normally takes place at 6 months and maintained the profile of dilation observed at 3 months. The redox environment is therefore changed by catechin and this has a significant impact on the basal physiology of the renal artery. It has been demonstrated that polyphenols can inhibit superoxide-producing enzymes such as NADPH oxidase (23). Catechin produces similar effects to NAC; since catechin is not known to contribute to the glutathione pathway, the beneficial effects of catechin are likely due to scavenging of ROS, more specifically, superoxide that will reduce H₂O₂ formation. Polyphenols can improve endothelial function by increasing the production of NO, EDHF and prostacyclin and by inhibiting the production of vasoconstrictors (24). Thus, the mechanisms by which catechin improves endothelial function are complex and may involve several vasoprotective pathways, the increase in eNOS expression being one of them.

Myogenic tone was increased but reduced to normal control values by indomethacin while this latter had no influence on tone in control vessels isolated from untreated mice (Table 1). In addition, L-NNA induced a very potent constriction, which was insensitive to indomethacin. We do not know the significance of these changes since there were not associated with a change in blood pressure and heart rate. They highlight however, the fundamental role of free radicals in cellular function: in one hand, catechin promotes contractile prostanoid production (basal tone), while on the other hand it prevents TXA₂ release. The increase in basal tone may be related to the increased expression of COX-2 induced by catechin. Hence, catechin promotes the isomerase/reductase synthase pathway but limits the TXA₂ synthase pathway (Fig. 8). We do not know, however, if this is a direct effect of catechin or is it secondary to the rise in NO production.

The latter experiments suggest also that a change in the redox environment — that is prevented by catechin — appears to increase NO inhibition of TXA₂ synthesis. It is paradoxical that this pathway is subsequently responsible for the rise in oxidative stress that will limit the impact of a dilatory pathway (potentially the P450/EDHF pathway) that itself is expressed in 6- but not 3-m/o mice. We propose therefore that the increase in TXA₂ production revealed by NO synthase inhibition, is an early precursor of the future endothelial dysfunction. Endothelial dysfunction of the renal artery appears at the age of 12 months in C57Bl/6 mice (13). It is important to highlight that these data were collected in the absence of NO synthase activity: in *in vivo* condition, changes in dilatory function cannot be observed demonstrating that the underlying mechanism leading to TXA₂ production and oxidative stress through maturation is subtle. The mechanisms sensitive to redox regulation and leading to these changes in the endothelial pathways are however unknown.

In conclusion, our data demonstrate that TXA₂-induced ROS production functionally limits endothelial dilation in the absence of NO in renal arteries isolated from 6- but not 3-m/o mice. We propose that a change in the redox environment that can be prevented by catechin, increases TXA₂ production which could be indicative of the endothelial dysfunction that develops later with age.

Acknowledgements

The authors are grateful for the technical assistance of Marc-Antoine Gillis (blood pressure recordings) and Maya Mamarbachi (qPCR). This work has been supported in part by the Foundation of the Montreal Heart Institute, the Heart and Stroke Foundation of Quebec, and the Canadian Institute for Health Research (MOP 14496). E. Thorin is a senior scholar of the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec*. ME Gendron is supported by a scholarship from the Canadian Institute for Health Research.

1. Akamine EH, Urakawa TA, de Oliveira MA, Nigro D, de Carvalho MH, de Cassia ATR, and Fortes ZB. Decreased endothelium-dependent vasodilation in diabetic female rats: role of prostanoids. *J Vasc Res* 43: 401-410, 2006.
2. Angulo J, Cuevas P, Fernandez A, Gabancho S, Allona A, Martin-Morales A, Moncada I, Videla S, and Saenz de Tejada I. Diabetes impairs endothelium-dependent relaxation of human penile vascular tissues mediated by NO and EDHF. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 1202-1208, 2003.
3. Auch-Schwelk W, Katusic ZS, and Vanhoutte PM. Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 13: 859-864, 1989.
4. Auch-Schwelk W, Katusic ZS, and Vanhoutte PM. Nitric oxide inactivates endothelium-derived contracting factor in the rat aorta. *Hypertension* 19: 442-445, 1992.
5. Auch-Schwelk W, Katusic ZS, and Vanhoutte PM. Thromboxane A2 receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension* 15: 699-703, 1990.
6. Bagi Z, Erdei N, Toth A, Li W, Hintze TH, Koller A, and Kaley G. Type 2 diabetic mice have increased arteriolar tone and blood pressure: enhanced release of COX-2-derived constrictor prostaglandins. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25: 1610-1616, 2005.
7. Bolla M, You D, Loufrani L, Levy BI, Levy-Toledano S, Habib A, and Henrion D. Cyclooxygenase involvement in thromboxane-dependent contraction in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension* 43: 1264-1269, 2004.
8. Bratz IN, and Kanagy NL. Nitric oxide synthase-inhibition hypertension is associated with altered endothelial cyclooxygenase function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2394-2401, 2004.

9. Cyrus T, Yao Y, Ding T, Dogne JM, and Pratico D. Thromboxane receptor blockade improves the antiatherogenic effect of thromboxane A2 suppression in LDLR KO mice. *Blood* 109: 3291-3296, 2007.
10. Drouin A, Thorin-Trescases N, Hamel E, Falck JR, and Thorin E. Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H₂O₂ production in mouse cerebral arteries. *Cardiovascular research* 73: 73-81, 2007.
11. Gao YJ, and Lee RM. Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery. *Br J Pharmacol* 146: 1061-1068, 2005.
12. Ge T, Hughes H, Junquero DC, Wu KK, Vanhoutte PM, and Boulanger CM. Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H₂ in the SHR aorta. *Circ Res* 76: 1003-1010, 1995.
13. Gendron ME, Thorin-Trescases N, Villeneuve L, and Thorin E. Aging associated with mild dyslipidemia reveals that COX-2 preserves dilation despite endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H451-458, 2007.
14. Gluais P, Lonchamp M, Morrow JD, Vanhoutte PM, and Feletou M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol* 146: 834-845, 2005.
15. Ito T, Kato T, Iwama Y, Muramatsu M, Shimizu K, Asano H, Okumura K, Hashimoto H, and Satake T. Prostaglandin H₂ as an endothelium-derived contracting factor and its interaction with endothelium-derived nitric oxide. *J Hypertens* 9: 729-736, 1991.
16. John S, and Schmieder RE. Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and differences. *J Hypertens* 18: 363-374, 2000.

17. Kato T, Iwama Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T, and Satake T. Prostaglandin H2 may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension* 15: 475-481, 1990.
18. Krummen S, Drouin A, Gendron ME, Falck JR, and Thorin E. ROS-sensitive cytochrome P450 activity maintains endothelial dilatation in ageing but is transitory in dyslipidaemic mice. *Br J Pharmacol* 147: 897-904, 2006.
19. Luscher TF, and Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 8: 344-348, 1986.
20. Nguyen TD, Vequaud P, and Thorin E. Effects of endothelin receptor antagonists and nitric oxide on myogenic tone and alpha-adrenergic-dependent contractions of rabbit resistance arteries. *Cardiovascular research* 43: 755-761, 1999.
21. Qi Z, Cai H, Morrow JD, and Breyer MD. Differentiation of cyclooxygenase 1- and 2-derived prostanoids in mouse kidney and aorta. *Hypertension* 48: 323-328, 2006.
22. Rapoport RM, and Williams SP. Role of prostaglandins in acetylcholine-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension* 28: 64-75, 1996.
23. Sarr M, Chataigneau M, Martins S, Schott C, El Bedoui J, Oak MH, Muller B, Chataigneau T, and Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. *Cardiovascular research* 71: 794-802, 2006.
24. Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, and Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. *European journal of pharmacology* 500: 299-313, 2004.

25. Taddei S, Viridis A, Mattei P, and Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* 21: 929-933, 1993.
26. Tesfamariam B. Selective impairment of endothelium-dependent relaxations by prostaglandin endoperoxide. *J Hypertens* 12: 41-47, 1994.
27. Viridis A, Colucci R, Fornai M, Duranti E, Giannarelli C, Bernardini N, Segnani C, Ippolito C, Antonioli L, Blandizzi C, Taddei S, Salvetti A, and Del Tacca M. Cyclooxygenase-1 is involved in endothelial dysfunction of mesenteric small arteries from angiotensin II-infused mice. *Hypertension* 49: 679-686, 2007.
28. Wang D, Chabrashvili T, and Wilcox CS. Enhanced contractility of renal afferent arterioles from angiotensin-infused rabbits: roles of oxidative stress, thromboxane prostanoid receptors, and endothelium. *Circ Res* 94: 1436-1442, 2004.
29. Yang D, Feletou M, Boulanger CM, Wu HF, Levens N, Zhang JN, and Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 136: 104-110, 2002.
30. Yang D, Feletou M, Levens N, Zhang JN, and Vanhoutte PM. A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of SHR. *Hypertension* 41: 143-148, 2003.
31. Yang D, Gluais P, Zhang JN, Vanhoutte PM, and Feletou M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine, ATP and the calcium ionophore A 23187 in aortas from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Fundam Clin Pharmacol* 18: 321-326, 2004.

32. Yang D, Gluais P, Zhang JN, Vanhoutte PM, and Feletou M. Nitric oxide and inactivation of the endothelium-dependent contracting factor released by acetylcholine in spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 43: 815-820, 2004.
33. Yang D, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM, and Feletou M. Specific potentiation of endothelium-dependent contractions in SHR by tetrahydrobiopterin. *Hypertension* 41: 136-142, 2003.

Figure legends

Figure 1- Acetylcholine-induced dilation of renal arteries isolated from 3-m/o (A) and 6-m/o (B) mice. Responses were obtained either in control conditions (Control) or in the presence of NOS inhibition (L-NNA, 10 μ M) alone or combined with the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (L-NNA + INDO, 10 μ M). Data are mean \pm SEM. n = 6-15. *: P<0.05 compared to Control.

Figure 2- Acetylcholine-induced dilation of renal arteries isolated from 6-m/o mice. Responses were obtained in control conditions (Control) and in the presence of NOS inhibition (L-NNA, 10 μ M). L-NNA was combined with NS-398 (L-NNA + NS, 10 μ M) or valeryl salicylate (L-NNA + VS, 1 mM) (A), the TP receptor antagonist SQ 29,548 (L-NNA + SQ, 10 μ M) (B), or furegrelate (L-NNA + Furegrelate, 10 μ M) (C). Data are mean \pm SEM. n = 8-15. *: P<0.05 compared to Control.

Figure 3- Quantification of the release of TXA₂ (TXB₂) in the bathing physiological solution of renal arteries isolated from 6-m/o mice and during ACh-induced dilation. Levels of TXB₂ were obtained either in control conditions, in the presence of L-NNA (10 μ M) alone or in combination with indomethacin (L-NNA + INDO, 10 μ M) or furegrelate (L-NNA + Fur, 10 μ M). Data are mean \pm SEM. n = 4-5. *: P<0.05 compared to Control.

Figure 4- Measure of free radical production using the ROS-sensitive dye CM-H₂DCFDA in pressurised renal arteries isolated from 6-m/o mice. Changes in fluorescence were collected in the presence of L-NNA (10 μ M) alone or in combination with SQ 29,548 (L-NNA + SQ; 10 μ M), and during stimulation with the TXA₂ analogue U46619 (100 nM). Data are mean \pm SEM. n = 5-7. *: P<0.05 compared to Basal.

Figure 5- Acetylcholine-induced dilation of renal arteries isolated from 6-m/o in control conditions (Control) and in the presence of NOS inhibition either alone (L-NNA, 10 μ M) or

combined with NAC (L-NNA + NAC, 1 μ M) (A) or catalase (L-NNA + Catalase, 100 U/ml) (B). Data are mean \pm SEM. n = 4-15. *: P<0.05 compared to Control.

Figure 6- Acetylcholine-induced dilation of renal arteries isolated from 6-m/o mice treated for 3 months with catechin (A), quantification of TXA₂ (TXB₂) released in the bathing solution (B) and measurement of free radical production using the ROS-sensitive dye CM-H₂DCFDA (C). Dilatory responses were obtained in control conditions (Control) and in the presence of L-NNA (10 μ M) alone or in combination with indomethacin (L-NNA + INDO, 10 μ M). Data are mean \pm SEM. n = 7-8. *: P<0.05 compared to Control. Levels of TXB₂ were quantified either in control conditions, in the presence of L-NNA (10 μ M) alone or in combination with indomethacin (L-NNA + INDO, 10 μ M) or furegrelate (L-NNA + Fur, 10 μ M). Data are mean \pm SEM. n = 4-5. Changes in fluorescence were collected in the presence of L-NNA (10 μ M) alone or in combination with SQ 29,548 (L-NNA + SQ; 10 μ M), and during stimulation with the TXA₂ analogue U46619 (100 nM). Data are mean \pm SEM. n = 4-5. *: P<0.05 compared to Basal.

Figure 7- Expression of eNOS (A), COX-1 (B) and COX-2 (C) mRNA in the aorta quantified by qPCR. Data are mean \pm SEM. n = 5-6. *: P<0.05 compared to 3-m/o; #: P<0.05 compared to 6-m/o.

Figure 8- Schematic representation of the proposed mechanism.

Table 1. Levels of myogenic tone and phenylephrine-induced prestriction of renal arteries isolated from 3-m/o, 6-m/o mice and 6-m/o mice treated with catechin for 3 months.

Conditions	3-m/o mice		6-m/o mice		6-m/o mice catechin	
	Myogenic tone	prestriction	Myogenic tone	prestriction	Myogenic tone	prestriction
Control	19±4	64±6	16±4	63±2	34±9†	61±2
INDO	13±4	67±8	19±4	55±7	19±4	62±3
L-NNA	33±6*	74±3	38±4*	67±2	67±8*†	68±3
L-NNA + Indo	11±6	74±5	14±5	65±3	66±10*†	64±5
SQ	n/a	n/a	23±9	57±6	n/a	n/a
SQ + L-NNA	n/a	n/a	46±9*	70±4	n/a	n/a
NS-398 + L-NNA	n/a	n/a	27±8	54±6	n/a	n/a
VS + L-NNA	n/a	n/a	20±6	64±5	n/a	n/a
Furegrelate + L-NNA	n/a	n/a	36±8*	61±4	n/a	n/a
Catalase + L-NNA	n/a	n/a	22±10	62±10	n/a	n/a
NAC + L-NNA	n/a	n/a	22±9	63±4	n/a	n/a

Data are mean±SEM *: $P < 0.05$ compared to Control condition; †: $P < 0.05$ compared to 6-m/o

Table 2. Vascular sensitivity (pD_2) and maximal dilation (E_{max}) of renal arteries isolated from 6-m/o mice.

Conditions	6-m/o mice		
	pD_2	E_{max}	n
Control	6.4±0.2	83±3	13
INDO (10 μ M)	6.6±0.2†	95±8	6
L-NNA (10 μ M)	5.9±0.1*	58±8*	15
L-NNA (10 μ M) + Indo (10 μ M)	6.6±0.1†	83±3	11
SQ 29,548 (10 μ M)	6.6±0.2†	86±4	8
SQ 29,548 (10 μ M) + L-NNA	6.0±0.1	80±7	8
NS-398 (1 μ M) + L-NNA	6.3±0.3†	78±2	8
Valeryl salicylate (1 mM) + L-NNA	6.2±0.2	84±8	8
Furegrelate (10 μ M) + L-NNA	6.3±0.2†	84±5	8
Catalase (100 U/ml) + L-NNA	6.0±0.2	86±4	4
NAC (10 μ M) + L-NNA	6.6±0.1†	76±7	4

Data are mean±SEM. *: $P < 0.05$ compared to Control condition; †: $P < 0.05$ compared to L-NNA.

Figure 1.

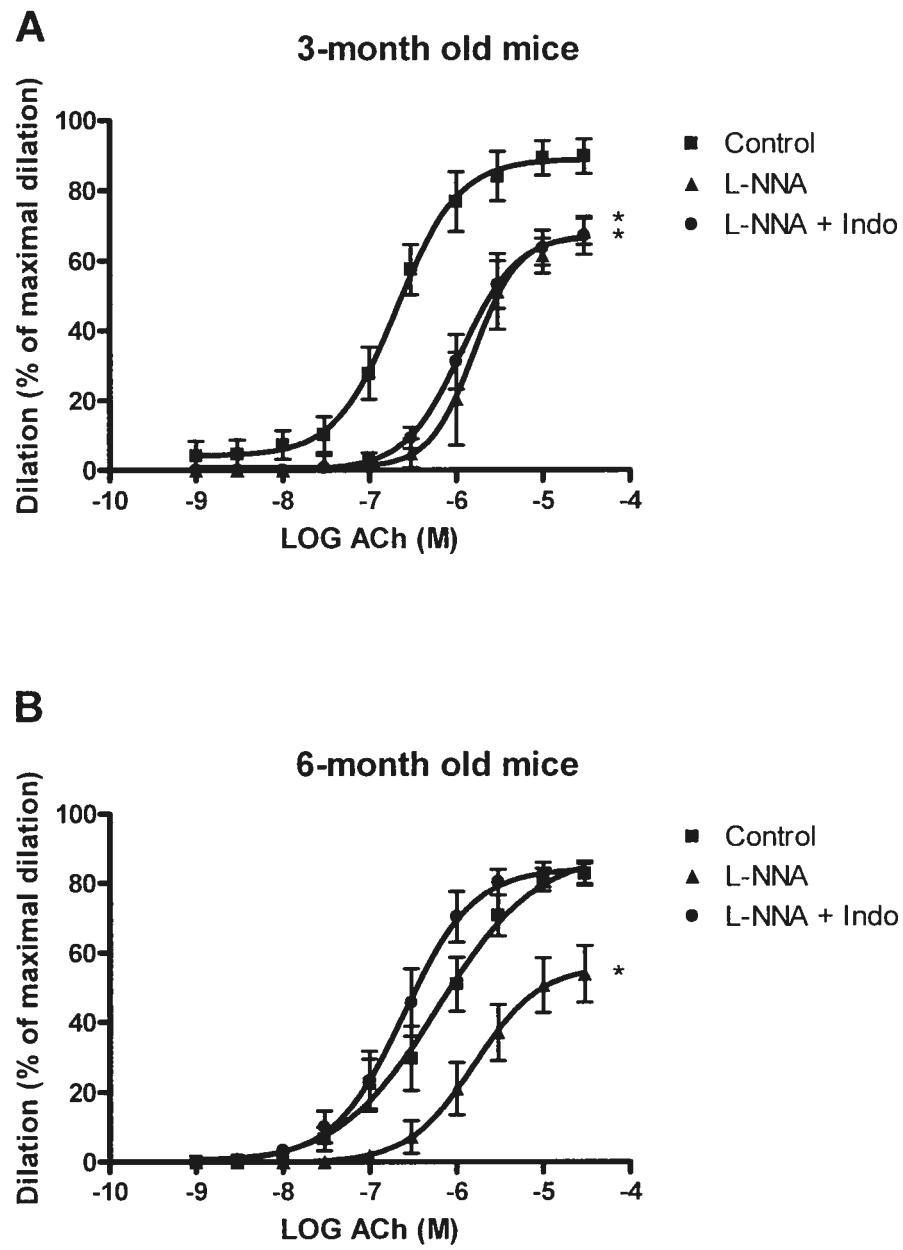


Figure 2.

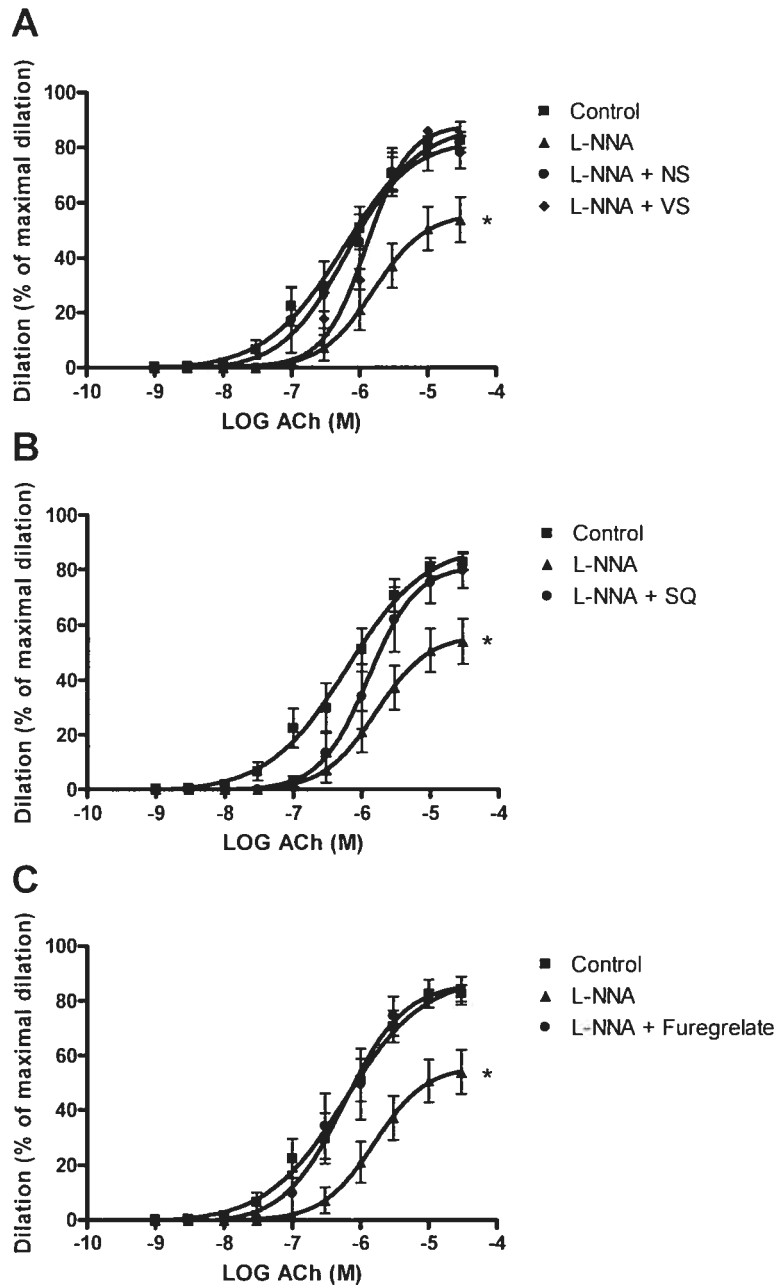


Figure 3.

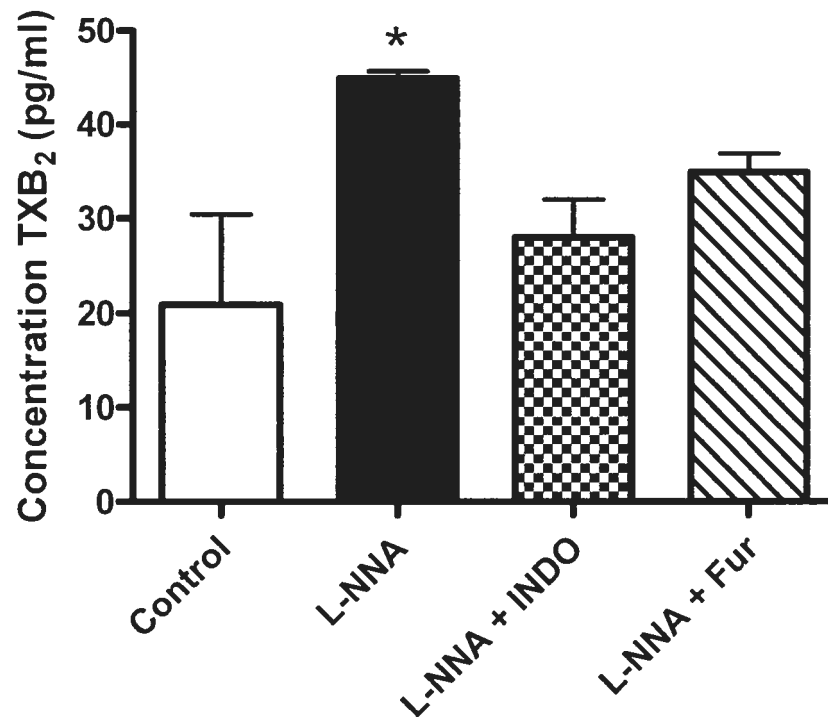


Figure 4.

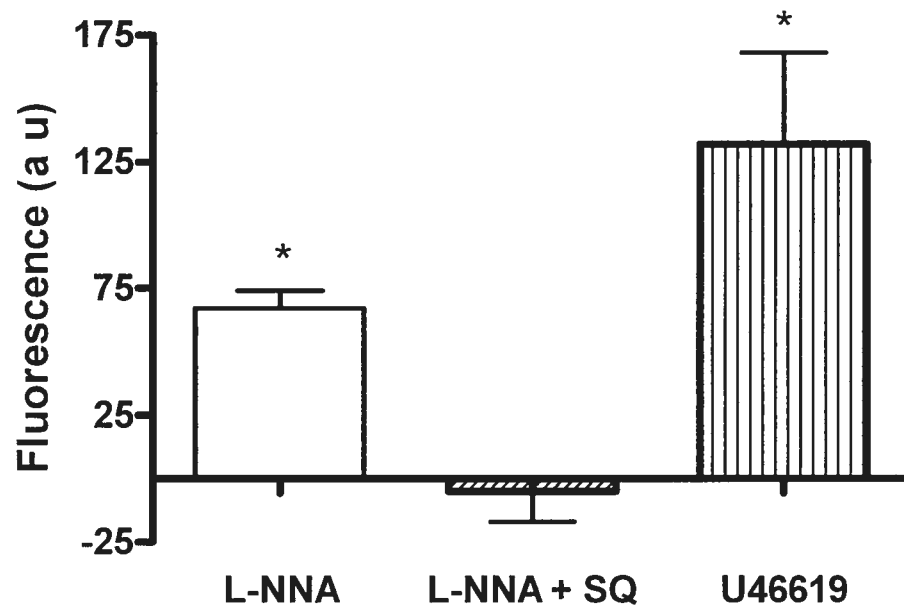


Figure 5.

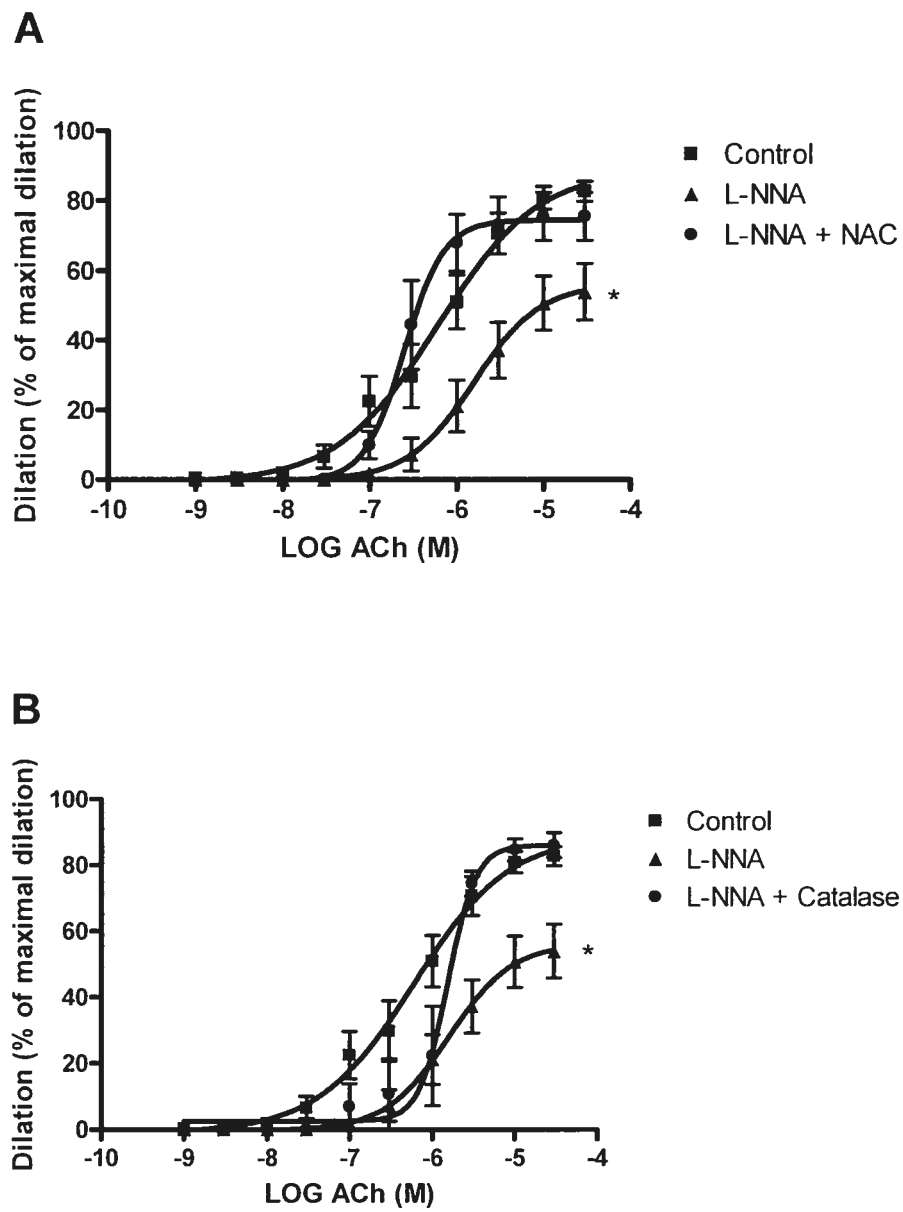


Figure 6.

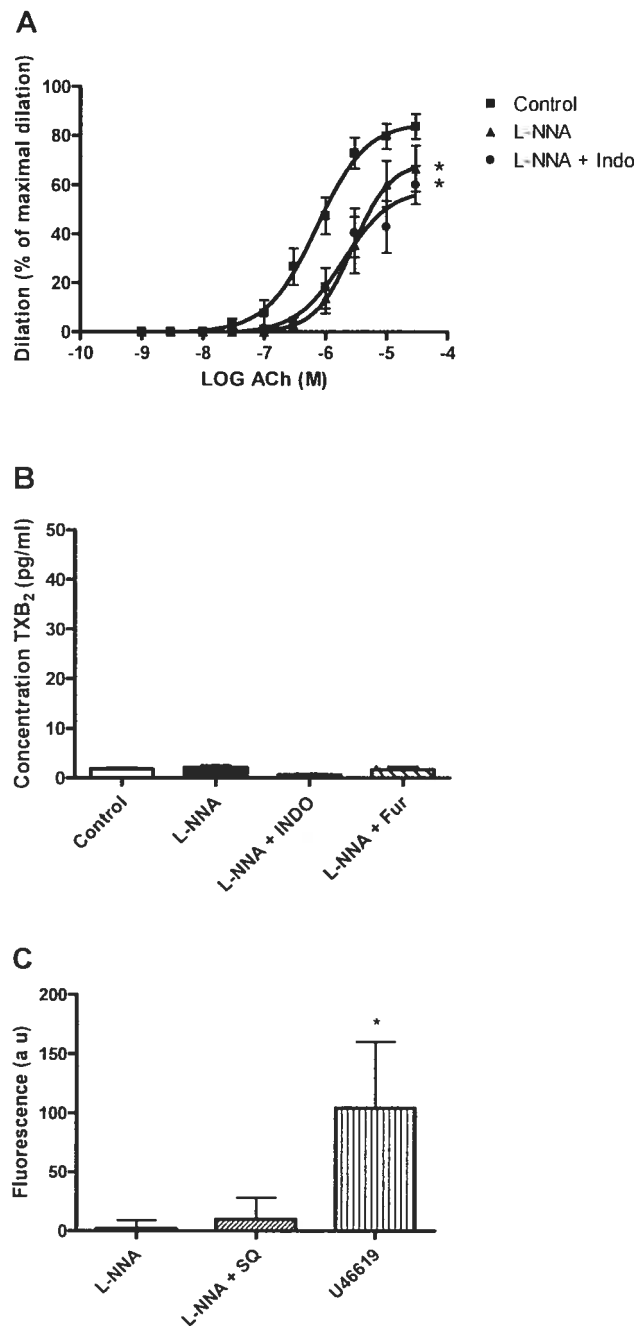


Figure 7.

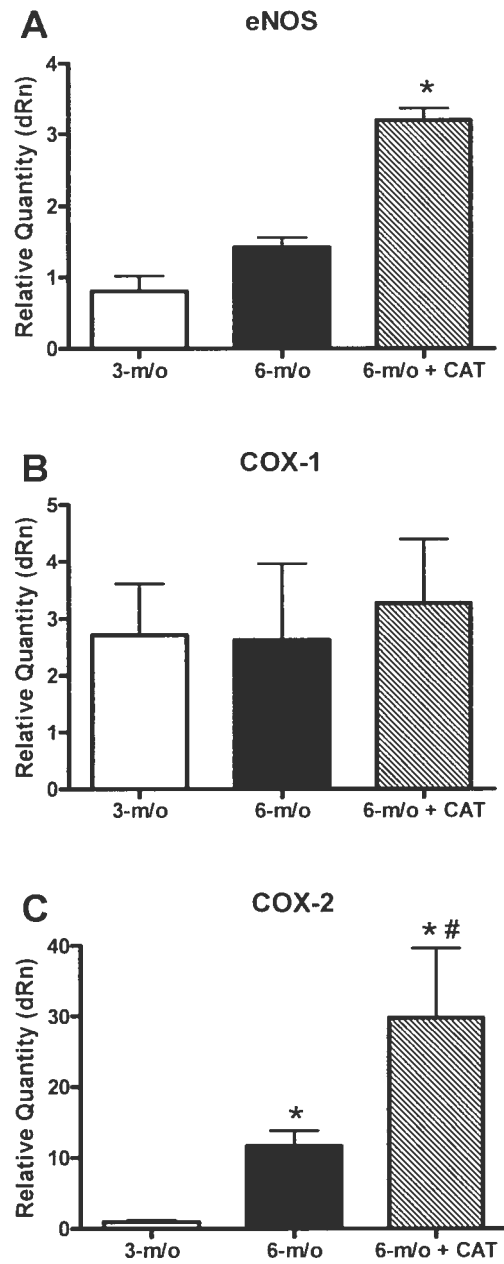
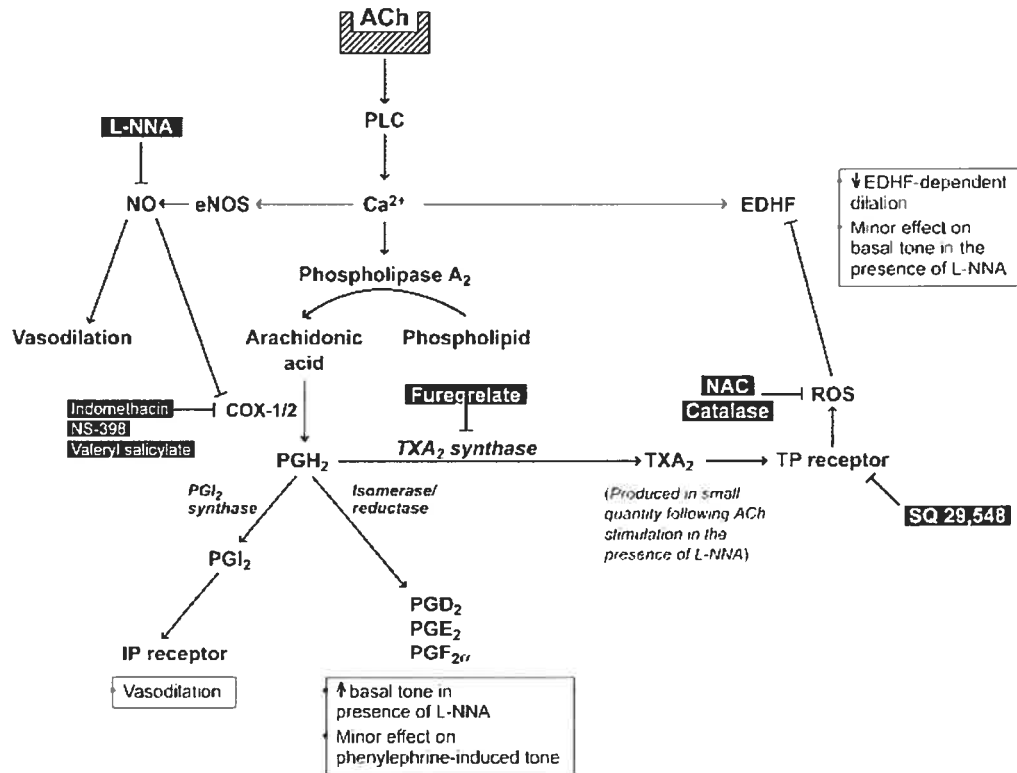


Figure 8.



Étude #3

Apport original et contribution des co-auteurs:

La contribution du premier auteur, Marie-Eve Gendron, est majeure puisqu'elle a participé à toutes les expérimentations et à la rédaction du manuscrit. Dr Jean-François Théorêt a participé aux études de cytométrie en flux. Madame Aida M. Mamarbachi a contribué aux études de qPCR. Monsieur Louis Villeneuve a participé à l'acquisition des images d'immunofluorescence par microscopie confocale. Dr Yahye Merhi a contribué à la supervision de l'étude et à la révision du manuscrit. Dr Éric Thorin a supervisé l'étude et contribué à la rédaction/révision du manuscrit.

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Marie-Eve Gendron

3-525-1-0 Ph. D. Physiologie

2. Description de l'article

Marie-Ève Gendron, JF Théoret, AM Mamarbachi, L Villeneuve, Y Merhi, E Thorin.

Time-dependent beneficial effect of chronic polyphenol treatment on endothelial dysfunction in aging mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007

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-Eve Gendron inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre « *Influence de l'âge sur la fonction vasculaire en condition pro-athérosclérotique : Impact de l'environnement redox* ».

MARIE-EVE GENDRON

Coauteur

25/09/07

Date

Jean-Francois Théoret

Coauteur

2007-09-13

Date

AIDA M. MAMARBACHI

24 Sept 2007

Coauteur

Date

Louis R. Villeneuve

24 sept 2007

Coauteur

Si

Date

YAHYE MERHI

24-9-07

Coauteur

Date

ERIC THORIN

25. IX. 2007

Coauteur

Date

Time-dependent beneficial effect of chronic polyphenol treatment on endothelial dysfunction in aging mice

Marie-Ève Gendron*, Jean-François Théorêt, Aida M. Mamarbachi, Louis Villeneuve, Yahye Merhi & Eric Thorin†§

*Department of Physiology and †Department of Surgery, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal Heart Institute, Research center, 5000, Belanger street, Montreal, Quebec, Canada, HIT 1C8.

Running head: Polyphenol and endothelial function in aging

§ To whom correspondence should be addressed:

Institut de Cardiologie de Montréal, centre de recherche, 5000 rue Bélanger, Montréal, Québec, HIT 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330; fax.: (514) 376-1355; Email: eric.thorin@umontreal.ca

Total word count: 5949

Abstract

Background. A controlled redox environment is essential for cell maturation and function. It has been proposed that an unbalance occurs during aging leading to endothelial dysfunction. We hypothesized that a chronic antioxidant therapy started after maturation would limit endothelial dysfunction without compromising the redox-dependent maturation of the vasculature.

Methods and Results. C57Bl/6 mice were treated with the polyphenol catechin for the last 3 (post-maturation) or 9 months prior study at 12-m/o. Renal artery dilations to acetylcholine (ACh) were recorded *in vitro* and vascular gene expression measured. Splenocytes adhesion and expression of adhesion molecules were quantified. Maximal dilation (E_{max}) and vascular sensitivity (pD_2) to ACh were lower at 12- than 3-m/o ($P<.05$). Both catechin regimens maintained E_{max} but only the 3-month treatment prevented the decline in pD_2 to ACh ($P<.05$): this was due to an increased dilatory function of a non-NO/non-PGI₂ endothelium-derived relaxing factor. Splenocyte adhesion to the endothelium, expression of CD18 and clivage of CD62L and PSGL-1 were augmented at 12 months ($P<.05$): both catechin regimens normalized adhesion, but only the 3-month therapy prevented the rise in CD18 expression and clivage of PSGL-1 ($P<.05$) on splenocytes. Three-month treatment prevented the age-dependent rise in COX-2 and decline in SIRT-1. In contrast, 9-month catechin ($P<.05$) increased eNOS, COX-2, p22^{phox} as well as SIRT-1 expression but reduced MnSOD.

Conclusion. Our data suggest that the redox equilibrium is essential for the proper maturation of the endothelium (up to 9-m/o), thereby contributing to the beneficial effects of the late-catechin therapy.

Key words: endothelium, aging, polyphenol, leukocytes, genes.

Introduction

Many cellular processes such as metabolism, proliferation, growth and inflammatory host defense involve oxidation and reduction reactions (17, 19, 26, 30, 32, 38). To function properly, the cell needs therefore to monitor and regulate tightly its redox environment using enzymes such as NOS, MnSOD and NADPH oxidases (6, 10, 29, 39). In addition to regulate normal cell function, few data underscore the role of the redox poise on the cellular maturation and/or differentiation (23). The role of the redox environment as a regulator of endothelial cell function and maturation is indeed not well defined (11, 12, 20).

Aging is a condition leading to an unbalanced redox environment towards oxidation that is associated with impaired endothelium-dependent dilation, and enhanced endothelial activation and inflammation (21, 24). The mechanisms by which oxidative stress is responsible for endothelial cell dysfunction may include DNA, protein and lipid damage, alteration of gene expression and decreased NO availability (33-35). There is therefore a strong rationale for using antioxidant in preventing cardiovascular decline in particular and age-related damages in general (3).

Polyphenols, such as catechin, are abundant in fruits, vegetables, green tea and red wine. It has been shown that polyphenols can increase efficacy and/or production of endothelium-derived relaxing factors (36), improve efficacy of endogenous antioxidants and act as direct free radical (ROS) scavengers (16, 28, 31). We recently showed that catechin treatment of young mice for 3 months increased eNOS mRNA expression and prevented endogenous thromboxane A₂-induced ROS production (12). Antioxidant polyphenols have been widely studied regarding their effects on cardiovascular diseases, stroke and cancer (see ref. (1) for review). These studies however, have yielded mixed results, probably due to different experimental settings and conditions. More importantly, the age of the animal at initiation of the treatment may be crucial. Although no data are available in the literature, it is possible that if initiated too early in life, an antioxidant therapy may impair proper cell maturation and thus cell function; consequently timing for antioxidant treatment would be essential. In the present study,

we tested the hypothesis that post-maturation antioxidant therapy prevents age-related endothelial dysfunction and inflammation by benefiting from the redox-dependent maturation of the vasculature earlier in life.

Material and methods

Experimental groups. All experiments were performed using 3- and 12-month old (m/o) male C57Bl/6 mice (Charles River, St-Constant, Qc) as illustrated in Figure 1A. Treatments with the antioxidant polyphenol catechin (30 mg/kg/day, Sigma, St-Louis, MO, USA) in the drinking water for either the last 3 (late) or 9 (early) months before study at 12 months of age were randomly administrated to 9- and 3-m/o mice, respectively. The dose of catechin used was based on several studies performed in mice using polyphenols in a concentration range between 4 and 60 mg/kg/day (3, 9) and we previously reported that 30 mg/kg/day efficiently prevented ROS production (12). At the end of the catechin treatment period, renal arteries were harvested for vascular reactivity studies (11); the aorta was either snap frozen for total RNA extraction or freshly prepared for the splenocyte adhesion studies that were isolated from the spleen. All experiments have been approved by our ethical institutional committee in accordance with the guidelines for animal experimentation of the Canadian Council on Animal care Protection (CCAP).

Vascular reactivity studies. Experiments were conducted in isolated and pressurized (100 mm Hg) mouse renal arteries (external diameter \approx 400 μ m) as previously described (11). After 50 min of equilibration, myogenic tone had developed, i.e. the reduction in diameter induced by the intra-luminal pressure. Arterial segments were then pre-constricted with phenylephrine (PE: 30 μ mol/L) and concentration-response curves to acetylcholine (ACh: 0.001 μ mol/L - 30 μ mol/L) were constructed. Inhibitions of NO and prostacyclin (PGI₂) production were achieved by using L-NNA (10 μ mol/L) and indomethacin (INDO: 10 μ mol/L), respectively. Only one concentration-response curve was performed on each vessel.

Splenocyte adhesion studies. The day of sacrifice, the aorta was freshly isolated and cleaned of fat and connective tissues. The aorta was then gently opened longitudinally and fixed, the endothelium faced up, in a Petri dish. Then, the aorta was cut in segments, covered with a physiological salt solution (PSS) and kept at 37°C. In parallel, the spleen was harvested, immersed in 5 ml RPMI, disrupted by rubbing over a 200 μ m-nylon

mesh screen using a 5 ml-syringe plunger and the cell suspension was centrifuged. Distilled water was added for 15 seconds to lyse contaminating erythrocytes and osmolarity was re-established using a 1.8% NaCl solution. Cell count was adjusted to 5×10^6 cell/ml with RPMI. Splenocytes were labelled with Cr^{51} (activity of 100 μCi) for 1 hour at 37°C with gentle agitation every 15 minutes to reduce cell sedimentation. Splenocytes were then centrifuged and washed twice with RPMI. Splenocytes were re-suspended in RPMI and cell count was adjusted to 10^6 cell/ml with RPMI. Segments of aorta with intact endothelium were first exposed to PSS alone or containing histamine (0.1 μM) for 10 minutes and then washed. Labeled splenocytes were then allowed to adhere onto the native endothelium for 30 minutes at 37°C . Segments were then washed to remove non-adhesive splenocytes and radioactivity was counted. The number of splenocytes adhering to the endothelium was expressed per surface area of the segment (splenocytes/ mm^2).

Flow cytometry studies. From the splenocyte suspension (5×10^6 cell/ml), 33 μL samples were incubated for 30 minutes at room temperature in the dark with different monoclonal antibodies (CD18-, CD62L- or CD162 (PSGL-1)-phycoerythrin-conjugated, from Serotec) or their isotype-matched control IgGs. Reaction was stopped by the addition of 1% formalin and samples were analyzed on an Altra flow cytometer (Beckman Coulter) within 2 hours. Cells were gated using their forward- and side-scatter characteristics and their labeling monitored using single-color immunofluorescence staining with saturating concentrations of fluorescent dye-conjugated monoclonal antibodies. Antibody binding was determined as the percentage of positive splenocytes or the mean fluorescence intensity (MFI) over a fluorescence threshold gated over a splenocyte population stained with the proper isotype-matched control IgG (<2% of positive cells). The binding index (% of positive cells x MFI) was then calculated. Between 3,000-5,000 splenocytes were analyzed from each sample.

Immunofluorescence studies. Segments of the aorta used for splenocyte adhesion studies were labeled with specific antibodies permitting visualization of the interaction between the splenocytes and the endothelium. Segments were incubated with anti-CD45 FITC conjugated (dilution 1:20; Beckman Coulter), anti-VE-Cadherin (dilution 1:50; Santa

Cruz), anti-ICAM-1 (dilution 1:50; Santa Cruz) or anti-P-selectin (dilution 1:50; Santa Cruz) diluted in PBS containing 1% normal donkey serum and 0.1 % (v/v) triton X-100. The segments were washed and incubated with a 1:500 (v/v) dilution of the appropriate secondary antibody (Alexa 647-conjugated donkey anti-rabbit antibody, Alexa 546-conjugated donkey anti-goat antibody, Invitrogen). For each secondary antibody, negative control experiments were performed in the absence of primary antibody. Fluorescence was visualized using a scanning confocal microscope LSM 510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with a 63x/1.4 Plan-Apochromat objective (zoom out 0.7x). Z-stacks (0.2 μm \times 0.2 μm \times 0.3 μm in XYZ) were acquired over 40 μm in thickness. Z-stacks were deconvolved with the Huygens Professional 2.10 software (Scientific Volume Imaging, Alexanderlaan, The Netherlands). Three dimensions rendering was executed with the Velocity 4.0 software (Improvision, Quorum Technologies, Guelph, Canada).

Quantification of gene expression by Real-Time polymerase chain reaction (qPCR). Total RNA was extracted from aorta using an RNeasy mini-kit (Qiagen Inc). Efficient extraction was possible by performing additional steps of digestion with proteinase K (Qiagen Inc) and by eliminating DNA with a treatment with DNase I (Qiagen Inc). The reverse transcriptase reaction contained 5 ng/ μL total RNA (each sample), M-MLV reverse transcriptase (200 U, Invitrogen), anti-sens primer (4 pM, Invitrogen), dNTPs (0.5 mmol/L, MBI Fermentas), and supplied optimal buffers. The reaction protocol consisted of 3 successive incubation steps: 1) 25°C for 10 minutes; 2) 37°C for 50 minutes; and 3) 70°C for 15 minutes.

qPCR was performed as previously (12) with 2 ng of cDNA template containing the appropriate primer concentration: Sirtuin-1 (100 nM); eNOS (300 nM); p22^{phox} (300 nM); MnSOD (300 nM); COX-1 (300 nM); COX-2 (300 nM); cyclophilin A (300 nM) and SYBR Green PCR master mix (Stratagene). Primers for each gene were obtained from distinct exons that spanned an intron by using the *Ensembl* genome browser (<http://www.ensembl.org>). The sequence specificity of each primer was verified with the *Blast* program derived from the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The primers used were as follows: for mouse Sirtuin-1:

forward 5'-GAGCAGGTTGCAGGAATCCA-3' and reverse 5'-CCTGATTA AAAATGTCTCCACGAA-3'; for mouse eNOS: forward 5'-CACGAGGCACTGGTGTGGT-3' and reverse 5'-CTTGCGCCGCCAAGAGGATA-3'; for mouse p22^{phox}: forward 5'-GGCTGCCCTCCACTTCCT-3' and reverse 5'-CTCCTTGGGTTTAGGCTCAATG-3'; for mouse MnSOD: forward 5'-GGCCAAGGGAGATGTTACAA-3' and reverse 5'-GCTTGATAGCCTCCAGCAAC-3'; for mouse COX-1: forward 5'-ACTCAGCGCATGACTACATC-3' and reverse 5'-CTTCTCAGCAGCAGCTGTTG-3'; for mouse COX-2: forward 5'-GAACATGGACTCACTCAGTTTGTG-3' and reverse 5'-CAAAGATAGCATCTGGACGAGGT-3'; for mouse cyclophilin A: forward 5'-CCGATGACGAGCCCTTGG-3' and reverse 5'-GCCGCCAGTGCCATTATG-3'. PCR products were purified, sequenced and confirmed to be the genes of interest.

Statistical Analysis. In every case, *n* refers to the number of animals used in each protocol. Continuous variables are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Half-maximum effective concentration (EC₅₀) of ACh was measured from individual concentration-response curves only when a maximal response was obtained. The *pD*₂ value, the negative log of the EC₅₀, was obtained. At the end of the protocol, the maximal diameter (*D*_{max}) was determined by changing the PSS to a Ca²⁺-free PSS containing sodium nitroprusside (SNP: 10 μ mol/L) and EGTA (ethylene glycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 1 mmol/L). Myogenic tone was measured at 100 mm Hg and expressed as percentage of the *D*_{max}. Acetylcholine-induced dilation is expressed as a percentage of the *D*_{max}. ANOVA studies followed by a Scheffé's *F* test were performed to compare *E*_{max} and *pD*₂ of dose-response curves as well for adhesion and qPCR studies. Unpaired *t*-tests were performed for flow cytometry studies. Differences were considered to be statistically significant for a *P* value < .05.

Drugs. ACh, phenylephrine, L-NNA, INDO, SNP and EGTA were purchased from Sigma (St-Louis, MO, USA). All drugs were prepared daily and diluted in Ultrapure water, except for INDO which was prepared in ethanol. All drugs were then directly inserted in the bath chamber and the final concentrations of ethanol never exceeded 0.1%.

Results

Baseline vascular parameters. As shown in Table 1, myogenic tone and phenylephrine-induced precontraction levels tend to be minimally affected by aging or catechin therapies. However, because of the limited number of mouse available and the high variability, it is difficult to say that there is clearly no difference between groups. At 12 months, INDO did not reduce the myogenic tone increased by L-NNA: only 3 months treatment with catechin restored the functional inhibitory effect of INDO.

Age and catechin-dependent change in vascular sensitivity and maximal dilation. Vascular sensitivity (pD_2) and maximal dilation (E_{max}) to ACh were lower ($P<.05$) at 12-m/o than at 3-m/o (Table 2 and Fig. 1B). Late (3 months) and early (9 months) treatments with catechin maintained E_{max} . Only the late treatment however, maintained ($P<.05$) the vascular sensitivity to ACh comparable to that measured at 3 months. Addition of L-NNA decreased ($P<.05$) the sensitivity to ACh in vessels isolated from 3- and 12-m/o mice (Table 2 and Fig. 2A). L-NNA reduced the E_{max} at 3-m/o (Table 2) but not further at 12-m/o (Fig. 2A). In vessels isolated from catechin-treated mice, L-NNA did not limit the E_{max} to ACh (Fig. 2B and C). Combining INDO to L-NNA further reduced the E_{max} in 12-m/o (Fig. 2A) but not in 3-m/o mice (Table 2). Interestingly, both early and late therapies prevented INDO-induced impaired dilation to ACh (Fig. 2B and C). Only the late treatment however maintained the vascular sensitivity to ACh equal to the control conditions measured at 3 months of age (Table 2 and Fig. 2B).

Splenocyte adhesion onto the endothelium. Splenocyte adhesion onto the endothelium increased significantly in 12-m/o mice (207 ± 16 splenocytes/ mm^2) compared to 3-m/o mice (127 ± 10) (Fig. 3A). To determine whether the endothelium and/or the splenocytes were dysfunctional, we first performed a crossover study in which the endothelium of 3-m/o mice was exposed to splenocytes of 12-m/o mice and *vice-versa*: in both cases adhesiveness was increased (Fig. 3A).

Effect of catechin on splenocyte adhesion onto the endothelium. Catechin prevented ($P<.05$) the rise of splenocyte adhesion irrespectively of the duration of the treatment (Fig. 3B). This rise of splenocyte adhesion with aging and its prevention by catechin was also shown by confocal microscopy using CD45 and VE-cadherin to visualize splenocytes and endothelial cells, respectively (Fig. 4).

Stimulation of the endothelium with histamine increased significantly adhesion in 3-m/o mice from 127 ± 10 to 228 ± 13 splenocyte/mm², a level similar to that measured in 12-m/o mice in basal conditions confirming the activated state of the endothelium. Histamine however, did not further increase splenocyte adhesion at 12 months when compared to baseline. Only the late catechin treatment prevented significantly histamine-induced adhesion of the splenocytes.

Effect of catechin on expression of splenocyte cell adhesion molecules. Aging is associated with a significant upregulation of splenocyte CD18 expression and shedding of CD62L and PSGL-1 (Fig. 3C). Interestingly, only the late catechin regimen completely prevented these changes.

Expression of P-selectin and ICAM-1 on the endothelium. To confirm the activated state of the endothelium with aging and its modulation by catechin, we performed a confocal microscopy assessment of endothelial P-selectin and ICAM-1 expression. Figure 5 shows that both P-selectin and ICAM-1 were increased at 12 months in comparison with 3-m/o mice. This increase of endothelial cell adhesion molecules was prevented by both late and early catechin therapy. In contrast, histamine stimulated the increase in endothelial expression of P-selectin and ICAM-1 in both 3- and 12-m/o mice and treatments with catechin had no impact.

Quantification of gene expression of eNOS, COX-1/-2, p22^{phox}, MnSOD and SIRT-1 in mouse aorta. Expression of eNOS and SIRT-1 were decreased ($P<.05$) in 12- when compared to 3-m/o mice (Fig. 6A, D). In contrast, aging was associated with a 2-fold increase in COX-2 expression ($P<.05$; Fig. 6C) without any changes in COX-1, p22^{phox} and MnSOD expression (Fig. 6B, E, F). The late catechin treatment only prevented the

age-dependent rise in COX-2 expression and the decline in SIRT-1 expression. In contrast, early treatment increased by more than a 100 times COX-2 expression, enhanced significantly mRNA expression of the free radical producing enzymes eNOS and p22^{phox}, while it decreased significantly expression of the free radical inactivating enzyme MnSOD. Finally, the expression of the polyphenol-sensitive longevity gene SIRT-1 was only increased by the early treatment with catechin.

Discussion

In the present study, we show that endothelial function is dependent on a tightly regulated redox environment. We demonstrate that a late but short antioxidant treatment with the polyphenol catechin is more efficient than an early treatment, even though efficacious, in preventing endothelial dysfunction associated with aging. This is highlighted by a better endothelial dilatory sensitivity to ACh, a reduced adhesion of splenocytes onto the endothelium, an improved expression profile of both splenocytes and endothelial cell adhesion molecules, and finally by the maintenance of all but one vascular-related gene expression, eNOS. Thus, a physiological redox-sensitive maturation process permits a beneficial response to the antioxidant therapy initiated after this maturation phase, suggesting that the biological age of the cardiovascular system greatly impacts on the therapeutic response.

At 12-m/o, we observed that vascular sensitivity and maximal dilation to ACh are reduced when compared to 3-m/o mice. This age-dependent decline in the endothelial function is in accordance with our previous work and the literature (5, 11, 20). This could be explained by the decreased expression of eNOS at 12 months, but this is argued by the demonstration that the late 3-month catechin treatment fully prevented age-related endothelial dysfunction without restoring eNOS expression. An alternative mechanism may occur as highlighted in Figure 2 showing that at 12-m/o, pharmacological inhibition of NOS and COX activities strongly limits dilation. These effects were however lost following catechin treatment, suggesting that another endothelial dilatory pathway is activated, most likely the EDHF. This observation does not utterly mean that NO and PGI₂ production is lost, but most likely that the efficacy and/or production of the EDHF is increased by catechin therapies and compensates. Others and our group previously proposed that the EDHF is sensitive to catechin (12, 27) suggesting that this pathway may be inactivated by free radicals. We previously reported that, although lipid peroxidation is present during aging, renal vasodilation is insensitive to acute antioxidant treatment with N-acetyl-L-cystein (NAC) (11). Hence, baseline free radical production is not sufficient to limit the dilatory effects of NO at 12 months (11). The most efficient treatment period is during the last 3 months and

suggests that it permits to reveal the maximal efficacy of the EDHF pathway, likely expressed during the maturation phase, as previously reported (20). This is also supported by the fact that endothelial dysfunction develops around the age of 9 months (11, 20), which may explain the greater efficacy of the late 3-month therapy.

The myogenic tone was also affected by age and catechin upon NOS and COX inhibition. At 12-m/o, COX inhibition no longer prevented the rise in myogenic tone associated with NOS inhibition. Only the late 3-month treatment restored the inhibitory effect of INDO. We previously reported that COX-2 mRNA expression increased as early as at 6-m/o (12). In addition, catechin therapy initiated at 3 months increased COX-2 further as well as myogenic tone (12), an effect that is conserved in 9-months treated mice. Hence, catechin treatment during maturation reveals the expression of a constricting pathway regulating myogenic tone, most likely prostanoids but not TXA_2 (12).

The capacity of the endothelium to limit leukocyte adhesion is also weakened with aging. Our data show that both the endothelium and the splenocytes are prone to adhesion at 12 months of age. Once again, the shortest and latest treatment paradigm proved to be the most efficient in preventing the increase in splenocyte-endothelium interactions with aging. This late treatment also prevented the age-dependent increase in CD18 expression and shedding of CD62L and PSGL-1, which suggests a normalization of splenocyte function. The early treatment did not normalize completely splenocyte adhesion molecule expression. Indeed, it is well established that the expression of cell adhesion molecules increases with raised free radical production and is sensitive to an antioxidant therapy (7, 14, 25, 34), but the duration of such therapy may influence considerably the outcome. We previously demonstrated that 3-month catechin treatment can prevent TXA_2 and free radical production from the renal artery of 6-m/o mice (12), suggesting that the beneficial effect of catechin on expression of cell adhesion molecules may imply a regulation of the redox state. Moreover, endothelial P-selectin and ICAM-1 expression increased with age which was prevented by both catechin regimens. This suggests that an antioxidant therapy may differentially regulate splenocyte and

endothelial cell functions. This clearly highlights the complexity of interfering with the redox environment of the cardiovascular system.

The effectiveness of late antioxidant therapy is further demonstrated by the expression profile of various genes involved in the pathways that regulate vascular tone and the redox environment. We previously reported that aging was associated with a reduction in eNOS and an augmentation in COX-2 expression (11). The treatment that best preserved endothelial function, the late protocol, had no impact on eNOS expression but prevented the rise in COX-2. This clearly indicates that the preservation of endothelial function may be independent of eNOS, since the 9-month treatment protocol strongly increased eNOS without providing greater dilatory benefit. It is striking that late therapy preserved endothelial function and normalized splenocyte function without affecting eNOS, while more than doubling eNOS expression with 9-month treatment paradigm did not. The crucial role of eNOS as a regulator of the vascular tone is therefore questionable. Collectively, these results suggest that a non-NO/ non-PGI₂ endothelium-derived factor benefits from this antioxidant therapy. The eNOS independent effect of the 9-month treatment may be explained by the fact that polyphenol antioxidant therapy, during maturation (up to 9-m/o), perturbed the natural course of gene expression. We propose that during this phase, eNOS functions as a host-defense mechanism, as previously hypothesized (29), and the reducing environment created by catechin, as demonstrated by the decrease in MnSOD expression (37, 41-43), led to a compensatory upregulation of eNOS expression. This hypothesis is supported by the upregulation of the p22^{phox}, a subunit of the NADP(H) oxidase, which functions as a protector against pathogens (4, 22).

Finally, we report that SIRT-1 expression, a NAD⁺ dependent histone deacetylase linked to life span extension and stress resistance (13), decreases with normal aging. It has been previously shown that SIRT-1 is sensitive to oxidative stress. Cohen *et al.* showed that caloric restriction, which reduces metabolism and free radical production, increases survival *via* SIRT-1 (8). In the present study, we demonstrate that chronic exposure to catechin during the maturation period of the mouse increases SIRT-1 gene expression. Although the increase in SIRT-1 expression had to be expected and

used in this study as a marker of the polyphenol response (15, 18, 40), it is striking that SIRT-1 expression increases only if the treatment is initiated at 3 months of age. It will be important to study the longevity of these mice compared to that of animals treated with catechin from the age of 9 months. This study would be informative considering that resveratrol has been shown to protect mice on a high fat diet starting at 12 months of age (2).

To conclude, our results reveal that the age-dependent changes in endothelial function were best prevented by a late, post-maturation, catechin therapy. This was associated with maintenance of endothelial dilatory function, a reduced adhesiveness of splenocytes onto the endothelium, an improved expression profile of both splenocytes and endothelial cell adhesion molecules, and maintenance of most vascular-related gene expression tested. This highlights the importance of a tightly regulated redox environment to provide an adequate development/maturation. This essential maturation process contributes to the beneficial effects of the late-catechin regimen by preventing endothelial dysfunction associated with natural aging.

Acknowledgements

This work has been supported in part by the Foundation of the Montreal Heart Institute, the Heart and Stroke Foundation of Quebec, and the Canadian Institute for Health Research (MOP 14496). ME Gendron is supported by a scholarship from the Canadian Institute for Health Research

References

1. Arts IC, and Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin N* 81: 317S-325S, 2005.
2. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, and Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444: 337-342, 2006.
3. Baur JA, and Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Rev* 5: 493-506, 2006.
4. Bedard K, and Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245-313, 2007.
5. Brandes RP, Fleming I, and Busse R. Endothelial aging. *Cardiovasc Res* 66: 286-294, 2005.
6. Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res* 68: 26-36, 2005.
7. Chen WC, Hayakawa S, Shimizu K, Chien CT, and Lai MK. Catechins prevents substance P-induced hyperactive bladder in rats via the downregulation of ICAM and ROS. *Neurosc Lett* 367: 213-217, 2004.
8. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, and Sinclair DA. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305: 390-392, 2004.
9. Crespy V, and Williamson G. A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *J Nutr* 134: 3431S-3440S, 2004.

10. Drouin A, Thorin-Trescases N, Hamel E, Falck JR, and Thorin E. Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H₂O₂ production in mouse cerebral arteries. *Cardiovasc Res* 73: 73-81, 2007.
11. Gendron ME, Thorin-Trescases N, Villeneuve L, and Thorin E. Aging associated with mild dyslipidemia reveals that COX-2 preserves dilation despite endothelial dysfunction. *Am J Physiol* 292: H451-458, 2007.
12. Gendron ME, and Thorin E. A change in the redox environment and thromboxane A₂ production precede endothelial dysfunction in mice. *Am J Physiol* (In press).
13. Guarente L, and Picard F. Calorie restriction--the SIR2 connection. *Cell* 120: 473-482, 2005.
14. Handa O, Naito Y, Takagi T, Ishikawa T, Ueda M, Matsumoto N, Kokura S, Ichikawa H, Yoshida N, Shimoi K, and Yoshikawa T. Inhibitory effects of catechins on neutrophil-dependent gastric inflammation. *Redox Rep* 7: 324-328, 2002.
15. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, and Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425: 191-196, 2003.
16. Hu JP, Calomme M, Lasure A, De Bruyne T, Pieters L, Vlietinck A, and Vanden Berghe DA. Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. *Biol trace elem Res* 47: 327-331, 1995.
17. Ignarro LJ, and Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annual rev Pharmacol Tox* 25: 171-191, 1985.

18. Kaeberlein M, McDonagh T, Heltweg B, Hixon J, Westman EA, Caldwell SD, Napper A, Curtis R, DiStefano PS, Fields S, Bedalov A, and Kennedy BK. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem* 280: 17038-17045, 2005.
19. Keyse SM, and Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 99-103, 1989.
20. Krummen S, Drouin A, Gendron ME, Falck JR, and Thorin E. ROS-sensitive cytochrome P450 activity maintains endothelial dilatation in ageing but is transitory in dyslipidaemic mice. *Br J Pharmacol* 147: 897-904, 2006.
21. Leeuwenburgh C, and Judge S. Cardiac Mitochondrial Bioenergetics, Oxidative Stress and Aging. *Am J Physiol Cell Physiol* (In press).
22. Leto TL, and Geiszt M. Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. *Antiox Redox Signal* 8: 1549-1561, 2006.
23. Linnane AW, and Eastwood H. Cellular redox regulation and prooxidant signaling systems: a new perspective on the free radical theory of aging. *Annals NY Acad Sci* 1067: 47-55, 2006.
24. Liu Q, Xie F, Rolston R, Moreira PI, Nunomura A, Zhu X, Smith MA, and Perry G. Prevention and treatment of Alzheimer disease and aging: antioxidants. *Mini rev Med Chem* 7: 171-180, 2007.
25. Ludwig A, Lorenz M, Grimbo N, Steinle F, Meiners S, Bartsch C, Stangl K, Baumann G, and Stangl V. The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 659-665, 2004.
26. Mittal CK, and Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 4360-4364, 1977.

27. Ndiaye M, Chataigneau T, Andriantsitohaina R, Stoclet JC, and Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 371-377, 2003.
28. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, and van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74: 418-425, 2001.
29. Rabelink TJ, and Luscher TF. Endothelial nitric oxide synthase: host defense enzyme of the endothelium? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 267-271, 2006.
30. Radomski MW, Palmer RM, and Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 92: 639-646, 1987.
31. Robak J, and Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 37: 837-841, 1988.
32. Roth S, and Droge W. Regulation of interleukin 2 production, interleukin 2 mRNA expression and intracellular glutathione levels in ex vivo derived T lymphocytes by lactate. *Eur J Immunol* 21: 1933-1937, 1991.
33. Roy S, Sen CK, and Packer L. Determination of cell-cell adhesion in response to oxidants and antioxidants. *Methods Enz* 300: 395-401, 1999.
34. Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, and Parsons JT. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5192-5196, 1992.
35. Sellak H, Franzini E, Hakim J, and Pasquier C. Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood* 83: 2669-2677, 1994.

36. Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, and Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol* 500: 299-313, 2004.
37. Tong XK, Nicolakakis N, Kocharyan A, and Hamel E. Vascular remodeling versus amyloid beta-induced oxidative stress in the cerebrovascular dysfunctions associated with Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25: 11165-11174, 2005.
38. White AA, Crawford KM, Patt CS, and Lad PJ. Activation of soluble guanylate cyclase from rat lung by incubation or by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 251: 7304-7312, 1976.
39. Winyard PG, Moody CJ, and Jacob C. Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem Sci* 30: 453-461, 2005.
40. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, and Sinclair D. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430: 686-689, 2004.
41. Xie D, Liu G, Zhu G, Wu W, and Ge S. (-)-Epigallocatechin-3-gallate protects cultured spiral ganglion cells from H₂O₂-induced oxidizing damage. *Acta oto-laryngol* 124: 464-470, 2004.
42. Zaslaver M, Offer S, Kerem Z, Stark AH, Weller JI, Eliraz A, and Madar Z. Natural compounds derived from foods modulate nitric oxide production and oxidative status in epithelial lung cells. *J Agr Food Chem* 53: 9934-9939, 2005.
43. Zhang W, Hashimoto K, Yu GY, and Sakagami H. Decline of superoxide dismutase activity during antioxidant-induced apoptosis in HL-60 cells. *Anticancer Res* 22: 219-224, 2002.

Figure legends

Figure 1. Schematic representation of the different treatment protocols (A). Acetylcholine-induced dilation of renal arteries isolated from 3- and 12-m/o mice treated with catechin for 3 (late) and 9 (early) months (B). Data are mean±SEM. N = 7-13. Maximal dilation *: P<.05 compared to all groups; pD₂ †: P<.05 compared to 12-m/o.

Figure 2. Acetylcholine-induced dilation of renal arteries isolated from 12-m/o (A), 12-m/o + CAT 3 (B), 12-m/o + CAT 9 (C) mice. Responses were obtained either in control conditions or in the presence of NOS inhibition (L-NNA, 10 μM) alone or combined with the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (L-NNA + INDO, 10 μM). Data are mean±SEM. N = 5-13. Maximal dilation *: P<.05 compared to control condition; pD₂ †: P<.05 compared to control condition.

Figure 3. Splenocyte adhesion on the native or non-native endothelium of aortic segments isolated from 3- and 12-m/o mice. Responses were obtained in basal (without any stimulation) conditions. Data are mean±SEM. N = 4-29. *: P<.05 compared to 3-m/o (A). Splenocyte adhesion on the native endothelium of aortic segments isolated from 3-m/o, 12-m/o, 12-m/o + CAT 3 and 12-m/o + CAT 9 mice. Responses were obtained either in basal conditions (baseline) or following stimulation of the endothelium with histamine (0.1 μM). Data are mean±SEM. N = 5-29. *: P<.05 compared to 3-m/o; †: P<.05 compared to 12-m/o; ‡: P<.05 compared to baseline (B). Expression of cell adhesion molecules on the surface of splenocytes isolated from 3-m/o, 12-m/o, 12-m/o + CAT 3 and 12-m/o + CAT 9 mice measured by flow cytometry. Data are mean±SEM. N = 9-18. *: P<.05 compared to 3-m/o (C).

Figure 4. Immunofluorescence from aortic segments exposed to splenocytes. Dual immunostaining for VE-Cadherin (blue) and CD45 expression (green) in 3-m/o (A), 12-m/o (B) and 12-m/o + CAT 3 (C) mice. Arrows indicate CD45-labelled splenocytes. N = 3.

Figure 5. Immunofluorescence from aortic segments illustrating P-selectin or ICAM-1 expression (red) in 3-m/o, 12-m/o, 12-m/o + CAT 3 and 12-m/o + CAT 9 mice. Fluorescence was also observed under basal condition (baseline) and following stimulation of the endothelium with histamine. Blue fluorescence represents VE-Cadherin expression. N = 3.

Figure 6. Gene expression from total RNA isolated from the aorta of 3-m/o, 12-m/o, 12-m/o + CAT 3 and 12-m/o + CAT 9 mice. Gene expression of eNOS (A), COX-1 (B), COX-2 (C), SIRT-1 (D) p22 phox (E) and MnSOD (F) was measured by qPCR. Data are mean \pm SEM. N = 3-5. *: P<.05 compared to 3-m/o; †: P<.05 compared to 12-m/o.

Table 1. Levels of myogenic tone and phenylephrine-induced precontraction of renal arteries isolated from 3-m/o and 12-m/o mice treated or not with catechin for 3 or 9 months.

Conditions	Parameters		
	Myogenic tone	PE precontraction	n
3-m/o control	19±4	64±6	7
+ L-NNA	33±6	74±3	5
+ INDO + L-NNA	11±6	74±5	7
12-m/o control	29±7	55±3	12
+ L-NNA	47±7	70±2*	10
+ INDO + L-NNA	44±4†	63±4	12
12-m/o + CAT 3 months control	37±8	51±3	13
+ L-NNA	52±7	65±2*	10
+ INDO + L-NNA	25±4‡	50±5	9
12-m/o + CAT 9 months control	14±8	52±3	8
+ L-NNA	27±10	59±3‡	7
+ INDO + L-NNA	42±6*§	45±2‡	5

CAT n months: number of month mice were chronically treated with catechin in drinking water. Data are mean±SEM *: P<.05 compared to Control condition; †: P<.05 compared to 3-m/o; ‡: P<.05 compared to 12-m/o; §: P<.05 compared to 12-m/o + CAT 3.

Table 2. Vascular sensitivity (pD_2) and maximal dilation (E_{max}) of isolated mouse renal arteries.

Conditions	Control			L-NNA (10 μ M)			L-NNA + INDO (10 μ M)		
	pD_2	E_{max}	n	pD_2	E_{max}	n	pD_2	E_{max}	n
3-m/o	6.7 \pm 0.1	90 \pm 5	7	5.8 \pm 0.1*	68 \pm 4*	5	5.9 \pm 0.1*	67 \pm 5*	7
12-m/o	6.3 \pm 0.1‡	64 \pm 10‡	7	5.8 \pm 0.1*	59 \pm 10	5	5.9 \pm 0.3*	27 \pm 8*‡	6
+ CAT 3	6.6 \pm 0.1†	87 \pm 3†	11	6.6 \pm 0.2†‡	75 \pm 5	9	6.6 \pm 0.1†‡	88 \pm 2†‡	9
+ CAT 9	6.2 \pm 0.1‡	86 \pm 4†	8	6.3 \pm 0.1†‡	81 \pm 5	7	6.0 \pm 0.1	88 \pm 2†‡	5

CAT n: number of months mice were chronically treated with catechin in drinking water. Data are mean \pm SEM *: P<.05 compared to Control condition; †: P<.05 compared to 12-m/o; ‡: P<.05 compared to 3-m/o.

Figure 1.

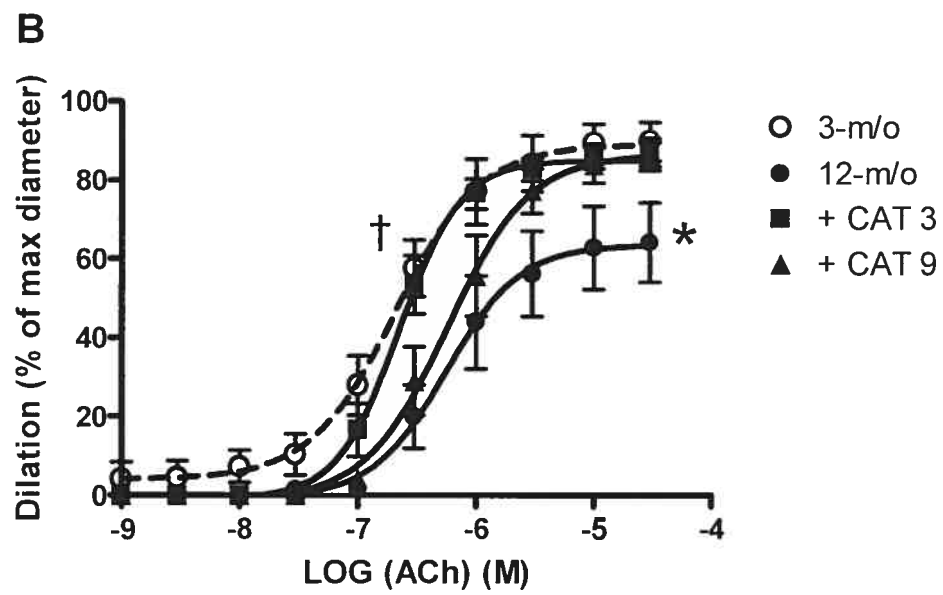
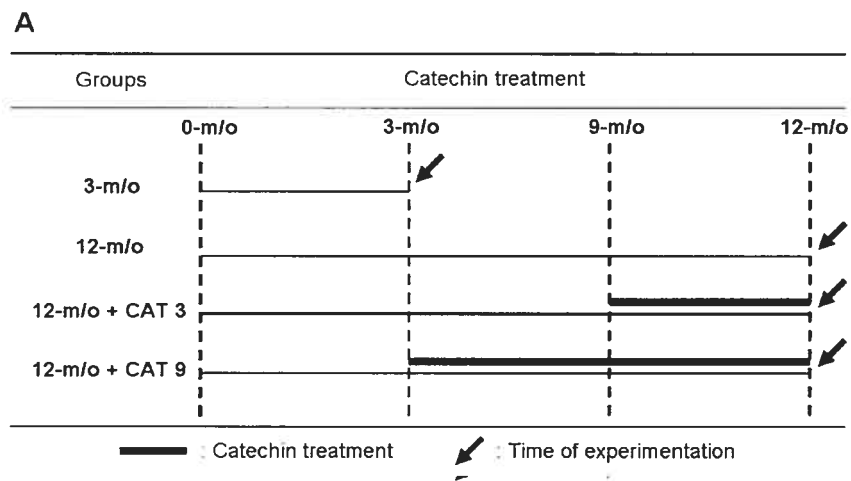


Figure 2.

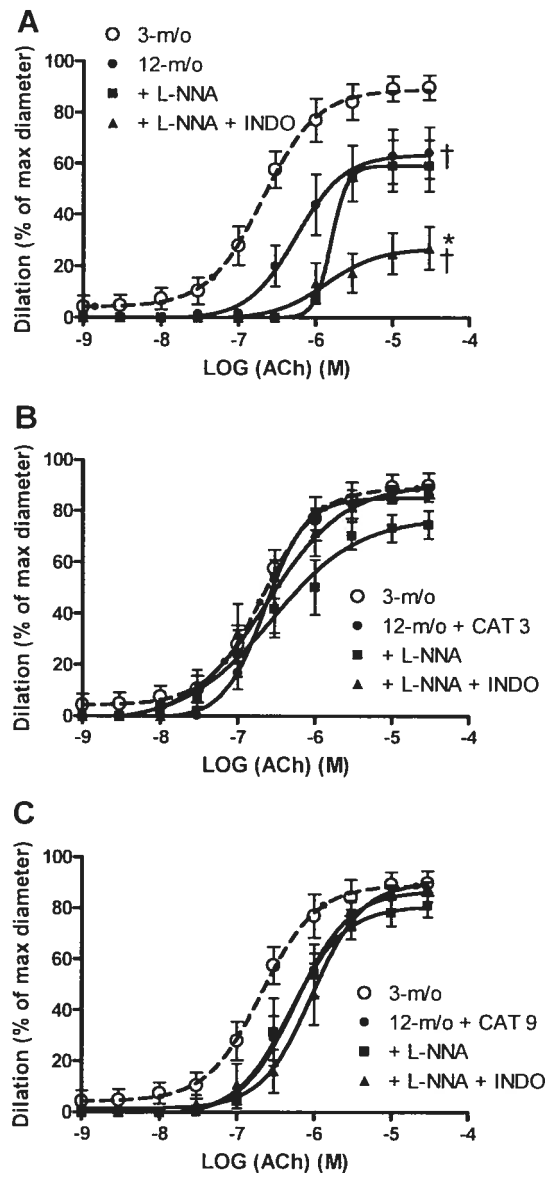


Figure 3.

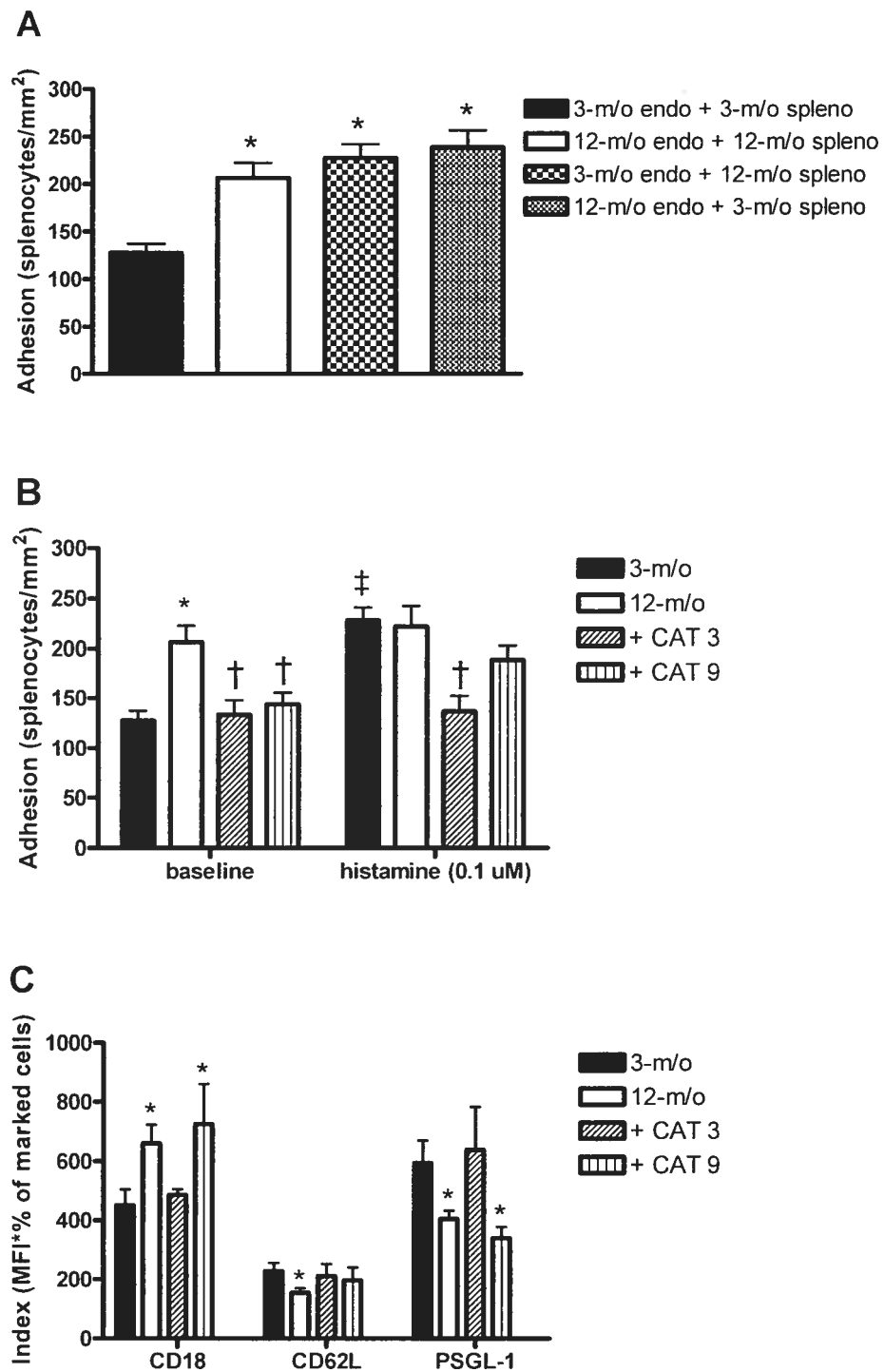


Figure 4.

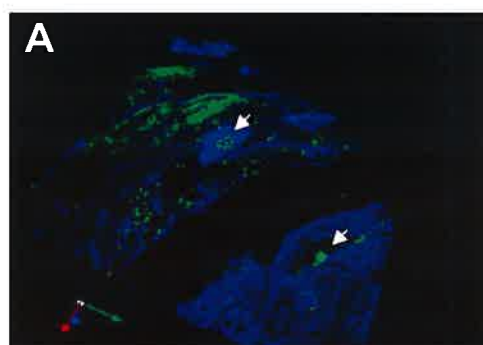
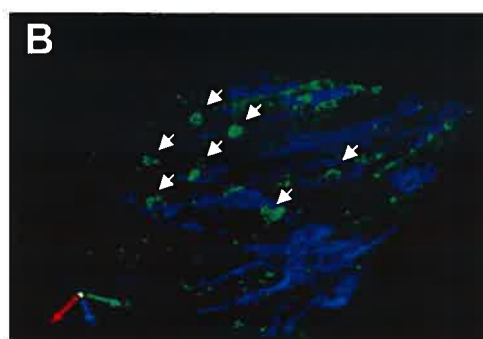
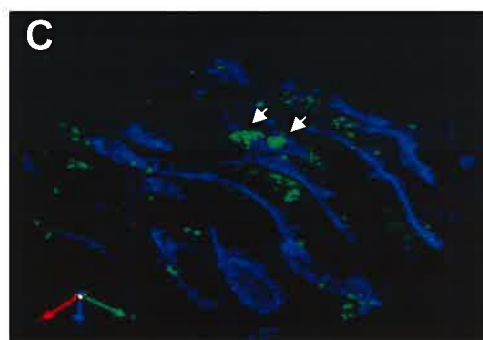
**3-m/o****12-m/o****+ CAT 3**

Figure 5.

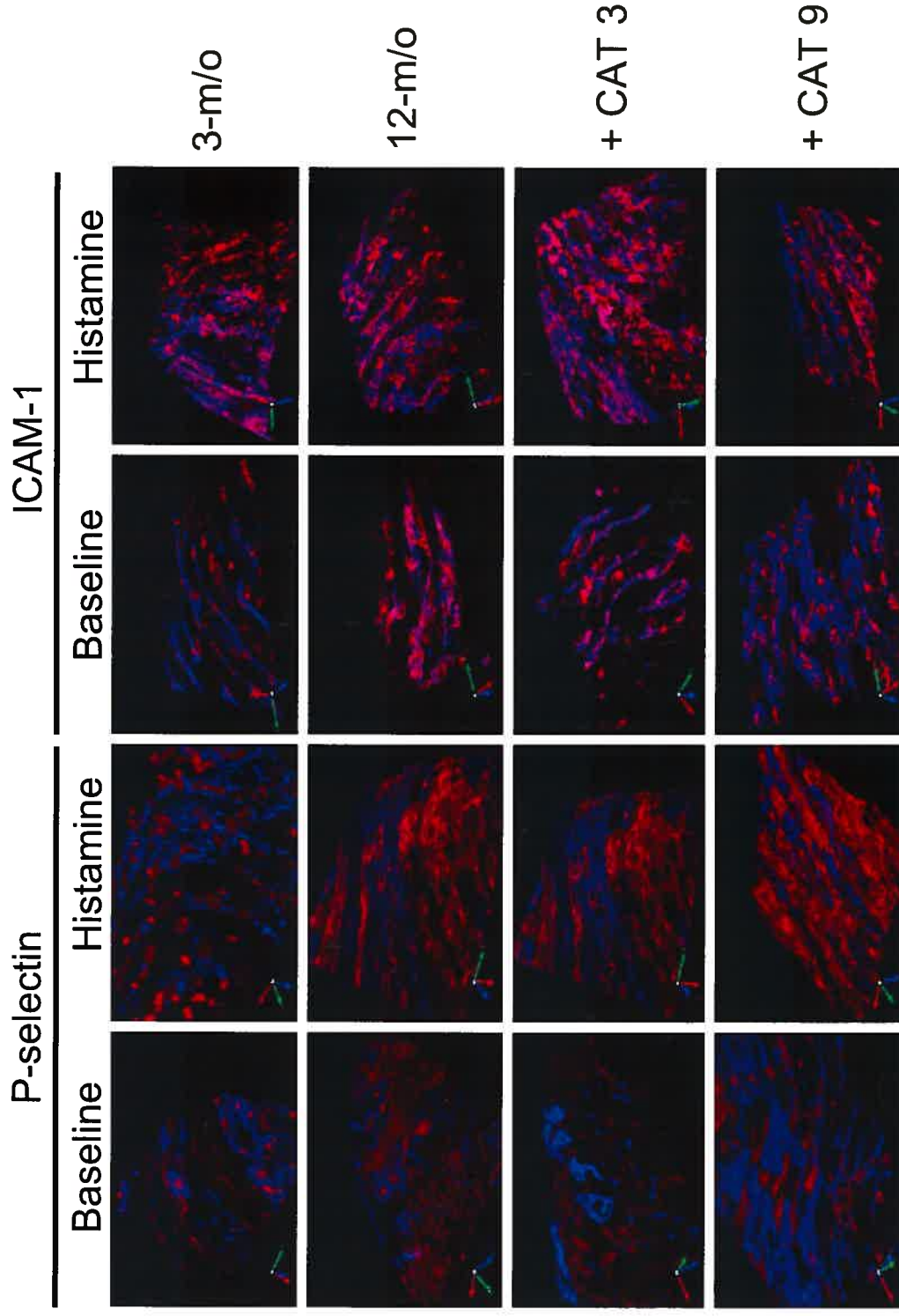
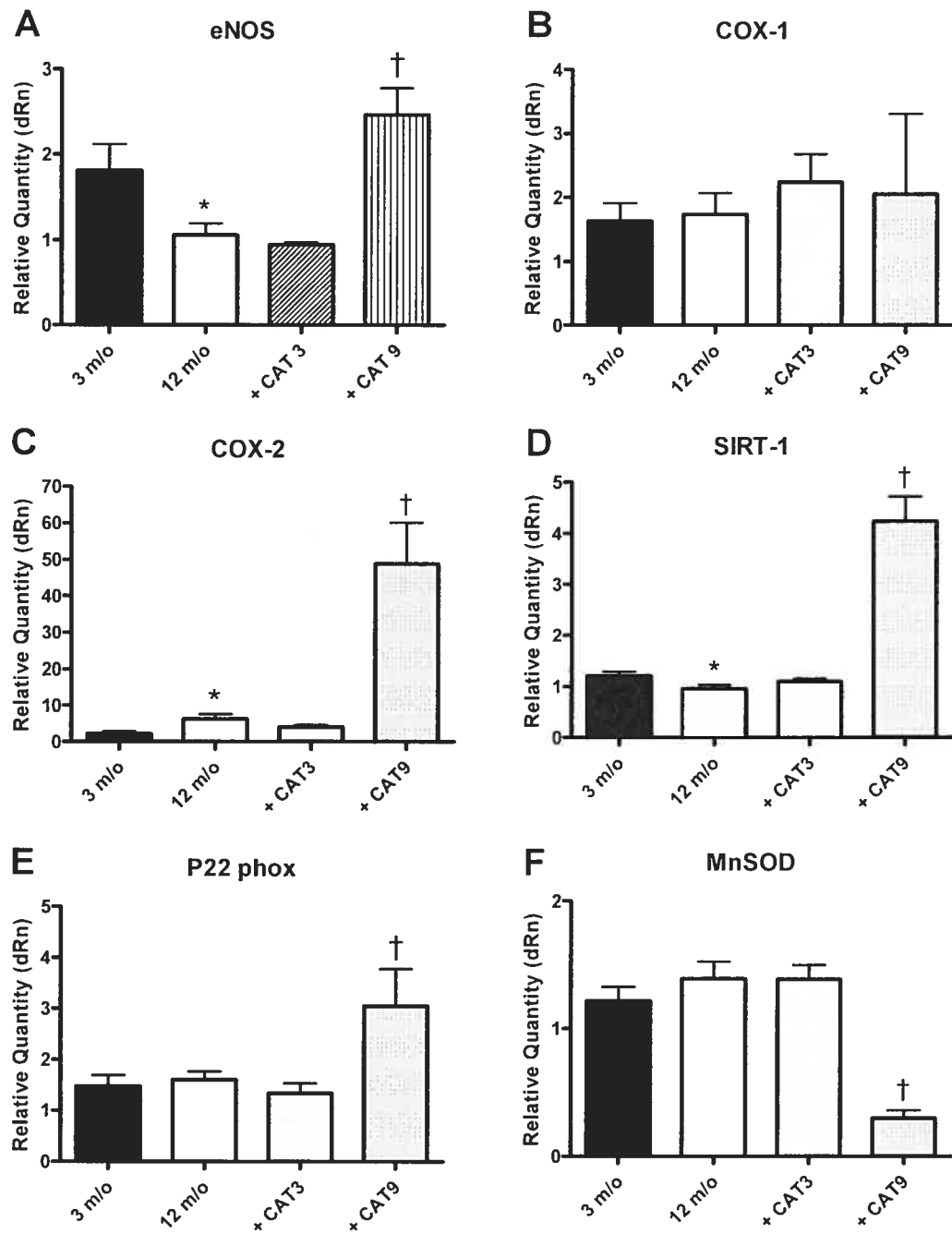


Figure 6.



Étude #4

Apport original et contribution des co-auteurs:

La contribution du premier auteur, Marie-Eve Gendron, est majeure puisqu'elle a participé à toutes les expérimentations et à la rédaction du manuscrit. Dr Jean-François Théorêt a participé aux études de cytométrie en flux. Madame Aida M. Mamarbachi a contribué aux études de qPCR. Dr Yahye Merhi a contribué à la supervision de l'étude et à la révision du manuscrit. Dr Éric Thorin a supervisé l'étude et contribué à la rédaction/révision du manuscrit.

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Marie-Eve Gendron

3-525-1-0 Ph. D. Physiologie

2. Description de l'article

Marie-Ève Gendron, JF Théoret, AM Mamarbachi, Y Merhi, E Thorin. Deleterious effect of curative therapy by catechin in aging atherosclerotic mice. ATVB 2007

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-Eve Gendron inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre « *Influence de l'âge sur la fonction vasculaire en condition pro-athérosclérotique : Impact de l'environnement redox* ».

MARIE-EVE GENDRON

Coauteur

25/09/07

Date

Jean-François Théoret

Coauteur

2007-09-13

Date

AIDA M. MAMARBAGHI

Coauteur

24 Sep 2007

Date

Yahye Merhi

Coauteur

24-9-07

Date

ERIC THORIN

Coauteur

25. IX. 2007

Date

Deleterious effects of curative catechin treatment on the vascular function of atherosclerotic mice

Marie-Ève Gendron*, Jean-François Théorêt, Aida M. Mamarbachi, Yahye Merhi & Eric Thorin†§

*Department of Physiology and †Department of Surgery, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal Heart Institute, Research center, 5000, Belanger street, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8.

Running title: polyphenols and atherosclerosis

§ To whom correspondence should be addressed:

Institut de Cardiologie de Montréal, centre de recherche, 5000 rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330; fax.: (514) 376-1355; Email: eric.thorin@umontreal.ca

Word of body: 4541 words

Word count of abstract: 196 words

Total number of figures and tables: 6

Abstract

Objective. Atherosclerosis, as a chronic disease, is associated with inflammatory and oxidative damages involving the endothelium and the leukocytes. Antioxidants however have failed to provide clinical benefit, arguing against a deleterious impact of the free radicals in aging atherosclerotic patients.

Methods and Results. To test this hypothesis, we treated LDLr^{-/-}; hApoB^{+/+} atherosclerotic mice with the polyphenol catechin for the last 3 (secondary) or 9 months (primary prevention) prior study at 12-m/o. Plaque formation on the aorta, dilations of isolated renal arteries to acetylcholine (ACh), splenocyte adhesion and vascular gene expression were quantified. Plaque formation was reduced by primary but not secondary prevention. Maximal dilation (E_{max}) and vascular sensitivity (pD_2) to ACh were decreased by atherosclerosis. Early catechin significantly improved E_{max} while late therapy decreased pD_2 . The increase in splenocyte adhesion observed at 12-m/o was exacerbated by the secondary prevention which promoted CD62L shedding. Finally, only an early treatment increased eNOS mRNA expression and prevented the rise in p22^{phox} expression.

Conclusion. Our data suggest that antioxidant secondary prevention is deleterious in atherosclerosis, as it does not prevent plaque formation, reduces dilatory sensitivity and promotes adhesion. This is in contrast with the vasculoprotection afforded by the primary prevention.

Condensed abstract (word count: 49 words)

We studied the impact of primary and secondary antioxidant prevention on vascular function of atherosclerotic mice. We show that late therapy is deleterious as it does not prevent plaque formation, reduces dilatory sensitivity and promotes adhesion. This is in contrast with the vasculoprotection afforded by an early primary prevention.

Key words: atherosclerosis, endothelium, splenocyte, catechin, atherosclerotic lesion

Introduction

Endothelial dysfunction and inflammation are hallmarks of atherosclerosis. Risk factors for cardiovascular diseases (CVD) including aging, promote endothelial damages leading to inflammation and an excess production of reactive oxygen species (ROS). The known consequences are an increased adhesiveness of the leukocytes onto the endothelium and a reduced vasodilatory function accompanied by an augmented vascular production of vasoconstricting factors. All these changes support the development of atherosclerotic lesions. According to the oxidative modification hypothesis of atherosclerosis, the oxidation of LDL by ROS is an early event that contributes to atherogenesis¹. Furthermore, it has been shown that oxidative stress contributes directly to the development of the endothelial dysfunction¹.

Polyphenols, such as catechin, are abundant in fruits, vegetables, green tea and red wine. It has been shown that polyphenols can increase efficacy and/or production of endothelium-derived relaxing factors², improve efficacy of endogenous antioxidants and act as direct ROS scavengers³⁻⁵. We previously showed that a chronic catechin treatment can prevent the release of thromboxane A₂-induced ROS production⁶. Beneficial effects of polyphenols have been reported in cardiovascular diseases, stroke and cancer (see ref.⁷ for review), but contrasting results have been obtained in animal models of atherosclerosis⁸⁻¹⁵. These discrepancies may be due to different experimental conditions, including the dose of polyphenol tested, the stage of the lesions studied and the duration of the therapy. Most importantly, antioxidant therapies have failed to show benefit in clinical trials¹⁶. Failure of antioxidants in humans may be partly due to the fact that antioxidant therapies are initiated after atherosclerosis is already well established, in contrast to animal protocols where therapies are preventive and initiated in young animals.

This difference may be crucial since we have demonstrated that the endothelial dilatory pathways evolve during maturation in mice^{6, 17} and that risk factors for CVD accelerate this maturation process¹⁷ through a redox-sensitive pathway⁶. The objective of this study was therefore to test the hypothesis that while primary prevention therapy is beneficial, an antioxidant treatment initiated after established atherosclerosis brings no global vascular protection.

Material and methods

Experimental groups

All experiments were performed using transgenic atherosclerotic (ATX) male mice. The ATX mice were knockout for the LDL receptor and expressed the human apolipoprotein B-100 (LDLr^{-/-}; hApoB^{+/+}). This transgenic mouse model was kindly provided by Dr Hobbs (University of Texas Southwestern, Dallas, TX)¹⁸. Mice were randomly assigned to the following 3 groups: treatment with the antioxidant polyphenol catechin (30 mg/kg/day)⁶ in the drinking water from 3 to 12 months (CAT 9; preventive therapy), 9 to 12 months (CAT 3; curative therapy) or no treatment (control). At 12 months, renal arteries were harvested and used for vascular reactivity studies, the aorta was either snap frozen for total RNA extraction or freshly prepared for the splenocytes adhesion studies and the spleen was used for splenocytes isolation. The procedures and protocols were performed in accordance with our institutional guidelines and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* of Canada.

Plaque quantification

Aortas were isolated and cleaned from surrounding fat and connective tissues. Aortas were cut longitudinally and fixed gently in a Petri dish, endothelium faced up. The complete aorta was pictured and plaque area was measured using Adobe Photoshop 7.0. Data are expressed in percentage of total aortic area.

Vascular reactivity studies

Experiments were conducted in isolated and pressurized (100 mm Hg) mouse renal arteries as previously described¹⁷. Arterial segments were pre-constricted with phenylephrine (PE: 30 µmol/L) and concentration-response curves to acetylcholine (ACh: 0.001 µmol/L - 30 µmol/L) were constructed. Inhibition of NO and prostanoids production was achieved by

addition in the bath of L-NNA (10 $\mu\text{mol/L}$) and indomethacin (INDO: 10 $\mu\text{mol/L}$), respectively. Only one concentration-response curve was performed per vessel.

Splenocytes adhesion studies

The day of sacrifice, the aorta was freshly isolated and cleaned of fat and connective tissues. The aorta was then gently opened longitudinally and pinned, the endothelium faced up, in a Petri dish. Then, the aorta was cut in segments, covered with a physiological salt solution (PSS) and kept at 37°C. In parallel, the spleen was harvested, immersed in 5 ml RPMI, disrupted by rubbing over a 200 μm -nylon mesh screen using a 5 ml-syringe plunger and the cell suspension was centrifuged. Distilled water was added for 15 seconds to lyse contaminating erythrocytes and osmolarity was re-established using a 1.8% NaCl solution. Cell count was adjusted to 5×10^6 cell/ml with RPMI. Splenocytes were labelled with Cr^{51} (activity of 100 μCi) for 1 hour at 37°C, with gentle agitation every 15 minutes to reduce cell sedimentation. Splenocytes were then centrifuged and washed twice with RPMI. Splenocytes were re-suspended in RPMI and cell count was adjusted to 10^6 cell/ml with RPMI. Segments of aorta with intact endothelium were first exposed to PSS alone or containing histamine (0.1 μM) for 10 minutes and then washed. Labeled splenocytes were then allowed to adhere onto the native endothelium for 30 minutes at 37°C. Segments were then washed to remove non-adhesive splenocytes and radioactivity was counted. The number of splenocytes adhering to the endothelium was expressed per surface area of the segment (splenocytes/ mm^2).

Flow cytometry studies

From the splenocyte suspension (5×10^6 cell/ml), 33 μL samples were incubated for 30 minutes at room temperature in the dark with different monoclonal antibodies (CD18- or CD62L- phycoerythrin-conjugated, from Serotec) or their isotype-matched control IgGs. Reaction was stopped by the addition of 1% formalin and samples were analyzed on an Altra flow cytometer (Beckman Coulter) within 2 hours. Cells were gated using their

forward- and side-scatter characteristics and their labeling monitored using single-color immunofluorescence staining with saturating concentrations of fluorescent dye-conjugated monoclonal antibodies. Antibody binding was determined as the percentage of positive splenocytes or the mean fluorescence intensity (MFI) over a fluorescence threshold gated over a splenocyte population stained with the proper isotype-matched control IgG (<2% of positive cells). The binding index (% of positive cells x MFI) was then calculated. Between 3,000-5,000 splenocytes were analyzed from each sample.

Quantification of gene expression by Real-Time polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from aorta using an RNeasy mini-kit (Qiagen Inc). Efficient extraction was possible by performing additional steps of digestion with proteinase K (Qiagen Inc) and by eliminating DNA with a treatment with DNase I (Qiagen Inc). The reverse transcriptase reaction contained 5 ng/ μ L total RNA (each sample), M-MLV reverse transcriptase (200 U, Invitrogen), reverse primer (4 pM, Invitrogen), dNTPs (0.5 mmol/L, MBI Fermentas), and supplied optimal buffers. The reaction protocol consisted of 3 successive incubation steps: 1) 25°C for 10 minutes; 2) 37°C for 50 minutes; and 3) 70°C for 15 minutes.

qPCR was performed as previously ⁶ with 2 ng of cDNA template containing the appropriate primer concentration: Sirtuin-1 (100 nM); eNOS (300 nM); p22^{phox} (300 nM); MnSOD (300 nM); COX-1 (300 nM); COX-2 (300 nM); cyclophilin A (300 nM) and SYBR Green PCR master mix (Stratagene). Primers for each gene were obtained from distinct exons that spanned an intron by using the *Ensembl* genome browser (<http://www.ensembl.org>). The sequence specificity of each primer was verified with the *Blast* program derived from the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The primers used were as follows: for mouse Sirtuin-1: forward 5'-GAGCAGGTTGCAGGAATCCA-3' and reverse 5'-CCTGATTA AAAATGTCTCCACGAA-3'; for mouse eNOS: forward 5'-CACGAGGCACTGGTGTGGT-3' and reverse 5'-CTTGCGCCGCAAGAGGATA-3'; for mouse p22^{phox}: forward 5'-GGCTGCCCTCCACTTCCT-3' and reverse 5'-

CTCCTTGGGTTTAGGCTCAATG-3': for mouse MnSOD: forward 5'-GGCCAAGGGAGATGTTACAA-3' and reverse 5'-GCTTGATAGCCTCCAGCAAC-3'; for mouse COX-1: forward 5'-ACTCAGCGCATGACTACATC-3' and reverse 5'-CTTCTCAGCAGCAGCTGTTG-3'; for mouse COX-2: forward 5'-GAACATGGACTCACTCAGTTTGTG-3' and reverse 5'-CAAAGATAGCATCTGGACGAGGT-3'; for mouse cyclophilin A: forward 5'-CCGATGACGAGCCCTTGG-3' and reverse 5'-GCCGCCAGTGCCATTATG-3'. PCR products were purified, sequenced and confirmed to be the genes of interest.

Statistical Analysis

In every case, n refers to the number of animals used in each protocol. Continuous variables are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Half-maximum effective concentration (EC_{50}) of ACh was measured from individual concentration-response curves only when a maximal response was obtained. The pD_2 value, the negative log of the EC_{50} , was obtained. At the end of the protocol, the maximal diameter (D_{max}) was determined by changing the PSS to a Ca^{2+} -free PSS containing sodium nitroprusside (SNP; 10 μ mol/L) and EGTA (ethylene glycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 1 mmol/L). Myogenic tone was measured at 100 mm Hg and expressed as percentage of the D_{max} . Acetylcholine-induced dilation is expressed as a percentage of the D_{max} . ANOVA studies followed by a Scheffé's F test were performed to compare E_{max} and pD_2 of dose-response curves as well for adhesion and qPCR studies. Unpaired t-tests were performed for flow cytometry studies. Differences were considered to be statistically significant for a P value $<.05$.

Results

Effect of catechin treatment on plaque formation. Plaque area increased significantly at 12 months compared to 3-m/o ATX mice. Primary prevention (CAT 9) efficiently prevented plaque formation, while secondary prevention (CAT 3) had no significant effect (Fig. 1).

Effect of aging and catechin treatment on myogenic tone and level of pre-constriction with phenylephrine. Myogenic tone and pre-constriction levels did not change between the different groups under control condition (without inhibitor) (Table 1). No differences were observed between 12-m/o animals except for L-NNA alone which reduced precontraction level of arteries isolated from 12-m/o ATX mice receiving catechin for 3 months.

Effect of aging and catechin treatment on vascular reactivity. Maximal dilation and vascular sensitivity to ACh of renal arteries isolated from ATX mice did not significantly change with age (Fig. 2). For perspective, they were similar to the dilation observed in arteries of 12-m/o WT mice, but lower when compared to 3-m/o WT mice¹⁷. Three-month catechin therapy significantly decreased sensitivity to ACh whereas it did not significantly increase the maximal dilation to ACh (Fig. 2 and Table 2). In contrast, primary prevention increased significantly both vascular sensitivity and maximal dilation to ACh (Fig. 2 and Table 2).

Effect of L-NNA and INDO on vascular sensitivity and maximal dilation. Addition of L-NNA alone or in combination with INDO did not limit the maximal dilation induced by ACh in catechin-treated animals (Table 2) and were higher than responses collected from vessels of 12-m/o mice. The vascular sensitivity to ACh was however only maintained by the 9-months of catechin treatment, while secondary prevention lowered the vascular sensitivity to ACh when compared to untreated 12-m/o ATX mice (Table 2).

Effect of aging and catechin treatment on splenocyte adhesion onto the endothelium. Splenocyte adhesion significantly increased with age (Fig. 3A). Adhesiveness further increased in mice receiving the catechin for 3 months but not for 9 months (Fig. 3A). Histamine increased splenocyte adhesion on the aorta of 3- but not 12-m/o ATX mice, and primary prevention limited the stimulatory effect of histamine (Fig. 3A).

Effect of aging and catechin on expression of splenocyte cell adhesion molecules. Splenocytes isolated from 3- and 12-m/o ATX mice expressed equal levels of CD18 and CD62L on their surface (Fig. 3B). Both catechin treatments significantly reduced CD18 expression, while secondary prevention activated splenocytes as revealed by the increased shedding of CD62L (Fig. 3B).

Quantification of gene expression of eNOS, COX-1/2, p22^{phox}, MnSOD and SIRT-1 in mouse aorta. Aging increased significantly COX-1/2 and p22^{phox}, while it decreased SIRT-1 and MnSOD mRNA expression (Fig. 4). Nine months of treatment increased 15 folds eNOS mRNA expression, while secondary prevention had no effect (Fig. 4A). Similarly, primary prevention prevented the rise in p22^{phox} mRNA expression (Fig. 4E). Both treatment paradigms prevented the rise in COX-1 and -2 expression (Fig. 4B and C) and equally limited the decrease in MnSOD expression (Fig. 4F). Interestingly, both regimens prevented the decrease in SIRT-1 mRNA expression, but only the primary prevention increased SIRT-1 levels above that observed at 3-m/o (Fig. 4D).

Discussion

Our study demonstrates that secondary prevention with an antioxidant polyphenol is not only inactive at limiting atherosclerosis but is also deleterious by promoting adhesion and reducing vessel dilatory sensitivity. This is in striking contrast with the potent and well-known vascular protection afforded by early and preventive catechin treatment.

The efficacy of polyphenols at reducing the development of atherosclerosis has been characterized by several animal studies^{9, 13, 19-21}. In all of them however, treatments were initiated at a young age and/or simultaneously to the atherogenic diet. The beneficial effects of catechin when used in prevention are therefore not a surprise. Nonetheless, our results extend the previous findings by demonstrating that preventive polyphenol treatment is associated with an improvement of the endothelial dilatory potency and efficacy as well as the endothelial / splenocyte interactions in ATX mice. Endothelial dilation is improved and becomes more resistant to NOS and cyclooxygenase inhibition suggesting that another endothelium-derived relaxing factor intervene. We previously reported that reduction of the hyperpolarizing factor by free radicals was acutely prevented by the antioxidant N-acetyl-L-cystein in dyslipidemic mice²². This is also in agreement with the previous demonstration that this pathway is upregulated by a low-carbohydrate protective diet in obese rats²³. Ndiaye *et al* previously showed that polyphenols can induce relaxation of isolated porcine coronary arteries and hyperpolarise the smooth muscle upon NO and prostanoids inhibition^{24, 25}. There is therefore a strong argument for the role of EDHF in maintaining dilation following catechin treatment.

Mild dyslipidemia accelerates maturation^{22, 26}. We recently demonstrated that severe dyslipidemia accelerates aging of the endothelium in patients (Voghel *et al*, 2007; in press). Therefore, we propose that primary prevention with catechin may preserve the endothelial function by limiting the endothelial damage associated with severe dyslipidemia and oxidative stress. This is supported by the observation that primary prevention prevented what could be perceived as a deleterious gene expression profile observed in ATX mice: it blunted the rise in COX-2 and p22^{phox} expression, two important markers of inflammation and oxidative stress²⁷⁻³⁰. In addition, catechin primary prevention increased eNOS

expression while it prevented the decline in MnSOD expression, two important vasculo-protective enzymes^{31, 32}. Of importance, it is also associated with a potent expression of SIRT-1, a promoter of longevity in mice and a known marker of the polyphenol treatment effectiveness³³. Finally, we made the unprecedented observation that prevention with catechin limits splenocyte adhesion onto the endothelium and that this is associated with the prevention of CD18 expression on leukocyte surface. Therefore, deleterious changes in the redox environment associated with atherosclerosis contribute to the development of the atherosclerotic lesion.

The most important significance of our work is the demonstration that secondary prevention with catechin (treatment beginning once atherosclerosis has developed) is deleterious to the endothelial function. The key findings are 1) the lack of effect on lesion size, 2) a worsening of the endothelial dilatory properties without change in smooth muscle contractile and relaxant capabilities and 3) a strong increase in splenocyte/endothelium adhesion associated with shedding of CD62 ligand. This is not due however, to a lack of catechin effect since the expression of some markers of atherosclerosis was sensitive to the treatment: COX-2 and p22^{phox} expression were reduced. Furthermore, the decline in SIRT-1 and MnSOD mRNA expression was prevented, and we previously showed that 3 months of catechin therapy was sufficient to prevent ROS production by mouse renal arteries⁶. Compared to untreated 12-m/o ATX mice, the efficacy of ACh was significantly improved after blockade of NO and/or prostanoid production. This observation demonstrates that the non-NO / non-PGI₂ EDHF pathway is also up-regulated by 3 months catechin, but does not permit the maintenance of the vascular sensitivity. The origin of the loss of sensitivity to ACh is likely not related to a change in vascular structure since plaque size is similar in ATX mice untreated or treated for the last 3 months.

Since we previously observed that 3-month catechin treatment decreases ROS production⁶, we would like to suggest that in established atherosclerosis, ROS are involved in the regulation of the endothelial function. It has been reported that cell adhesion molecules may be decreased^{34, 35} or increased³⁶ by polyphenols. Uchida and coworkers reported that resveratrol increased ICAM expression only when cells were pretreated with TNF α , an inflammatory cytokine associated with atherogenicity³⁷. Our data showing that

secondary prevention increased splenocyte adhesion and CD62L shedding are therefore in agreement with their observation.

It is striking that 3-months treatment was not associated with an increase in eNOS expression, while the same 3-month treatment period initiated at the age of 3 months increased eNOS expression ⁶. Hence, it is difficult to decipher whether catechin is inefficient and possibly deleterious to the vascular endothelium because of the established atherosclerosis or because of the age of the animals.

The reasons for the lack of efficacy of catechin in secondary prevention are therefore unknown. It is likely however, that long-term exposure to severe dyslipidemia associated with important plaque size led to irreversible damages. It must be added that mice are less efficient than human at maintaining cellular integrity as they do not develop a strong reparative system ³⁸. Therefore, mice may rely on ROS-dependent signaling as a last resource. ROS-dependent signaling is an important mean of signal transduction, including dilation ³⁹⁻⁴¹. Our lack of knowledge however, on free radical signaling pathways in endothelial cells represents the limitation of the study. Our results however, demonstrate that perturbing the redox environment by polyphenols has opposite consequences in a proatherogenic environment depending on the age of the animal at initiation of the therapy.

To conclude, our results reveal that, during aging, atherosclerosis-dependent changes in vascular function were best prevented by an early preventive catechin therapy. This was associated with the prevention of plaque formation, the improvement of the endothelial dilatory function, an ameliorated expression profile of splenocytes cell adhesion and a positive modulation of many vascular-related genes. In opposition, late catechin therapy exacerbated general vascular dysfunctions. This highlights the importance of oxidative-induced damages associated with atherogenesis and the importance of primary prevention. Our results may add on to explain why antioxidant therapies, started once atherosclerosis is already well established, have failed to show benefit in clinical trials ¹⁶.

Acknowledgements

This work has been supported in part by the Foundation of the Montreal Heart Institute, the Heart and Stroke Foundation of Quebec, and the Canadian Institute for Health Research (MOP 14496). ME Gendron is supported by a scholarship from the Canadian Institute for Health Research

Reference list

1. Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84:1381-1478.
2. Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol.* 2004;500:299-313.
3. Hu JP, Calomme M, Lasure A, De Bruyne T, Pieters L, Vlietinck A, Vanden Berghe DA. Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. *Biol Trace Elem Res.* 1995;47:327-331.
4. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001;74:418-425.
5. Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol.* 1988;37:837-841.
6. Gendron ME, Thorin E. A change in the redox environment and thromboxane A2 production precede endothelial dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007.
7. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:317S-325S.
8. Tijburg LB, Wiseman SA, Meijer GW, Weststrate JA. Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. *Atherosclerosis.* 1997;135:37-47.
9. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2744-2752.
10. Vinson JA, Dabbagh YA. Effect of green and black tea supplementation on lipids, lipid oxidation and fibrinogen in the hamster: mechanisms for the epidemiological benefits of tea drinking. *FEBS Lett.* 1998;433:44-46.

11. Crawford RS, Kirk EA, Rosenfeld ME, LeBoeuf RC, Chait A. Dietary antioxidants inhibit development of fatty streak lesions in the LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1506-1513.
12. Anderson JW, Diwadkar VA, Bridges SR. Selective effects of different antioxidants on oxidation of lipoproteins from rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998;218:376-381.
13. Miura Y, Chiba T, Tomita I, Koizumi H, Miura S, Umegaki K, Hara Y, Ikeda M, Tomita T. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J Nutr.* 2001;131:27-32.
14. Aviram M, Dornfeld L, Kaplan M, Coleman R, Gaitini D, Nitecki S, Hofman A, Rosenblat M, Volkova N, Presser D, Attias J, Hayek T, Fuhrman B. Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs Exp Clin Res.* 2002;28:49-62.
15. Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA, Zuccollo A, Hou X, Jiang B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Cohen RA. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes.* 2006;55:2180-2191.
16. Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation.* 2002;105:2107-2111.
17. Gendron ME, Thorin-Trescases N, Villeneuve L, Thorin E. Aging associated with mild dyslipidemia reveals that COX-2 preserves dilation despite endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H451-458.
18. Sanan DA, Newland DL, Tao R, Marcovina S, Wang J, Mooser V, Hammer RE, Hobbs HH. Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:4544-4549.
19. Wang Z, Zou J, Cao K, Hsieh TC, Huang Y, Wu JM. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in

- hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *Int J Mol Med*. 2005;16:533-540.
20. Kim BJ, Kim YK, Park WH, Ko JH, Lee YC, Kim CH. A water-extract of the Korean traditional formulation Geiji-Bokryung-Hwan reduces atherosclerosis and hypercholesteremia in cholesterol-fed rabbits. *Int Immunopharmacol*. 2003;3:723-734.
 21. Chen CC, Hsu JD, Wang SF, Chiang HC, Yang MY, Kao ES, Ho YC, Wang CJ. Hibiscus sabdariffa extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J Agric Food Chem*. 2003;51:5472-5477.
 22. Krummen S, Drouin A, Gendron ME, Falck JR, Thorin E. ROS-sensitive cytochrome P450 activity maintains endothelial dilatation in ageing but is transitory in dyslipidaemic mice. *Br J Pharmacol*. 2006;147:897-904.
 23. Focardi M, Dick GM, Picchi A, Zhang C, Chilian WM. Restoration of coronary endothelial function in obese Zucker rats by a low-carbohydrate diet. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H2093-2099.
 24. Ndiaye M, Chataigneau T, Andriantsitohaina R, Stoclet JC, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310:371-377.
 25. Ndiaye M, Chataigneau T, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols induce EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries through the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway. *Br J Pharmacol*. 2004;142:1131-1136.
 26. Krummen S, Falck JR, Thorin E. Two distinct pathways account for EDHF-dependent dilatation in the gracilis artery of dyslipidaemic hApoB^{+/+} mice. *Br J Pharmacol*. 2005;145:264-270.
 27. Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, Marnett LJ, Morrow JD, Fazio S, Linton MF. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation*. 2002;105:1816-1823.

28. Burleigh ME, Babaev VR, Yancey PG, Major AS, McCaleb JL, Oates JA, Morrow JD, Fazio S, Linton MF. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient and C57BL/6 mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:443-452.
29. Sorescu D, Weiss D, Lassegue 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;105:1429-1435.
30. Azumi H, Inoue N, Ohashi Y, Terashima M, Mori T, Fujita H, Awano K, Kobayashi K, Maeda K, Hata K, Shinke T, Kobayashi S, Hirata K, Kawashima S, Itabe H, Hayashi Y, Imajoh-Ohmi S, Itoh H, Yokoyama M. Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris: important role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1838-1844.
31. Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1367-1373.
32. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med.* 2005;26:33-65.
33. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 2006;444:337-342.
34. Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distanto A, De Caterina R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:622-629.

35. Kaplan S, Morgan JA, Bisleri G, Cheema FH, Akman HO, Topkara VK, Oz MC. Effects of resveratrol in storage solution on adhesion molecule expression and nitric oxide synthesis in vein grafts. *Ann Thorac Surg.* 2005;80:1773-1778.
36. Uchida Y, Yamazaki H, Watanabe S, Hayakawa K, Meng Y, Hiramatsu N, Kasai A, Yamauchi K, Yao J, Kitamura M. Enhancement of NF-kappaB activity by resveratrol in cytokine-exposed mesangial cells. *Clin Exp Immunol.* 2005;142:76-83.
37. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
38. Holliday R. Aging is no longer an unsolved problem in biology. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1067:1-9.
39. Drouin A, Thorin-Trescases N, Hamel E, Falck JR, Thorin E. Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H₂O₂ production in mouse cerebral arteries. *Cardiovasc Res.* 2007;73:73-81.
40. Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res.* 2005;68:26-36.
41. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:44-84.

Figure legends

Figure 1. Plaque area quantification. Data were expressed in percentage of total aortic area. N = 5-8 in each group. *: P<.05 compared to 3-m/o; †: P<.05 compared to 12-m/o.

Figure 2. Acetylcholine-induced dilation of renal arteries isolated from 12-m/o ATX mice treated with catechin for 3 (late) or 9 (early) months. Data are mean±SEM. N = 7-14. Maximal dilation *: P<.05 compared to 12-m/o; pD_2 †: P<.05 compared to 12-m/o.

Figure 3. Splenocyte adhesion on the native endothelium of aortic segments isolated from 3-m/o, 12-m/o, 12-m/o + CAT 3 and 12-m/o + CAT 9 ATX mice. Responses were obtained either in basal conditions (baseline: without any stimulation) or following stimulation of the endothelium with histamine (0.1 μ M). Data are mean±SEM. N = 4-6. *: P<.05 compared to 3-m/o; †: P<.05 compared to 12-m/o (A). Expression of cell adhesion molecules on the surface of splenocytes isolated from 3-m/o, 12-m/o, 12-m/o + CAT 3 and 12-m/o + CAT 9 ATX mice measured by flow cytometry. Data are mean±SEM. N = 5-11. *: P<.05 to 12-m/o (B).

Figure 4. Gene expression from total RNA isolated from the aorta of 3-m/o, 12-m/o, 12-m/o + CAT 3 and 12-m/o + CAT 9 ATX mice. Gene expression of eNOS (A), COX-1 (B), COX-2 (C), SIRT-1 (D) p22 phox (E) and MnSOD (F) was measured by qPCR. Data are mean±SEM. N = 4-6. *: P<.05 compared to 3-m/o; #: P<.05 compared to 12-m/o.

Table 1. Levels of myogenic tone and phenylephrine-induced precontraction of renal arteries isolated from 3-m/o and 12-m/o ATX mice treated or not with catechin for 3 or 9 months.

	Myogenic tone (% D _{max})	PE precontraction (% D _{max})	n
3-m/o control	26±8	67±3	10
+ L-NNA	44±8	64±3	9
+ Indo + L-NNA	32±14	61±6	6
12-m/o control	16±3	62±2	14
+ L-NNA	23±5‡	63±3	13
+ Indo + L-NNA	32±8*	57±4	10
12-m/o + CAT 3 control	21±9	56±5	7
+ L-NNA	37±4	47±7†	5
+ Indo + L-NNA	43±4	54±6	5
12-m/o + CAT 9 control	18±4	60±3	10
+ L-NNA	22±5‡	62±2	9
+ Indo + L-NNA	28±7	61±3	9

CAT n months: number of months mice were chronically treated with catechin added in the drinking water. Data are mean±SEM *: P<.05 compared to Control condition; †: P<.05 compared to 12-m/o; ‡: P<.05 compared to 3-m/o.

Table 2. Vascular sensitivity (pD_2) and maximal dilation (E_{max}) of renal arteries isolated from ATX mice.

Conditions	Control				L-NNA (10 μ M)				L-NNA + INDO (10 μ M)			
	pD_2	E_{max}	n		pD_2	E_{max}	n		pD_2	E_{max}	n	
3-m/o	6.2 \pm 0.2	63 \pm 10	10		5.6 \pm 0.3	43 \pm 11	9		5.4 \pm 0.7	26 \pm 15*	6	
12-m/o	6.6 \pm 0.2	48 \pm 9	14		6.0 \pm 0.2*	23 \pm 10	13		6.5 \pm 0.2	31 \pm 6	10	
12-m/o + CAT 3	5.4 \pm 0.4†	66 \pm 11	7		5.7 \pm 0.3	71 \pm 9†	5		5.8 \pm 0.2†	61 \pm 11†	5	
12-m/o + CAT 9	7.1 \pm 0.1‡	75 \pm 8†	10		6.6 \pm 0.2*‡	65 \pm 9†	9		6.6 \pm 0.2*	66 \pm 13†	9	

CAT n months: number of months mice were chronically treated with catechin added in the drinking water. Data are mean \pm SEM *: P<.05 compared to Control condition; †: P<.05 compared to 12-m/o; ‡: P<.05 compared to 3-m/o.

Figure 1.

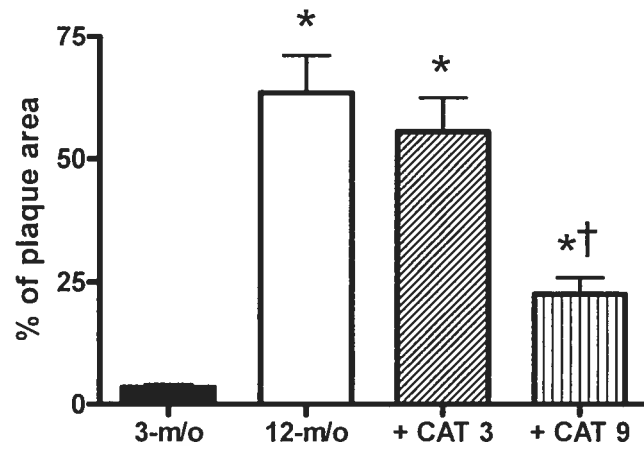


Figure 2.

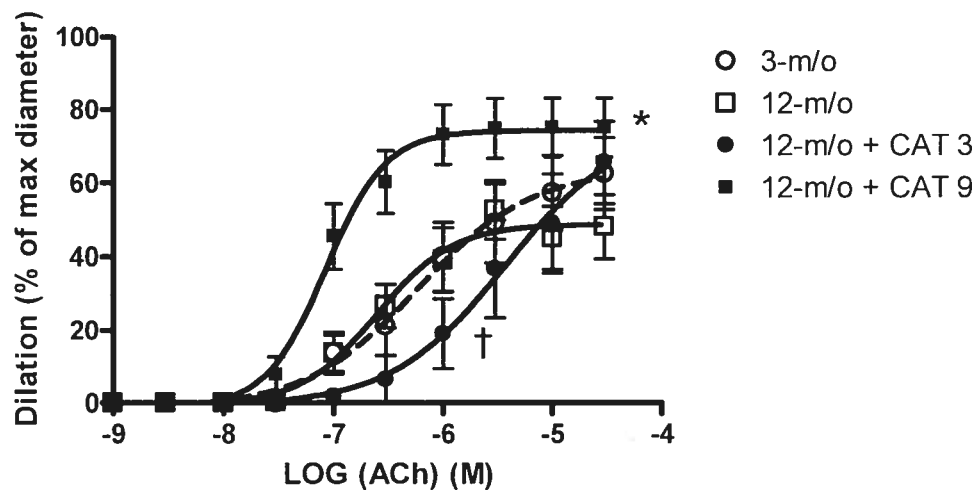


Figure 3.

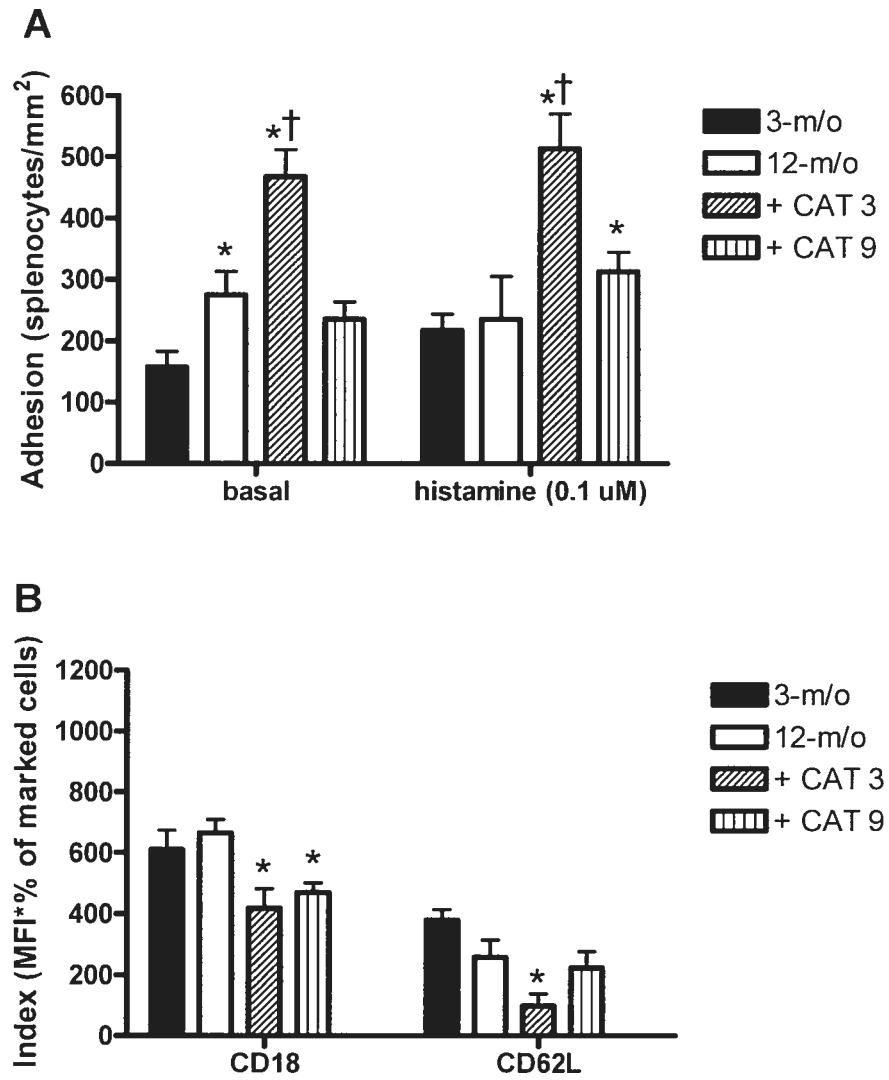
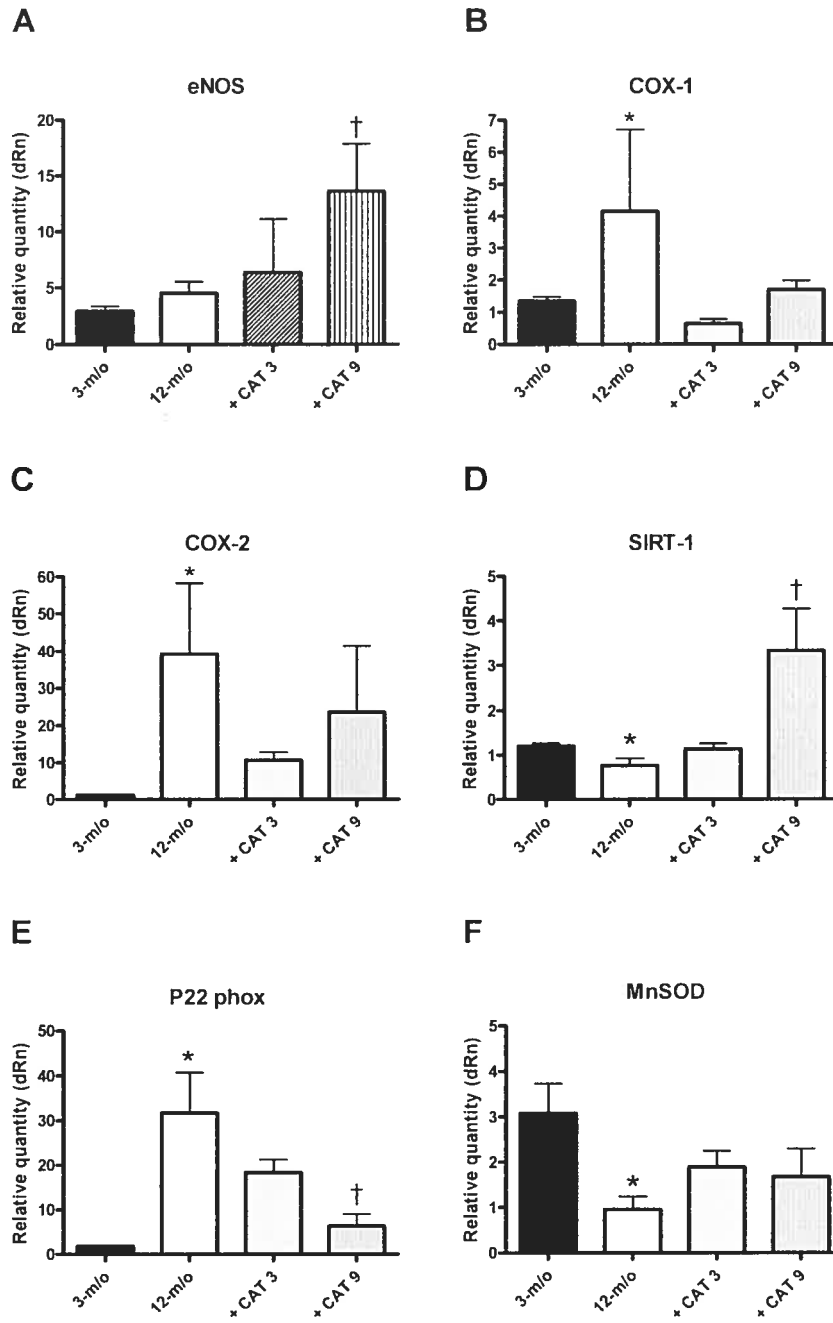


Figure 4.



5. Discussion

Dans la présente section je discuterai des quatre études réalisées dans le cadre de cette thèse. Je tenterai d'établir le fil conducteur unissant ces études afin que le lecteur puisse apprécier la pertinence de chacune d'entre elles ainsi que l'ordre chronologique de présentation. Je discuterai principalement de l'implication des ROS et du stress oxydant dans chacune de ces études.

5.1. Implication du stress oxydant dans l'apparition de la dysfonction endothéliale associée au vieillissement et à la dyslipidémie

Dans la première étude, nous démontrons que l'apparition de la dysfonction endothéliale associée au vieillissement est accélérée par la dyslipidémie. Nous démontrons également que la dyslipidémie est associée à un environnement pro-oxydatif et à une augmentation de l'activité/expression de la COX-2 chez la souris âgée de 12 mois.

Tout d'abord, nous confirmons que le vieillissement est associé à une réduction de la dilatation dépendante de l'endothélium des artères rénales isolées à partir de souris de type sauvage (C57bl/6 ; WT) et dyslipidémiques (souris hApoB^{+/+}), ce qui est en accord avec la littérature (Brandes et al., 2005). Chez la souris WT, la dilatation à l'acétylcholine est réduite à partir de l'âge de 12 mois ($64 \pm 10\%$ à 12 mois vs $90 \pm 15\%$ à 3 mois). Nous observons que la dilatation induite par l'acétylcholine des artères rénales provenant de souris WT est insensible à l'antioxydant NAC, et ce à tous les âges (3, 6 et 12 mois). Étant donné que la dilatation est maximale à 3 et 6 mois ($90 \pm 15\%$ et $81 \pm 6\%$, respectivement), il est compréhensible que le NAC ne puisse pas améliorer davantage la dilatation. En revanche, la résistance au NAC des artères rénales provenant des souris WT âgées de 12 mois ($64 \pm 9\%$ en présence de NAC) suggère que les ROS ne participent pas à la dysfonction endothéliale ou que les ROS induisent des dommages ne pouvant être renversés par un traitement aigu avec le NAC.

Nous démontrons également que les artères rénales provenant des souris WT sont insensibles à l'inhibition des COX, et ce à tous les âges (3, 6 et 12 mois). L'absence d'effet de l'indométhacine chez la souris WT suggère que lors du vieillissement normal, les prostanoides vasodilatateurs ne contribuent pas à la dilatation ou que leur inhibition est compensée par le NO et/ou l'EDHF.

Il est connu que les facteurs de risque cardiovasculaires accélèrent l'apparition de la dysfonction endothéliale (Bracht et al., 2001 ; Drexler et Hornig, 1999 ; Esper, 1998 ; Isles et Paterson, 2000). Comme nous l'avons démontré dans des études antérieures, la dyslipidémie n'induit aucun effet délétère sur la fonction endothéliale chez les jeunes animaux âgés de 3 mois (Krummen et al., 2006; Krummen et al., 2005). Comme pour les animaux WT, ni l'antioxydant NAC, ni l'indométhacine n'altèrent la dilatation induite par l'ACh des artères rénales à cet âge. Cependant à 6 mois, les artères provenant des souris dyslipidémiques ont une réponse réduite à l'ACh ($61 \pm 12\%$ à 6 mois vs $93 \pm 4\%$ à 3 mois), c'est-à-dire 6 mois plus tôt que les artères provenant de souris WT (chez qui la dilatation n'est réduite qu'à l'âge de 12 mois). À 6 mois l'indométhacine n'a aucun effet, suggérant que les prostanoides vasodilatateurs ne sont pas impliqués dans la dilatation à l'acétylcholine ou que leur inhibition est compensée par le NO et/ou l'EDHF. Cependant, l'antioxydant NAC normalise la dilatation ($95 \pm 1\%$ avec NAC vs $61 \pm 10\%$ sans NAC), suggérant que le stress oxydant limite activement la dilatation induite par l'ACh des souris dyslipidémiques âgées de 6 mois. La présence du stress oxydant est confirmée par l'augmentation soutenue de l'expression de HNE dans des sections d'aorte (Étude #1; Figure 6), un marqueur de l'accumulation de dommages oxydatifs (Furfaro et al., 2005). Ces résultats sont en accord avec une publication précédente démontrant que la production de ROS par des artères isolées de souris dyslipidémiques âgées est augmentée comparativement aux souris WT (Krummen et al., 2006). Il est connu que les effets délétères des ROS sur la dilatation induite par l'ACh peuvent comprendre l'inactivation du NO (de Nigris et al., 2003) et de l'EDHF (Krummen et al., 2006 ; Liu et al., 2006 ; Liu et

Gutterman, 2002a ; Liu et al., 2002). Les résultats que nous avons obtenus en présence de L-NNA démontrent que le NO contribue fortement à la dilatation à 3 mois ($57\pm 12\%$ avec L-NNA vs $93\pm 4\%$ sans L-NNA), mais que cette participation est diminuée à 6 ($77\pm 6\%$ vs $61\pm 10\%$) et 12 mois ($41\pm 13\%$ vs $64\pm 12\%$). Toutefois, la contribution de l'EDHF semble être préservée (démontré par l'utilisation du KCl).

Il est intéressant de noter qu'à l'âge de 12 mois, les artères isolées à partir des souris dyslipidémiques sont particulièrement sensibles à l'indométhacine: l'inhibition des COX-1/2 réduit la dilatation induite par l'ACh de 50% ($29\pm 13\%$ avec Indo vs $64\pm 12\%$ sans Indo). Il est encore plus important de remarquer que les effets de l'indométhacine peuvent être reproduits par le NS-398 (inhibiteur sélectif de la COX-2), mais pas par le Valeryl Salicylate (inhibiteur sélectif de la COX-1). Certains prostanoïdes dérivés de la COX-2 sont donc d'importants vasodilatateurs dans l'artère rénale de la souris dyslipidémique âgée de 12 mois. Puisqu'à 12 mois l'utilisation du NAC améliore la dilatation en présence d'indométhacine ($65\pm 13\%$) ou de NS-398 ($64\pm 8\%$), nous pouvons affirmer que les ROS induisent des dommages partiellement réversibles à cet âge, mais que l'origine de ce stress oxydant associé à la dyslipidémie est indépendante de l'activité des COX.

L'inhibition induite par l'indométhacine et l'effet du NAC observé chez les souris dyslipidémiques âgées de 12 mois s'opposent aux observations retrouvées chez les souris WT du même âge, chez lesquelles l'indométhacine et le NAC n'ont aucun effet. Afin de répondre à cette divergence entre les deux conditions (WT et dyslipidémique), nous avons émis l'hypothèse que la dyslipidémie est associée à une plus grande production de ROS que le vieillissement normal, ce qui enclencherait des mécanismes de protection vasculaire. Nous croyons que l'augmentation de l'activité de la COX-2 en était un. Nous supposons que la production de prostanoïdes vasodilatateurs par la COX-2 permet de maintenir un niveau de dilatation des artères appréciable. Cependant, l'expression de la COX-2 augmente plus tôt chez les souris WT que chez les souris dyslipidémiques (Étude #1, Figure 4). Il est donc peu probable que le stress oxydant soit directement responsable de

l'augmentation de l'expression de COX-2. Il est davantage logique de croire que l'inactivation du NO et/ou de l'EDHF par les ROS ou la diminution de l'expression de la eNOS (Étude #1, Figure 5) dévoile la fonction dilatatrice de prostanoïdes dérivés de la COX-2, possiblement la PGI₂.

Le premier article de cette thèse a permis de mieux comprendre l'importance de considérer l'aspect dynamique du vieillissement seul ou associé à un facteur de risque comme la dyslipidémie dans l'élaboration d'un protocole expérimental. Les résultats ont renforcé l'idée que le stress oxydant est augmenté par les facteurs de risques telle que la dyslipidémie et suggèrent que les prostanoïdes dérivés de la COX-2 sont des autacoïdes vasodilatateurs importants chez les souris dyslipidémiques âgées.

5.2. Implication du TXA₂ et des ROS dans la fonction endothéliale de souris WT âgées de 6 mois et rôle de l'environnement rédox

Dans la seconde étude, nous avons approfondi la caractérisation de la fonction endothéliale des artères rénales provenant de souris WT âgées de 6 mois. Cette deuxième étude a été basée sur l'observation qu'à cet âge, l'indométhacine (83±3%) renverse l'inhibition partielle de la dilatation induite par le L-NNA (58±8% avec L-NNA vs 83±3% sans L-NNA). Les principaux résultats de cette étude sont les suivants : 1) en absence de NO, la production de ROS induite par le TXA₂ dérivé des COX limite la dilatation des artères rénales provenant de souris âgées de 6 mois possiblement en diminuant la relâche et/ou l'efficacité de l'EDHF (Étude #2; Figure 8) 2) un changement de l'environnement rédox (démonstré par un traitement chronique avec la catéchine) entre l'âge de 3 et 6 mois est responsable de la production de ROS induite par la TXA₂.

L'inhibition pharmacologique de la production de NO réduit à des niveaux similaires la dilatation des artères rénales induite par l'ACh provenant de souris âgées de 3

($68\pm 4\%$ avec L-NNA vs $90\pm 5\%$ sans L-NNA) et 6 mois ($58\pm 8\%$ avec L-NNA vs $83\pm 3\%$ sans L-NNA). Ces résultats suggèrent que la production de NO n'est pas différente entre les deux groupes. Cependant, l'ajout d'indométhacine, un inhibiteur non-sélectif des COX, rétabli la dilatation chez les souris âgées de 6 mois seulement. L'absence d'effet de l'indométhacine chez les souris âgées de 3 mois ($68\pm 4\%$ avec L-NNA vs $67\pm 5\%$ avec L-NNA + Indo) suggère que les prostanoïdes vasodilatateurs ne contribuent pas à la dilatation ou que l'EDHF compense (seul EDRF restant puisqu'il y a présence de L-NNA et d'indométhacine). En revanche, l'effet induit par l'indométhacine chez les souris âgées de 6 mois ($58\pm 8\%$ avec L-NNA vs $83\pm 3\%$ avec L-NNA + Indo) suggère que l'ajout de L-NNA dévoile la production d'une prostaglandine vasoconstrictrice.

La dichotomie des résultats observés à 3 et 6 mois, démontrent que le vieillissement et la maturation sont associés à une évolution des mécanismes de régulation du tonus vasculaire, comme nous l'avions démontré dans la première étude (Gendron et al., 2007). Puisqu'en présence de L-NNA et d'indométhacine, la dilatation des artères rénales provenant des souris âgées de 6 mois est quasi maximale ($83\pm 3\%$), nous suggérons que l'EDHF compense pour l'absence de NO et de PGI_2 . Toutefois, l'indométhacine doit être présente afin de révéler le potentiel maximal dilatateur de l'endothélium. L'inhibition de la production de NO dévoile donc la production d'une prostaglandine vasoconstrictrice qui limite la dilatation, possiblement le TXA_2 . La nature de la prostaglandine libérée en présence de L-NNA a été démystifiée par l'utilisation du furegrelate (un inhibiteur de la TXA_2 synthase) et du SQ-29548 (un antagoniste du récepteur TP). L'ajout de ces inhibiteurs au L-NNA a produit le même effet que l'indométhacine ($84\pm 5\%$ avec L-NNA + furegrelate; $80\pm 7\%$ avec L-NNA + SQ-29548 vs $83\pm 3\%$ avec L-NNA + Indo). Ce mécanisme a été rapporté par plusieurs groupes, principalement dans des artères isolées provenant de rat spontanément hypertendus (Auch-Schwelk et al., 1992; Ge et al., 1995; Gluais et al., 2005c).

Notre étude apporte cependant un élément mécanistique de plus. Le NAC ($76\pm 7\%$; pD_2 : 6.6 ± 0.1) et la catalase ($86\pm 4\%$; pD_2 : 6.0 ± 0.2) normalisent la dilatation en présence de L-NNA, mimant ainsi les effets de du furegrelate, du SQ-29548 et des inhibiteurs des COX (indométhacine, NS-398 et valeryl salicylate). Ainsi, en absence de NO, la TXA_2 produite se lie à son récepteur TP et stimule la production de ROS qui limite la dilatation. En considérant la sensibilité à l'acétylcholine, le NAC (un chélateur de ROS à large spectre et un précurseur du glutathion) est plus efficace pour prévenir la réduction de la dilatation induite par le L-NNA que la catalase, suggérant que la liaison de la TXA_2 à son récepteur TP induit la production d'un précurseur du H_2O_2 , possiblement le O_2^- . Gao et Lee (2005) ont démontré que le H_2O_2 est un vasoconstricteur dérivé de l'endothélium dans l'artère rénale de rat et que la constriction induite par du H_2O_2 exogène est réduite par un antagoniste du récepteur TP et un inhibiteur de la TXA_2 synthase. Leurs résultats suggèrent donc que le H_2O_2 précède la production de TXA_2 . Cette séquence d'évènements est cependant peu probable dans notre cas puisque l'analogue de la TXA_2 (U46619) induit la production de ROS et que l'antagoniste du récepteur TP prévient la production de ROS induite par le L-NNA. Plusieurs groupes ont démontré que les ROS peuvent être impliqués dans les contractions dépendantes des COX (Akamine et al., 2006; Auch-Schwelk et al., 1990; Yang et al., 2002; Yang et al., 2003a; Yang et al., 2003b). Notre étude ne nous permet pas d'affirmer que la production de ROS induite par la TXA_2 limite la dilatation en présence de L-NNA en induisant une vasoconstriction. En revanche, nous avons auparavant démontré que l'EDHF est sensible au stress oxydant, ce qui réduit son potentiel dilatateur (Krummen et al., 2006). Ainsi, il est légitime de penser que les ROS produits suite à la liaison de la TXA_2 à son récepteur TP puissent inactiver l'EDHF (Étude #2, Figure 8).

L'étape suivante était donc d'évaluer quel était l'impact d'un changement de l'environnement rédox sur la production de TXA_2 observé en présence de L-NNA. Pour ce faire, nous avons traité des souris âgées de 3 mois avec la catéchine (polyphénol antioxydant) pour une période de 3 mois. Suite à ce traitement, les souris présentent une

réponse vasodilatatrice similaire aux souris âgées de 3 mois sans traitement ($84\pm 5\%$ chez les souris traitées vs $90\pm 5\%$ chez les souris âgées de 3 mois). Le L-NNA a réduit la dilatation à des niveaux similaires ($67\pm 9\%$ chez les souris traitées vs $68\pm 4\%$ chez les souris âgées de 3 mois). Comme pour les souris âgées de 3 mois, l'ajout d'indométhacine n'a pas eu d'effet chez les souris âgées de 6 mois traitées avec la catéchine ($60\pm 8\%$ chez les souris traitées vs $67\pm 5\%$ chez les souris âgées de 3 mois). Ainsi, le traitement avec la catéchine a eu pour effet de prévenir les effets de l'indométhacine ($60\pm 8\%$ chez les souris traitées vs $83\pm 3\%$ chez les souris non-traitées) et la production de TXA_2 (2 pg/ml vs 45 pg/ml) ainsi que de ROS (2 unités vs 67 unités). La catéchine prévient donc les changements apparaissant normalement à 6 mois et permet de maintenir le phénotype observé à 3 mois. En altérant l'environnement rédox, la catéchine a induit un impact significatif sur la physiologie basale de l'artère rénale. Il est connu que les polyphénols peuvent améliorer la fonction endothéliale en agissant comme chélateur des ROS (Sarr et al., 2006), mais également en augmentant la production du NO, de la PGI_2 ainsi que de l'EDHF et en diminuant la production de vasoconstricteurs (Stoclet et al., 2004). Ainsi, il faut être vigilant dans l'interprétation des résultats découlant de l'utilisation des polyphénols. Dans la deuxième étude de cette thèse les propriétés antioxydantes de la catéchine ont été mises de l'avant, cependant les auteurs sont conscients que les mécanismes par lesquels la catéchine améliore la fonction endothéliale sont complexes et peuvent comprendre plusieurs voies vaso-protectives.

5.3. Effet d'un traitement antioxydant précoce et tardif sur la dysfonction endothéliale associée au vieillissement

Dans la troisième étude, nous avons voulu déterminer l'effet d'un traitement antioxydant chronique avec la catéchine débuté à différents âges sachant que les ROS sont impliqués dans la maturation/développement endothéliale physiologique (faible concentration de ROS) et dans l'apparition des dommages endothéliaux (forte

concentration de ROS). Nous avons utilisé des souris WT (C57Bl/6) traitées avec la catéchine de l'âge de 3 mois jusqu'à 12 mois (traitement précoce) ou de l'âge de 9 mois jusqu'à 12 mois (traitement tardif, post-maturation). Les résultats obtenus démontrent qu'un traitement tardif est plus efficace qu'un traitement précoce pour prévenir la dysfonction endothéliale associée au vieillissement. Un traitement tardif améliore la sensibilité vasculaire à l'ACh, réduit l'adhésion des splénocytes sur l'endothélium, améliore le patron d'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales et des splénocytes et permet de maintenir l'expression génique de plusieurs gènes vasculaires. Comme la maturation physiologique endothéliale nécessite un certain environnement rédox (faible concentration de ROS), nous suggérons que l'initiation d'une thérapie antioxydante suite à cette période de maturation est davantage bénéfique.

Comme il a été précédemment démontré, une diminution de la sensibilité et de la dilatation maximale ont été observées lors du vieillissement (Brandes et al., 2005; Gendron et al., 2007; Krummen et al., 2006). Notre première étude (Étude #1) montre que l'utilisation aigüe de l'antioxydant NAC ne renverse pas la dysfonction endothéliale associée au vieillissement, suggérant que les ROS ne limitent pas la dilatation de façon aigüe (Gendron et al., 2007). Toutefois, la troisième étude révèle qu'un traitement chronique avec la catéchine (tardif et précoce) prévient la dysfonction endothéliale associée au vieillissement ($87\pm 3\%$ pour le traitement tardif et $86\pm 4\%$ pour le traitement précoce vs $64\pm 10\%$ sans traitement). Cependant, le traitement le plus efficace est celui qui débute tardivement puisqu'en plus de maintenir l'efficacité, il permet de préserver la sensibilité vasculaire à l'acétylcholine vieillissement (6.6 ± 0.1 pour le traitement tardif et 6.2 ± 0.1 pour le traitement précoce vs 6.3 ± 0.1 sans traitement et 6.7 ± 0.1 à 3 mois). Comme nous avons précédemment démontré que la dysfonction endothéliale survient vers l'âge de 9 mois (Gendron et al., 2007; Krummen et al., 2006), il est logique de penser que le traitement débutant à cette âge (traitement tardif) soit davantage efficace.

Il est reconnu que la capacité de l'endothélium à limiter l'adhésion des leucocytes sur sa surface est réduite avec le vieillissement. Les résultats de la troisième étude démontrent que l'endothélium et les splénocytes adhèrent plus aisément à 12 mois comparativement à 3 mois (127 ± 10 splénocytes/mm² chez les souris âgées de 3 mois vs 207 ± 16 à 12 mois). L'expression des molécules d'adhésion est induite par les ROS et est sensible aux antioxydants (Chen et al., 2004; Handa et al., 2002; Ludwig et al., 2004; Schaller et al., 1992). Cette troisième étude démontre que le traitement tardif est plus efficace pour prévenir l'adhésion associée au vieillissement, lorsque l'endothélium est activé par l'histamine (137 ± 16 avec le traitement tardif vs 189 ± 14 avec le traitement précoce). De plus, les études de cytométrie en flux démontrent que le traitement tardif prévient l'expression de CD18 et le clivage de CD62L et PSGL-1 à la surface des splénocytes. Le traitement précoce est pour sa part efficace, mais dans une moindre mesure puisqu'il ne prévient que le clivage de CD62L. De plus, l'expression de la P-sélectine et de ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales augmente avec le vieillissement et est prévenue par les deux traitements à la catéchine (Étude #3: Figure 5).

Les effets des traitements antioxydant ont également été démontrés par l'étude de plusieurs gènes impliqués dans la régulation du tonus vasculaire et de l'environnement rédox. Dans la deuxième et la présente étude, nous observons une augmentation de l'expression de la COX-2 suite à l'exposition chronique de catéchine pendant 3 et 9 mois (traitement précoce), respectivement (Gendron et al., 2007). Il est intéressant de noter que le traitement tardif, soit le traitement étant le plus efficace à préserver la fonction endothéliale, a prévenu l'expression de la COX-2. Nous croyons que l'initiation de la thérapie antioxydante précoce a perturbé l'environnement rédox ce qui est démontré par la baisse d'expression de la MnSOD (Tong et al., 2005; Xie et al., 2004; Zaslaver et al., 2005; Zhang et al., 2002) et a mené à une augmentation de p22^{phox}, une sous-unité de la NADPH oxydase, une enzyme impliquée dans la défense de l'hôte (Bedard et Krause, 2007; Leto et Geiszt, 2006).

Cette troisième étude démontre donc l'importance de l'environnement rédox dans la maturation adéquate de l'endothélium et corrobore les études proposant un rôle des ROS dans l'apparition de la dysfonction endothéliale associée au vieillissement. Une fois de plus, les auteurs n'ignorent pas les effets, autre qu'antioxydant, pouvant être produit par la catéchine.

5.4. Effet d'un traitement préventif primaire et secondaire sur la dysfonction endothéliale associée à l'athérosclérose: il vaut mieux prévenir que guérir !

Nous avons démontré dans la troisième étude qu'en l'absence de facteurs de risques cardiovasculaires, une prévention tardive avec la catéchine est adéquate. Nous démontrons dans la quatrième étude que les résultats changent complètement en présence d'athérosclérose. Dans cette dernière étude, nous avons observé qu'un traitement préventif secondaire (débuté à l'âge de 9 mois) avec la catéchine, une fois que les plaques athérosclérotiques sont développées, est moins efficace pour préserver la fonction endothéliale qu'un traitement préventif primaire (débuté à l'âge de 3 mois). Un traitement préventif secondaire ne diminue pas la taille des plaques athérosclérotiques, favorise l'adhésion des splénocytes sur l'endothélium et diminue la sensibilité vasculaire à l'acétylcholine. Par contre, un traitement antioxydant préventif primaire améliore la dilatation, maintient l'adhésion et diminue l'apparition de plaques athérosclérotiques. Pour l'exprimer simplement, l'athérosclérose semble accélérer le processus de vieillissement des vaisseaux.

Tout d'abord, nous démontrons que le modèle animal d'athérosclérose utilisé, la souris LdLr^{-/-} ; hApoB^{+/+}, est pertinent, c'est-à-dire bel et bien caractérisé par un phénotype inflammatoire et associé au stress oxydant, tel que connu de l'athérosclérose (Ross, 1999; Stocker et Keane, 2004). Ces souris développent des plaques athérosclérotiques (64±8%

de la surface de l'aorte est recouverte de plaques à 12 mois) et possèdent une dysfonction endothéliale dès l'âge de 3 mois ($63 \pm 10\%$ chez les souris athérosclérotiques vs $90 \pm 5\%$ chez les souris WT). Elles sont caractérisées par une augmentation de l'adhésion des splénocytes supérieure à leurs homologues de type sauvage (45% d'augmentation chez les souris athérosclérotique vs 35% chez les souris WT). Finalement, elles présentent une augmentation de l'expression génique de la COX-2 (40 fois plus élevé à 12 mois qu'à 3 mois) et de la sous-unité p22^{phox} de la NADPH oxydase (30 fois) ainsi qu'une diminution de la MnSOD (diminution de 66% à 12 mois par rapport à 3 mois).

L'efficacité des polyphénols à réduire le développement de l'athérosclérose a été démontré dans plusieurs modèles animaux (Chen et al., 2003; Hayek et al., 1997; Kim et al., 2003; Miura et al., 2001; Wang et al., 2005). Cependant, pour chacune de ces études, le traitement avec les polyphénols était débuté à un jeune âge et/ou au même moment que la diète athérogénique. Ainsi, les effets bénéfiques que nous avons démontrés avec le traitement préventif primaire ne sont pas surprenants. Cependant, en plus de démontrer que le traitement préventif primaire diminue considérablement la formation des plaques athérosclérotiques, nous montrons que l'efficacité, la sensibilité vasculaire à l'acétylcholine ainsi que la nature des interactions splénocytes-endothélium sont améliorés. Nous croyons que les effets bénéfiques apportés par la catéchine pourraient être dû aux diverses propriétés des polyphénols. Premièrement, les propriétés antioxydantes de la catéchine pourraient être en partie responsables de cet effet. Dans un tel cas, un déséquilibre de l'environnement rédox, pouvant être prévenu par la catéchine, serait impliqué dans le processus d'athérogenèse chez la souris $LdLr^{-/-}; hApoB^{+/+}$. Plusieurs indices nous mènent à penser ainsi. Tout d'abord, le traitement préventif primaire a diminué de plus de 66% l'expression de la sous-unité p22^{phox} de la NADPH oxydase, une enzyme oxydante sensible à l'environnement rédox. De plus, Le traitement avec la catéchine a augmenté l'expression génique de la MnDOD, une enzyme antioxydante également sensible à l'environnement rédox. Il est intéressant de noter que l'expression génique de cette enzyme n'a pas changé de la même manière dans la troisième et la quatrième étude même si les souris ont été

exposées à un traitement avec la catéchine identique. Il est connu que l'expression de cette enzyme est affectée par le stade de la maladie (t Hoen et al., 2003; Luoma et al., 1998), suggérant qu'un traitement avec la catéchine pourrait produire des effets différents dans un contexte de vieillissement normal et de vieillissement associé à l'athérosclérose. Outre les propriétés antioxydantes, il est essentiel de ne pas sous-estimer les multiples effets que procurent les polyphénols. Il est connu que les polyphénols peuvent augmenter l'expression de la eNOS (Hsieh et al., 1999; Leikert et al., 2002; Wallerath et al., 2002; Wallerath et al., 2003), comme il en est le cas dans la troisième étude. Les effets du traitement sur l'expression de la eNOS pourraient mener à une augmentation de la production de NO, un facteur vasodilatateur capable de réduire l'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium. Le NO pourrait être responsable de plusieurs effets bénéfiques assurés par la catéchine. De plus, les polyphénols peuvent directement agir sur la paroi vasculaire et diminuer la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (Iijima et al., 2002; Iijima et al., 2000) ainsi qu'inhiber l'activité et l'expression des MMP (Oak et al., 2004). Ces effets ont pour résultat de prévenir le développement de l'athérosclérose.

Les observations les plus intéressantes de cette dernière étude sont celles obtenues avec le traitement antioxydant préventif secondaire. Les résultats obtenus avec ce type de traitement sont particulièrement pertinents puisque la catéchine est administrée une fois que l'athérosclérose est développée, une situation similaire à ce que l'on retrouve dans les essais cliniques utilisant des antioxydants. En effet, les résultats observés dans la dernière étude vont de pair avec le constat d'échec des antioxydants dans les essais cliniques chez l'humain (Steinberg et Witztum, 2002). En revanche, il faut souligner les différences qui rendent ardue la comparaison de nos résultats à ceux obtenus chez l'humain, telles que la complexité de l'humain par rapport à la souris et les issues mesurées dans chacune des études (mortalité/ morbidité versus fonction endothéliale). L'utilisation d'un traitement antioxydant préventif secondaire chez des souris athérosclérotiques aggrave en effet différents aspects de la fonction endothéliale. Le fait que le traitement préventif secondaire aggrave la situation suggère que les ROS pourraient être impliqués, par des mécanismes

inconnus, dans la régulation de la fonction endothéliale lorsque l'athérosclérose est établie. Par exemple, l'expression des molécules d'adhésion peut être diminuée (Carluccio et al., 2003; Kaplan et al., 2005) ou augmentée (Uchida et al., 2005) par les polyphénols, suggérant un rôle des radicaux libres dans ce processus. Uchida *et al* ont démontré que le resvératrol augmente l'expression d'ICAM-1 seulement lorsque les cellules sont prétraitées avec le TNF- α , une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans l'athérogenèse (Ross, 1999). Ainsi, le fait que nous démontrons que le traitement préventif secondaire avec la catéchine augmente l'adhésion de splénocytes sur l'endothélium et le clivage de CD62L est en accord avec cette étude.

Afin de comprendre les effets néfastes du traitement préventif secondaire, nous proposons l'explication suivante. Il est connu que l'établissement de l'athérosclérose mène à des dommages vasculaires irréversibles. De plus, il est à noter que comparativement aux humains les souris sont moins efficaces à maintenir l'intégrité cellulaire puisqu'elles ne développent pas de bons systèmes réparateurs (Demetrius, 2006; Holliday, 2006). Ainsi, nous émettons l'hypothèse que dans un contexte d'athérosclérose établie chez la souris, les ROS sont impliqués dans des voies de signalisation recrutées en dernier recourt afin de maintenir un certain niveau de fonction cellulaire. Les ROS sont impliqués dans plusieurs voies de signalisation, dont certaines de dilatation (Cai, 2005; Drouin et al., 2007; Gluais et al., 2005b; Hatoum et al., 2005; Matoba et Shimokawa, 2003; Matoba et al., 2000; Miura et al., 2003b). Toutefois, des études supplémentaires seront nécessaires afin de caractériser ces voies de signalisation.

Pour résumer, les résultats de la quatrième étude démontrent qu'un traitement avec la catéchine préventif primaire prévient l'apparition de plusieurs phénomènes associés au vieillissement et à l'athérosclérose. La catéchine prévient le développement des plaques athérosclérotiques, de la dysfonction endothéliale et de l'adhésion des splénocytes sur l'endothélium. Nous émettons l'hypothèse que ces effets sont, en partie, attribuables aux propriétés antioxydantes des polyphénols. Nous croyons également que les radicaux libres

sont impliqués dans les voies de signalisation ou les mécanismes de survie/compensation apparaissant suite à l'établissement de l'athérosclérose. Cette hypothèse résulte de l'inefficacité, voire même de l'effet dommageable, d'un traitement préventif secondaire débuté lorsque l'athérosclérose est établie. Comme mentionné précédemment, les effets induits par les traitements avec la catéchine ne sont sûrement pas uniquement dus aux propriétés antioxydantes des polyphénols, mais également aux diverses effets complémentaires qu'ils peuvent produire. En effet, les polyphénols peuvent induire l'expression et l'activité des enzymes responsable de la production du NO, de la PGI₂ et de l'EDHF (Anselm et al., 2007; Busse et al., 2002; Mombouli et Vanhoutte, 1999; Stoclet et al., 2004). Il est certain que l'induction de ces différents facteurs peut contribuer aux effets bénéfiques provoqués par la catéchine. De plus, la réduction du développement des plaques athérosclérotiques pourrait aussi être facilité par l'effet inhibiteur de la catéchine sur les MMPs et le VEGF (Annabi et al., 2002; El Bedoui et al., 2005; Oak et al., 2004). Les propriétés antioxydantes des polyphénols ont été largement étudiées et démontrées, celles-ci ne doivent donc pas être négligées. Nous démontrons que l'utilisation d'une thérapie avec des polyphénols provoque des effets opposés dans un contexte d'athérosclérose chez la souris dépendamment du stade de la maladie au moment de l'initiation du traitement. L'évolution de l'athérosclérose est donc dynamique. Il est difficile de faire un lien, étant donné les différences entre la souris et l'homme ainsi que les objectifs mesurés, entre nos résultats et les essais cliniques chez l'humain. En revanche, nos résultats permettent de proposer une hypothèse pour expliquer les observations chez l'homme.

5.5. Comparaison des études #3 et #4

Il est intéressant de comparer les résultats obtenus dans la troisième et la quatrième étude. Ces deux études ont été conduites de la même manière (même type d'expérimentation, âge des souris et durée de traitement), cependant le contexte pathologique était différent. Dans la troisième étude, des souris C57Bl/6 WT âgées de 12 mois ont été étudiées tandis que dans la quatrième étude des souris LdLr^{-/-} : hApoB^{*34}

athérosclérotiques ont été utilisées. Ainsi, la comparaison de ces deux études permet d'évaluer l'effet de l'athérosclérose sur les différents paramètres étudiés et de constater la différence d'effet que peut avoir un traitement avec la catéchine dans ces deux contextes.

Il est aisé de remarquer que la présence d'athérosclérose affecte de façon plus importante la fonction vasculaire que le vieillissement normal. Tout d'abord, seules les souris athérosclérotiques développent à 12 mois des plaques athérosclérotique recouvrant près de 65% de la surface aortique. L'athérosclérose provoque une diminution de la dilatation dès l'âge de 3 mois ($63 \pm 10\%$), tandis qu'elle n'est apparente qu'à 12 mois chez la souris WT ($64 \pm 10\%$). L'athérosclérose accélère donc l'apparition de la dysfonction vasculaire. La fonction vasculaire semble tellement altérée par l'athérosclérose que son état est difficilement réversible par un traitement avec la catéchine. Chez la souris WT, les traitements préventifs primaire et secondaire sont tous deux efficaces pour rétablir la fonction endothéliale, probablement parce que l'endothélium est faiblement endommagé par le vieillissement. Par contre, chez la souris athérosclérotique, seul le traitement préventif primaire (débuté avant que l'athérosclérose soit installée) est efficace à rétablir la fonction endothéliale.

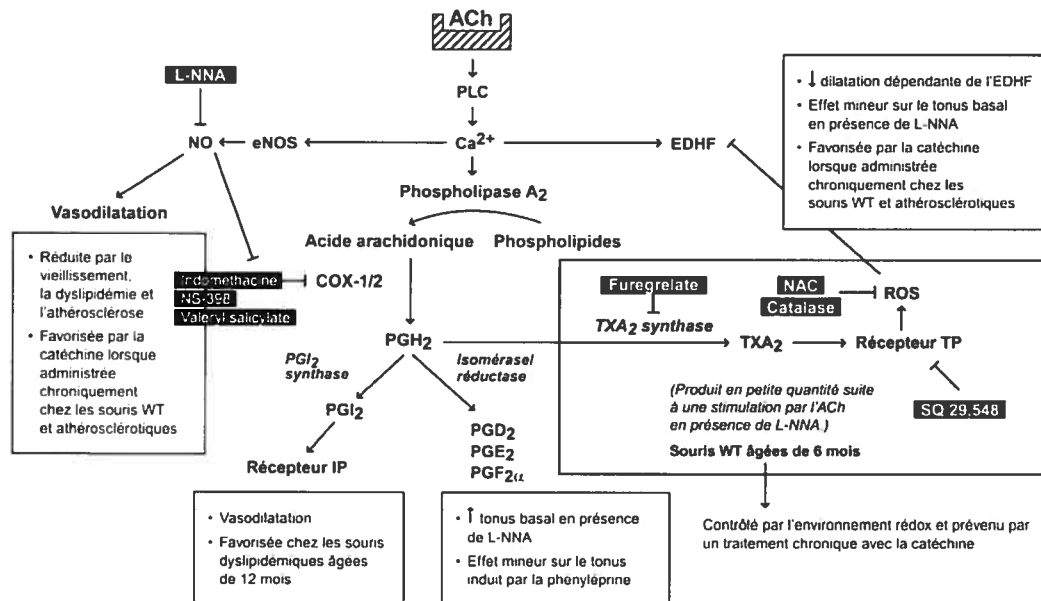
Il est intéressant de comparer les changements d'expression génique observés dans ces deux études. Nous pouvons noter que l'expression de l'ARNm de la eNOS diminue avec l'âge chez la souris WT et tend plutôt à augmenter chez la souris athérosclérotique. Il est connu que l'expression de cette enzyme peut augmenter, diminuer ou rester inchangée selon le lit vasculaire, l'espèce et les conditions expérimentales (pathologie). Dans ce cas-ci, les résultats démontrent que l'expression de l'ARNm de la eNOS diffère selon la condition pathologique étudiée. Son expression est augmentée chez les souris WT et athérosclérotiques principalement suite à un traitement préventif primaire. Il en est de même pour tous les gènes étudiés (COX-1/2, p22^{phox} et MnSOD) sauf la SIRT-1. Chez la souris athérosclérotique l'expression des COX est davantage présente, probablement dû au fait que l'athérosclérose favorise l'inflammation (Burleigh et al., 2005). Leur expression est

diminuée par le traitement avec la catéchine sauf pour la COX-2 qui est augmentée de manière importante par un traitement préventif primaire. Comme nous l'avions observé dans la première étude, l'augmentation de la COX-2 pourrait, dans certaines circonstances, permettre le maintien de la dilatation *via* la libération de PGI₂ (Gendron et al., 2007). Le rétablissement de la fonction endothéliale par le traitement préventif primaire pourrait donc être en partie dû à l'augmentation de l'expression de la COX-2. Ensuite, nous observons une augmentation de l'expression de l'ARNm de la p22^{phox} et une diminution de la MnSOD lors du vieillissement chez les souris athérosclérotiques. Ces changements ne sont pas observés chez les souris WT âgées. Ces résultats suggèrent que la production de ROS n'est pas importante chez les souris WT ou que la NADPH oxydase n'est pas une source de ROS. Il est intéressant d'observer que l'expression génique de ces enzymes est contraire chez les souris WT en comparaison aux souris athérosclérotiques. En effet, un traitement préventif primaire diminue l'expression génique de la p22^{phox} chez la souris athérosclérotique et l'augmente chez la souris WT. Nous émettons l'hypothèse que la forte augmentation chez la souris athérosclérotique (35 fois) est plus sensible au traitement antioxydant (réduction à 8 fois) que les niveaux observés chez les souris WT (2 fois à 12 mois). Nous croyons également que l'augmentation de la p22^{phox} observée chez les souris WT est une réponse compensatrice à la forte diminution du niveau de ROS induit par 9 mois de traitement avec la catéchine. Nous émettons l'hypothèse que l'augmentation de p22^{phox} permettrait de maintenir un niveau basal de ROS nécessaire au bon fonctionnement de l'endothélium. Finalement, un traitement préventif primaire augmente l'expression génique de la MnSOD chez la souris athérosclérotique et la diminue chez la souris WT. Comme mentionné précédemment, il est connu que l'expression de la MnSOD est affectée par le stade de la maladie (t Hoen et al., 2003; Luoma et al., 1998), suggérant qu'un traitement avec la catéchine pourrait produire des effets différents dans un contexte de vieillissement normal et de vieillissement associé à l'athérosclérose.

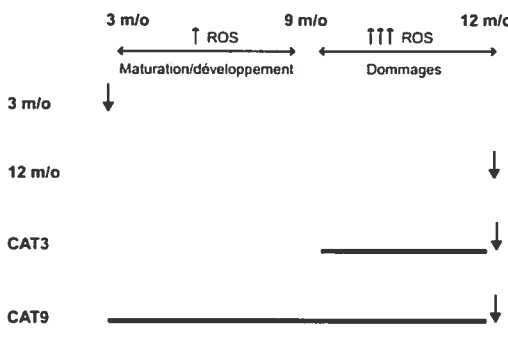
Finalement, il est à noter que l'expression génique de SIRT-1 n'est pas différente entre les deux études. En effet, ce gène a été utilisé dans les études comme marqueur

d'efficacité des traitements. Puisque SIRT-1 est un gène connu comme étant sensible à la catéchine, il est logique que son expression soit identique étant donné que les traitements étaient identiques dans les deux cas.

Figure 17. Schéma récapitulatif des études



Souris WT C57bl/6



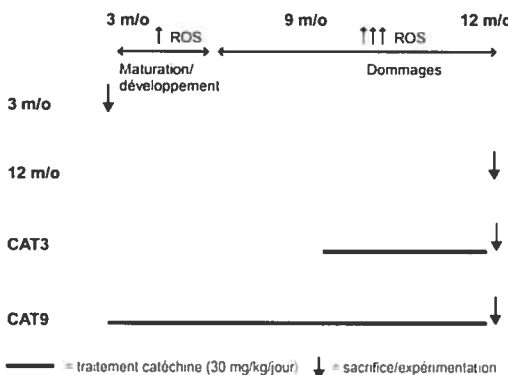
Dilatation maximale à l'ACh, contribution du NO et de l'EDHF

Diminution de la dilatation maximale et de la sensibilité à l'ACh, contribution de l'EDHF seulement, ↑ COX-2 ARNm, ↓ eNOS et SIRT-1 ARNm, ↑ adhésion des splénocytes, ↑ expression de CD18, ↑ clivage de CD62L et PSGL-1, ↑ expression de P-sélectine et ICAM-1

↑ dilatation maximale à l'ACh, ↑ NO et PGI₂, ↑↑ EDHF, ↑ sensibilité à l'ACh, ↓ adhésion des splénocytes, ↓ expression de CD18, clivage de CD62L et PSGL-1, ↓ P-sélectine et ICAM-1 sur l'endothélium, ↓ adhésion induite par l'histamine, ↓ COX-2 ARNm, ↑ SIRT-1 ARNm

↑ dilatation maximale à l'ACh, ↑ NO et PGI₂, ↑↑ EDHF, ↓ adhésion des splénocytes, ↓ clivage de CD62L, ↓ P-sélectine et ICAM-1 sur l'endothélium, ↑ eNOS, COX-2, p22^{cat}, SIRT-1 ARNm, ↓ MnSOD ARNm

Souris athérosclérotiques (LdLr^{-/-} ; hApoB^{+/+})



↓ dilatation maximale (= 12 m/o WT) et sensibilité à l'ACh

↓ dilatation maximale (= 3 m/o) et sensibilité à l'ACh, ↑ développement des plaques athérosclérotiques, ↑ adhésion des splénocytes, ↑ clivage de CD62L, ↑ p22^{cat}, et COXs ARNm, ↓ MnSOD et SIRT-1 ARNm

↓ sensibilité à l'ACh, ↑ NO, PGI₂ et EDHF, ↔ plaques athérosclérotiques, ↑↑↑ adhésion des splénocytes, ↑ clivage de CD62L, ↑ expression de CD18, ↑ MnSOD et SIRT-1 ARNm

↑ dilatation maximale et sensibilité à l'ACh, ↑ NO, PGI₂ et EDHF, ↓ plaques athérosclérotiques, limite les effets stimulateurs de l'histamine sur l'adhésion des splénocytes, ↓ expression de CD18, ↓ p22^{cat}, ↑ MnSOD et SIRT-1 ARNm, ↑↑↑ eNOS ARNm

6. Conclusion et perspectives

En conclusion, l'ensemble des études réalisées dans le cadre cette thèse démontre l'importance à plusieurs niveaux de la régulation serrée de l'environnement rédox. Les ROS participent aux dommages vasculaires rencontrés lors du vieillissement et de façon plus importante lorsque celui-ci est associé à la dyslipidémie ou à l'athérosclérose. En revanche, les ROS sont impliqués dans des processus physiologiques intervenant dans la maturation de l'endothélium vasculaire. Nous illustrons aussi l'importance de considérer l'âge et la condition pathologique des animaux dans l'étude de la fonction endothéliale, puisque celle-ci est dynamique et que les mécanismes impliqués évoluent. Finalement, étant donné cet aspect dynamique de l'endothélium vasculaire et des différents rôles que possèdent les ROS, il est primordial d'évaluer de manière critique l'effet des traitements antioxydants en considérant leur durée et le moment auquel ils sont initiés.

En perspective, comme nous avons observé une augmentation importante du gène de la SIRT-1 suite à un traitement avec la catéchine chez les souris WT et athérosclérotiques (Articles #3 et #4), il serait intéressant d'étudier la longévité de ces souris en les comparant à des souris sans traitement. Puisque que l'EDHF est considérablement favorisé par un traitement à la catéchine, il serait également intéressant d'étudier sa nature chez les souris traitées, sachant que celle-ci peut évoluer avec l'âge et la présence de facteurs de risque, tel que la dyslipidémie (Krummen et al., 2006; Krummen et al., 2005). Il serait aussi pertinent de mesurer directement l'effet des traitements avec la catéchine (primaire et secondaire) sur l'état rédox des artères provenant de souris WT et athérosclérotiques. Une autre avenue intéressante à étudier serait d'évaluer la pertinence de la production de TXA_2 et de ROS comme facteur prédictif de l'apparition d'une dysfonction endothéliale future dans différents contextes. Nous avons démontré dans le cadre de la deuxième étude que chez la souris WT ce phénomène survient 6 mois précédant l'apparition de la dysfonction endothéliale à 12 mois. Quant est-il des souris

dyslipidémiques ou athérosclérotiques, chez lesquelles la dysfonction apparaît à 6 et 3 mois, respectivement (Articles #1 et #4)?

7. Bibliographie

't Hoen, P.A., Van der Lans, C.A., Van Eck, M., Bijsterbosch, M.K., Van Berkel, T.J., Twisk, J., 2003. Aorta of ApoE-deficient mice responds to atherogenic stimuli by a prelesional increase and subsequent decrease in the expression of antioxidant enzymes. *Circulation research* 93, 262-269.

Abe, J., Berk, B.C., 1999. Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry* 274, 21003-21010.

Acker, H., 1994. Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism. *Respiration physiology* 95, 1-10.

Adamson, D.C., Wildemann, B., Sasaki, M., Glass, J.D., McArthur, J.C., Christov, V.I., Dawson, T.M., Dawson, V.L., 1996. Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41. *Science (New York, N.Y)* 274, 1917-1921.

Agarwal, R., Katiyar, S.K., Zaidi, S.I., Mukhtar, H., 1992. Inhibition of skin tumor promoter-caused induction of epidermal ornithine decarboxylase in SENCAR mice by polyphenolic fraction isolated from green tea and its individual epicatechin derivatives. *Cancer research* 52, 3582-3588.

Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S., Takada, Y., 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer research* 24, 2783-2840.

Ahmad, N., Feyes, D.K., Nieminen, A.L., Agarwal, R., Mukhtar, H., 1997. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *Journal of the National Cancer Institute* 89, 1881-1886.

Ahn, W.S., Huh, S.W., Bae, S.M., Lee, I.P., Lee, J.M., Namkoong, S.E., Kim, C.K., Sin, J.I., 2003. A major constituent of green tea, EGCG, inhibits the growth of a human cervical cancer cell line, CaSki cells, through apoptosis, G(1) arrest, and regulation of gene expression. *DNA and cell biology* 22, 217-224.

Aird, W.C., 2001. Vascular bed-specific hemostasis: role of endothelium in sepsis pathogenesis. *Critical care medicine* 29, S28-34; discussion S34-25.

Aird, W.C., 2007. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation research* 100, 158-173.

Aji, W., Ravalli, S., Szabolcs, M., Jiang, X.C., Sciacca, R.R., Michler, R.E., Cannon, P.J., 1997. L-arginine prevents xanthoma development and inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. *Circulation* 95, 430-437.

Akamine, E.H., Urakawa, T.A., de Oliveira, M.A., Nigro, D., de Carvalho, M.H., de Cassia, A.T.R., Fortes, Z.B., 2006. Decreased endothelium-dependent vasodilation in diabetic female rats: role of prostanoids. *Journal of vascular research* 43, 401-410.

Albelda, S.M., Smith, C.W., Ward, P.A., 1994. Adhesion molecules and inflammatory injury. *Faseb J* 8, 504-512.

Albina, J.E., Reichner, J.S., 1998. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer metastasis reviews* 17, 39-53.

Aldini, G., Carini, M., Piccoli, A., Rossoni, G., Facino, R.M., 2003. Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. *Life sciences* 73, 2883-2898.

Andersson, D.A., Zygmunt, P.M., Movahed, P., Andersson, T.L., Hogestatt, E.D., 2000. Effects of inhibitors of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels, inwardly-rectifying potassium channels and Na(+)/K(+) ATPase on EDHF relaxations in the rat hepatic artery. *British journal of pharmacology* 129, 1490-1496.

Andriambeloso, E., Kleschyov, A.L., Muller, B., Beretz, A., Stoclet, J.C., Andriantsitohaina, R., 1997. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *British journal of pharmacology* 120, 1053-1058.

Andriambeloso, E., Stoclet, J.C., Andriantsitohaina, R., 1999. Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *Journal of cardiovascular pharmacology* 33, 248-254.

Andrikopoulos, N.K., Kaliora, A.C., Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, V.P., 2002. Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against in vitro low-density lipoprotein oxidation. *Journal of medicinal food* 5, 1-7.

Annabi, B., Lachambre, M.P., Bousquet-Gagnon, N., Page, M., Gingras, D., Beliveau, R., 2002. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochimica et biophysica acta* 1542, 209-220.

Anselm, E., Chataigneau, M., Ndiaye, M., Chataigneau, T., Schini-Kerth, V.B., 2007. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. *Cardiovascular research* 73, 404-413.

Arends, M.J., Wyllie, A.H., 1991. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *International review of experimental pathology* 32, 223-254.

Atkinson, J.. 1998. [Aging of arterial extracellular matrix elastin: etiology and consequences]. *Pathologie-biologie* 46, 555-559.

Auch-Schwelk, W., Katusic, Z.S., Vanhoutte, P.M.. 1989. Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 13, 859-864.

Auch-Schwelk, W., Katusic, Z.S., Vanhoutte, P.M.. 1990. Thromboxane A2 receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension* 15, 699-703.

Auch-Schwelk, W., Katusic, Z.S., Vanhoutte, P.M.. 1992. Nitric oxide inactivates endothelium-derived contracting factor in the rat aorta. *Hypertension* 19, 442-445.

Babior, B.M., Lambeth, J.D., Nauseef, W.. 2002. The neutrophil NADPH oxidase. *Archives of biochemistry and biophysics* 397, 342-344.

Bachrach, U., Wang, Y.C.. 2002. Cancer therapy and prevention by green tea: role of ornithine decarboxylase. *Amino acids* 22, 1-13.

Ballinger, S.W., Patterson, C., Knight-Lozano, C.A., Burow, D.L., Conklin, C.A., Hu, Z., Reuf, J., Horaist, C., Lebovitz, R., Hunter, G.C., McIntyre, K., Runge, M.S., 2002. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation* 106, 544-549.

Banki, K., Hutter, E., Gonchoroff, N.J., Perl, A., 1999. Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling. *J Immunol* 162, 1466-1479.

Banks, M., Wei, C.M., Kim, C.H., Burnett, J.C., Jr., Miller, V.M., 1996. Mechanism of relaxations to C-type natriuretic peptide in veins. *The American journal of physiology* 271, H1907-1911.

Barlow, C., Hirotsume, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J.N., Ried, T., Tagle, D., Wynshaw-Boris, A., 1996. Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 86, 159-171.

Barlow, R.S., El-Mowafy, A.M., White, R.E., 2000. H₂O₂ opens BK(Ca) channels via the PLA₂-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. *American journal of physiology* 279, H475-483.

Barry-Lane, P.A., Patterson, C., van der Merwe, M., Hu, Z., Holland, S.M., Yeh, E.T., Runge, M.S., 2001. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. *The Journal of clinical investigation* 108, 1513-1522.

Barton, M., Cosentino, F., Brandes, R.P., Moreau, P., Shaw, S., Luscher, T.F., 1997. Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin. *Hypertension* 30, 817-824.

Baur, J.A., Sinclair, D.A., 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews* 5, 493-506.

Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A., 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 1620-1624.

Bedard, K., Krause, K.H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 87, 245-313.

Bentzon, J.F., Skovenborg, E., Hansen, C., Moller, J., de Gaulejac, N.S., Proch, J., Falk, E., 2001. Red wine does not reduce mature atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 103, 1681-1687.

Beny. J.L.. 1990. Endothelial and smooth muscle cells hyperpolarized by bradykinin are not dye coupled. *The American journal of physiology* 258. H836-841.

Beny. J.L.. Pacicca. C.. 1994. Bidirectional electrical communication between smooth muscle and endothelial cells in the pig coronary artery. *The American journal of physiology* 266. H1465-1472.

Bertelli. A.A.. Giovannini. L.. Giannessi. D.. Migliori. M.. Bernini. W.. Fregoni. M.. Bertelli. A.. 1995. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *International journal of tissue reactions* 17. 1-3.

Bjorksten. J.. 1968. The crosslinkage theory of aging. *Journal of the American Geriatrics Society* 16. 408-427.

Blackwell. K.A.. Sorenson. J.P.. Richardson. D.M.. Smith. L.A.. Suda. O.. Nath. K.. Katusic. Z.S.. 2004. Mechanisms of aging-induced impairment of endothelium-dependent relaxation: role of tetrahydrobiopterin. *American journal of physiology* 287. H2448-2453.

Bochaton-Piallat. M.L.. Gabbiani. F.. Ropraz. P.. Gabbiani. G.. 1993. Age influences the replicative activity and the differentiation features of cultured rat aortic smooth muscle cell populations and clones. *Arterioscler Thromb* 13. 1449-1455.

Boger. R.H.. Bode-Boger. S.M.. Szuba. A.. Tsao. P.S.. Chan. J.R.. Tangphao. O.. Blaschke. T.F.. Cooke. J.P.. 1998. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 98. 1842-1847.

Bolla. M.. You. D.. Loufrani. L.. Levy. B.I.. Levy-Toledano. S.. Habib. A.. Henrion. D.. 2004. Cyclooxygenase involvement in thromboxane-dependent contraction in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension* 43. 1264-1269.

Bracht, C., Yan, X.W., Brunner-LaRocca, H.P., Sutsch, G., Amann, F.W., Kiowski, W., 2001. Isradipine improves endothelium-dependent vasodilation in normotensive coronary artery disease patients with hypercholesterolemia. *Journal of hypertension* 19, 899-905.

Bradamante, S., Barenghi, L., Villa, A., 2004. Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovascular drug reviews* 22, 169-188.

Brakenhielm, E., Cao, R., Cao, Y., 2001. Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. *Faseb J* 15, 1798-1800.

Brandes, R.P., Barton, M., Philippens, K.M., Schweitzer, G., Mugge, A., 1997. Endothelial-derived superoxide anions in pig coronary arteries: evidence from lucigenin chemiluminescence and histochemical techniques. *The Journal of physiology* 500 (Pt 2), 331-342.

Brandes, R.P., Fleming, I., Busse, R., 2005. Endothelial aging. *Cardiovascular research* 66, 286-294.

Braun, A., Zhang, S., Miettinen, H.E., Ebrahim, S., Holm, T.M., Vasile, E., Post, M.J., Yoerger, D.M., Picard, M.H., Krieger, J.L., Andrews, N.C., Simons, M., Krieger, M., 2003. Probucol prevents early coronary heart disease and death in the high-density lipoprotein receptor SR-BI/apolipoprotein E double knockout mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7283-7288.

Brooks, C.J., Steel, G., Gilbert, J.D., Harland, W.A., 1971. Lipids of human atheroma. 4. Characterisation of a new group of polar sterol esters from human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 13, 223-237.

Brown, A.S., Moro, M.A., Masse, J.M., Cramer, E.M., Radomski, M., Darley-Usmar, V., 1998. Nitric oxide-dependent and independent effects on human platelets treated with peroxynitrite. *Cardiovascular research* 40, 380-388.

Brune, B., Gotz, C., Messmer, U.K., Sandau, K., Hirvonen, M.R., Lapetina, E.G., 1997. Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 272, 7253-7258.

Bucala, R., Cerami, A., 1992. Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging. *Advances in pharmacology* (San Diego, Calif 23, 1-34.

Bucala, R., Tracey, K.J., Cerami, A., 1991. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *The Journal of clinical investigation* 87, 432-438.

Bunn, H.F., Poyton, R.O., 1996. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiological reviews* 76, 839-885.

Burleigh, M.E., Babaev, V.R., Yancey, P.G., Major, A.S., McCaleb, J.L., Oates, J.A., Morrow, J.D., Fazio, S., Linton, M.F., 2005. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient and C57BL/6 mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* 39, 443-452.

Burnett, J.R., Huff, M.W., 2006. Cholesterol absorption inhibitors as a therapeutic option for hypercholesterolaemia. *Expert opinion on investigational drugs* 15, 1337-1351.

Burnham, M.P., Bychkov, R., Feletou, M., Richards, G.R., Vanhoutte, P.M., Weston, A.H., Edwards, G., 2002. Characterization of an apamin-sensitive small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in porcine coronary artery endothelium: relevance to EDHF. *British journal of pharmacology* 135, 1133-1143.

Busse, R., Edwards, G., Feletou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P.M., Weston, A.H., 2002. EDHF: bringing the concepts together. *Trends in pharmacological sciences* 23, 374-380.

Butcher, E.C., 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67, 1033-1036.

Buttery, L.D., Springall, D.R., Chester, A.H., Evans, T.J., Standfield, E.N., Parums, D.V., Yacoub, M.H., Polak, J.M., 1996. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Laboratory investigation: a journal of technical methods and pathology* 75, 77-85.

Bychkov, R., Burnham, M.P., Richards, G.R., Edwards, G., Weston, A.H., Feletou, M., Vanhoutte, P.M., 2002. Characterization of a charybdotoxin-sensitive intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel in porcine coronary endothelium: relevance to EDHF. *British journal of pharmacology* 137, 1346-1354.

Cai, H., 2005. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovascular research* 68, 26-36.

Cai, H., Harrison, D.G., 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research* 87, 840-844.

Camejo, G., Fager, G., Rosengren, B., Hurt-Camejo, E., Bondjers, G., 1993. Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 268, 14131-14137.

Cao, Y., Cao, R., 1999. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* 398, 381.

Cao, Y., Cao, R., Brakenhielm, E., 2002. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. *The Journal of nutritional biochemistry* 13, 380-390.

Cardillo, C., Kilcoyne, C.M., Cannon, R.O., 3rd, Quyyumi, A.A., Panza, J.A., 1997. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* 30, 57-63.

Carew, T.E., Schwenke, D.C., Steinberg, D., 1987. Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7725-7729.

Carley, A.N., Semeniuk, L.M., Shimoni, Y., Aasum, E., Larsen, T.S., Berger, J.P., Severson, D.L., 2004. Treatment of type 2 diabetic db/db mice with a novel PPARgamma agonist improves cardiac metabolism but not contractile function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E449-455.

Carluccio, M.A., Siculella, L., Ancora, M.A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., Visioli, F., Distanti, A., De Caterina, R., 2003. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, 622-629.

Carpenter, K.L., Taylor, S.E., Ballantine, J.A., Fussell, B., Halliwell, B., Mitchinson, M.J., 1993. Lipids and oxidised lipids in human atheroma and normal aorta. *Biochimica et biophysica acta* 1167, 121-130.

Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S.A., Zamzami, N., Marchetti, P., Macho, A., Kroemer, G., 1996. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 157, 512-521.

Chan, G.H., Fiscus, R.R., 2004. Exaggerated production of nitric oxide (NO) and increases in inducible NO-synthase mRNA levels induced by the pro-inflammatory cytokine interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells of elderly rats. *Experimental gerontology* 39, 387-394.

Chapple, I.L., 1997. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *Journal of clinical periodontology* 24, 287-296.

Chataigneau, T., Feletou, M., Duhault, J., Vanhoutte, P.M., 1998. Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *British journal of pharmacology* 123, 574-580.

Chauhan, S.D., Nilsson, H., Ahluwalia, A., Hobbs, A.J., 2003. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1426-1431.

Chen, C.C., Hsu, J.D., Wang, S.F., Chiang, H.C., Yang, M.Y., Kao, E.S., Ho, Y.C., Wang, C.J., 2003. Hibiscus sabdariffa extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Journal of agricultural and food chemistry* 51, 5472-5477.

Chen, J., Kuhlencordt, P.J., Astern, J., Gyurko, R., Huang, P.L., 2001. Hypertension does not account for the accelerated atherosclerosis and development of aneurysms in male apolipoprotein e/endothelial nitric oxide synthase double knockout mice. *Circulation* 104, 2391-2394.

Chen, W.C., Hayakawa, S., Shimizu, K., Chien, C.T., Lai, M.K., 2004. Catechins prevents substance P-induced hyperactive bladder in rats via the downregulation of ICAM and ROS. *Neuroscience letters* 367, 213-217.

Cheung, D.W., Chen, G., 1992. Calcium activation of hyperpolarization response to acetylcholine in coronary endothelial cells. *Journal of cardiovascular pharmacology* 20 Suppl 12, S120-123.

Cheyrier, V., 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American journal of clinical nutrition* 81, 223S-229S.

Chin, M., Isono, M., Isshiki, K., Araki, S., Sugimoto, T., Guo, B., Sato, H., Haneda, M., Kashiwagi, A., Koya, D., 2005. Estrogen and raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, ameliorate renal damage in db/db mice. *The American journal of pathology* 166, 1629-1636.

Cho, C.G., Kim, H.J., Chung, S.W., Jung, K.J., Shim, K.H., Yu, B.P., Yodoi, J., Chung, H.Y., 2003. Modulation of glutathione and thioredoxin systems by calorie restriction during the aging process. *Experimental gerontology* 38, 539-548.

Choi, J.Y., Park, C.S., Kim, D.J., Cho, M.H., Jin, B.K., Pie, J.E., Chung, W.G., 2002. Prevention of nitric oxide-mediated 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease in mice by tea phenolic epigallocatechin 3-gallate. *Neurotoxicology* 23, 367-374.

Choi, Y.T., Jung, C.H., Lee, S.R., Bae, J.H., Baek, W.K., Suh, M.H., Park, J., Park, C.W., Suh, S.I., 2001. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Life sciences* 70, 603-614.

Chopra, M., Fitzsimons, P.E., Strain, J.J., Thurnham, D.I., Howard, A.N., 2000. Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting

plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations. *Clinical chemistry* 46, 1162-1170.

Chow, C.K.. 1988. Interrelationships of cellular antioxidant defense systems.. *Cellular Antioxidant Defense Mechanisms*, CRC Press.

Chung, H.Y., Song, S.H., Kim, H.J., Ikeno, Y., Yu, B.P., 1999. Modulation of renal xanthine oxidoreductase in aging: gene expression and reactive oxygen species generation. *The journal of nutrition, health & aging* 3, 19-23.

Chyu, K.Y., Babbidge, S.M., Zhao, X., Dandillaya, R., Rietveld, A.G., Yano, J., Dimayuga, P., Cercek, B., Shah, P.K., 2004. Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 109, 2448-2453.

Ciabattoni, G., Pugliese, F., Davi, G., Pierucci, A., Simonetti, B.M., Patrono, C., 1989. Fractional conversion of thromboxane B2 to urinary 11-dehydrothromboxane B2 in man. *Biochimica et biophysica acta* 992, 66-70.

Cliff, W.J., 1970. The aortic tunica media in aging rats. *Experimental and molecular pathology* 13, 172-189.

Cohen, J.J., Duke, R.C., Fadok, V.A., Sellins, K.S., 1992. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annual review of immunology* 10, 267-293.

Coleman, D.L., 1978. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14, 141-148.

Coleman, H.A., Tare, M., Parkington, H.C., 2001. EDHF is not K⁺ but may be due to spread of current from the endothelium in guinea pig arterioles. *American journal of physiology* 280, H2478-2483.

Coleman. R.A., Smith, W.L., Narumiya, S., 1994. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacological reviews* 46, 205-229.

Cooke, J.P., 2000. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20, 2032-2037.

Corder, R., Douthwaite, J.A., Lees, D.M., Khan, N.Q., Viseu Dos Santos, A.C., Wood, E.G., Carrier, M.J., 2001. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature* 414, 863-864.

Corriu, C., Feletou, M., Canet, E., Vanhoutte, P.M., 1996. Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *British journal of pharmacology* 119, 959-964.

Crespy, V., Williamson, G., 2004. A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *The Journal of nutrition* 134, 3431S-3440S.

Csiszar, A., Ungvari, Z., Edwards, J.G., Kaminski, P., Wolin, M.S., Koller, A., Kaley, G., 2002. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circulation research* 90, 1159-1166.

Cynshi, O., Kawabe, Y., Suzuki, T., Takashima, Y., Kaise, H., Nakamura, M., Ohba, Y., Kato, Y., Tamura, K., Hayasaka, A., Higashida, A., Sakaguchi, H., Takeya, M., Takahashi, K., Inoue, K., Noguchi, N., Niki, E., Kodama, T., 1998. Antiatherogenic effects of the antioxidant BO-653 in three different animal models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10123-10128.

Cyrus, T., Witztum, J.L., Rader, D.J., Tangirala, R., Fazio, S., Linton, M.F., Funk, C.D., 1999. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* 103, 1597-1604.

da Luz, P.L., Serrano Junior, C.V., Chacra, A.P., Monteiro, H.P., Yoshida, V.M., Furtado, M., Ferreira, S., Gutierrez, P., Pileggi, F., 1999. The effect of red wine on experimental atherosclerosis: lipid-independent protection. *Experimental and molecular pathology* 65, 150-159.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A., 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry* 52, 601-623.

Darley-Usmar, V., White, R., 1997. Disruption of vascular signalling by the reaction of nitric oxide with superoxide: implications for cardiovascular disease. *Experimental physiology* 82, 305-316.

De Caterina, R., Libby, P., Peng, H.B., Thannickal, V.J., Rajavashisth, T.B., Gimbrone, M.A., Jr., Shin, W.S., Liao, J.K., 1995. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *The Journal of clinical investigation* 96, 60-68.

de la Lastra, C.A., Villegas, I., 2005. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. *Molecular nutrition & food research* 49, 405-430.

de Nigris, F., Tajana, G., Condorelli, M., D'Armiento, F.P., Sica, G., Lerman, L.O., Napoli, C., 2003. Glycoxidation of low-density lipoprotein increases TUNEL positivity and CPP32 activation in human coronary cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1010, 710-715.

de Wit, C., Roos, F., Bolz, S.S., Kirchhoff, S., Kruger, O., Willecke, K., Pohl, U., 2000. Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice. *Circulation research* 86, 649-655.

de Wit. C., Roos. F., Bolz. S.S., Pohl, U., 2003. Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. *Physiological genomics* 13. 169-177.

Delpy. E., Coste. H., Gouville. A.C., 1996. Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *British journal of pharmacology* 119. 471-478.

Demetrius. L., 2006. Aging in mouse and human systems: a comparative study. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1067, 66-82.

Denninger. J.W., Marletta. M.A., 1999. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et biophysica acta* 1411, 334-350.

Deshpande. N.N., Sorescu. D., Seshiah. P., Ushio-Fukai. M., Akers. M., Yin. Q., Griending. K.K., 2002. Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. *Antioxidants & redox signaling* 4, 845-854.

Deshpande. S.S., Qi. B., Park. Y.C., Irani, K., 2003. Constitutive activation of rac1 results in mitochondrial oxidative stress and induces premature endothelial cell senescence. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, e1-6.

Deyama, T., Nishibe, S., Nakazawa, Y., 2001. Constituents and pharmacological effects of *Eucommia* and Siberian ginseng. *Acta pharmacologica Sinica* 22, 1057-1070.

Dhalla. N.S., Temsah. R.M., Netticadan, T., 2000. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of hypertension* 18, 655-673.

Diaz. M.N., Frei. B., Vita. J.A., Keaney, J.F., Jr., 1997. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *The New England journal of medicine* 337. 408-416.

Dong, F., Zhang, X., Yang, X., Esberg, L.B., Yang, H., Zhang, Z., Culver, B., Ren, J., 2006. Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient ob/ob obese mice. *The Journal of endocrinology* 188, 25-36.

Dora, K.A., Doyle, M.P., Duling, B.R., 1997. Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 6529-6534.

Doughty, J.M., Boyle, J.P., Langton, P.D., 2000. Potassium does not mimic EDHF in rat mesenteric arteries. *British journal of pharmacology* 130, 1174-1182.

Drexler, H., Hornig, B., 1999. Endothelial dysfunction in human disease. *Journal of molecular and cellular cardiology* 31, 51-60.

Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* 82, 47-95.

Drouin, A., Thorin-Trescases, N., Hamel, E., Falck, J.R., Thorin, E., 2007. Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H₂O₂ production in mouse cerebral arteries. *Cardiovascular research* 73, 73-81.

Dumont, A., Hehner, S.P., Hofmann, T.G., Ueffing, M., Droge, W., Schmitz, M.L., 1999. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene* 18, 747-757.

Edwards, G., Dora, K.A., Gardener, M.J., Garland, C.J., Weston, A.H., 1998. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396, 269-272.

Edwards. G., Feletou. M., Gardener. M.J., Thollon. C., Vanhoutte. P.M., Weston. A.H., 1999. Role of gap junctions in the responses to EDHF in rat and guinea-pig small arteries. *British journal of pharmacology* 128, 1788-1794.

Edwards. G., Weston. A.H., 2004. Potassium and potassium currents in endothelium-dependent hyperpolarizations. *Pharmacol Res* 49, 535-541.

Egashira. K., Inou. T., Hirooka, Y., Kai, H., Sugimachi, M., Suzuki. S., Kuga, T., Urabe, Y., Takeshita. A., 1993. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. *Circulation* 88, 77-81.

Eichler. I., Wibawa. J., Grgic. I., Knorr. A., Brakemeier. S., Pries. A.R., Hoyer. J., Kohler. R., 2003. Selective blockade of endothelial Ca^{2+} -activated small- and intermediate-conductance K^{+} -channels suppresses EDHF-mediated vasodilation. *British journal of pharmacology* 138, 594-601.

Eiserich. J.P., Hristova. M., Cross. C.E., Jones. A.D., Freeman. B.A., Halliwell. B., van der Vliet. A., 1998. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391, 393-397.

El Bedoui. J., Oak, M.H., Anglard, P., Schini-Kerth, V.B., 2005. Catechins prevent vascular smooth muscle cell invasion by inhibiting MT1-MMP activity and MMP-2 expression. *Cardiovascular research* 67, 317-325.

Ellis. A., Pannirselvam. M., Anderson, T.J., Triggle. C.R., 2003. Catalase has negligible inhibitory effects on endothelium-dependent relaxations in mouse isolated aorta and small mesenteric artery. *British journal of pharmacology* 140, 1193-1200.

Ellis. A., Triggle. C.R., 2003. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 81, 1013-1028.

Ellis, E.F., Oelz, O., Roberts, L.J., 2nd, Payne, N.A., Sweetman, B.J., Nies, A.S., Oates, J.A., 1976. Coronary arterial smooth muscle contraction by a substance released from platelets: evidence that it is thromboxane A₂. *Science (New York, N.Y)* 193, 1135-1137.

Ellis, R.E., Yuan, J.Y., Horvitz, H.R., 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annual review of cell biology* 7, 663-698.

Emerson, G.G., Segal, S.S., 2000a. Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role in vasomotor control. *Circulation research* 87, 474-479.

Emerson, G.G., Segal, S.S., 2000b. Endothelial cell pathway for conduction of hyperpolarization and vasodilation along hamster feed artery. *Circulation research* 86, 94-100.

Engler, M.M., Engler, M.B., Malloy, M.J., Chiu, E.Y., Schloetter, M.C., Paul, S.M., Stuehlinger, M., Lin, K.Y., Cooke, J.P., Morrow, J.D., Ridker, P.M., Rifai, N., Miller, E., Witztum, J.L., Mietus-Snyder, M., 2003. Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia: Endothelial Assessment of Risk from Lipids in Youth (EARLY) Trial. *Circulation* 108, 1059-1063.

Esper, R.J., 1998. The role of lipid-lowering therapy in multiple risk factor management. *Drugs* 56 Suppl 1, 1-7: discussion 33.

Esteve, J.M., Mompou, J., Garcia de la Asuncion, J., Sastre, J., Asensi, M., Boix, J., Vina, J.R., Vina, J., Pallardo, F.V., 1999. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *Faseb J* 13, 1055-1064.

Faraci, F.M., 2006. Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone. *J Appl Physiol* 100, 739-743.

Faraci, F.M., Sobey, C.G., Chrissobolis, S., Lund, D.D., Heistad, D.D., Weintraub, N.L., 2001. Arachidonate dilates basilar artery by lipoxygenase-dependent mechanism and activation of K(+) channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R246-253.

Favot, L., Martin, S., Keravis, T., Andriantsitohaina, R., Lugnier, C., 2003. Involvement of cyclin-dependent pathway in the inhibitory effect of delphinidin on angiogenesis. *Cardiovascular research* 59, 479-487.

Feletou, M., Vanhoutte, P.M., 2006. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 1215-1225.

Félétou, M., Vanhoutte, P.M., 2006. EDHF: The complete story. Boca Raton, Taylor & Francis CRC Press, 1-298.

Feng, D., Nagy, J.A., Dvorak, H.F., Dvorak, A.M., 2002. Ultrastructural studies define soluble macromolecular, particulate, and cellular transendothelial cell pathways in venules, lymphatic vessels, and tumor-associated microvessels in man and animals. *Microscopy research and technique* 57, 289-326.

Feng, D., Nagy, J.A., Hipp, J., Pyne, K., Dvorak, H.F., Dvorak, A.M., 1997. Reinterpretation of endothelial cell gaps induced by vasoactive mediators in guinea-pig, mouse and rat: many are transcellular pores. *The Journal of physiology* 504 (Pt 3), 747-761.

Feng, L., Xia, Y., Garcia, G.E., Hwang, D., Wilson, C.B., 1995. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *The Journal of clinical investigation* 95, 1669-1675.

Ferrara, N., Davis-Smyth, T., 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews* 18, 4-25.

Ferrini, M.G., Davila, H.H., Valente, E.G., Gonzalez-Cadavid, N.F., Rajfer, J., 2004. Aging-related induction of inducible nitric oxide synthase is vasculo-protective to the arterial media. *Cardiovascular research* 61, 796-805.

Ferroni, P., Basili, S., Falco, A., Davi, G., 2004. Oxidant stress and platelet activation in hypercholesterolemia. *Antioxidants & redox signaling* 6, 747-756.

Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.

Fisher, A.B., Forman, H.J., Glass, M., 1984. Mechanisms of pulmonary oxygen toxicity. *Lung* 162, 255-259.

Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D.R., Fleming, I., Busse, R., 1999. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 401, 493-497.

Fleming, I., 2004. Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s). *Pharmacol Res* 49, 525-533.

Fleming, I., Bauersachs, J., Busse, R., 1996. Paracrine functions of the coronary vascular endothelium. *Molecular and cellular biochemistry* 157, 137-145.

Fleming, I., Bauersachs, J., Busse, R., 1997. Calcium-dependent and calcium-independent activation of the endothelial NO synthase. *Journal of vascular research* 34, 165-174.

Fleming, I., Busse, R., 1999. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovascular research* 43, 532-541.

Fleming, I., Michaelis, U.R., Bredenkotter, D., Fisslthaler, B., Dehghani, F., Brandes, R.P., Busse, R., 2001. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase

(Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circulation research* 88, 44-51.

Forstermann, U., Munzel, T., 2006. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113, 1708-1714.

Fotsis, T., Pepper, M.S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wahala, K., Montesano, R., Schweigerer, L., 1997. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer research* 57, 2916-2921.

Frank, P.G., Lisanti, M.P., 2004. Caveolin-1 and caveolae in atherosclerosis: differential roles in fatty streak formation and neointimal hyperplasia. *Current opinion in lipidology* 15, 523-529.

Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E., Kinsella, J.E., 1993a. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341, 454-457.

Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Kinsella, J.E., 1993b. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 341, 1103-1104.

Freedman, J.E., Parker, C., 3rd, Li, L., Perlman, J.A., Frei, B., Ivanov, V., Deak, L.R., Iafrafi, M.D., Folts, J.D., 2001. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation* 103, 2792-2798.

Frenette, P.S., Wagner, D.D., 1996. Adhesion molecules--Part 1. *The New England journal of medicine* 334, 1526-1529.

Fu, S., Davies, M.J., Stocker, R., Dean, R.T., 1998. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *The Biochemical journal* 333 (Pt 3), 519-525.

Fukao, M., Hattori, Y., Kanno, M., Sakuma, I., Kitabatake, A., 1995. Thapsigargin- and cyclopiazonic acid-induced endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *British journal of pharmacology* 115, 987-992.

Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.

Furfaro, A.L., Menini, S., Patriarca, S., Pesce, C., Odetti, P., Cottalasso, D., Marinari, U.M., Pronzato, M.A., Traverso, N., 2005. HNE-dependent molecular damage in diabetic nephropathy and its possible prevention by N-acetyl-cysteine and oxerutin. *BioFactors (Oxford, England)* 24, 291-298.

Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., 1999. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes & development* 13, 1055-1066.

Galis, Z.S., Khatri, J.J., 2002. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circulation research* 90, 251-262.

Garbisa, S., Biggin, S., Cavallarin, N., Sartor, L., Benelli, R., Albini, A., 1999. Tumor invasion: molecular shears blunted by green tea. *Nature medicine* 5, 1216.

Garcia, X., Stein, F., 2006. Nitric oxide. *Seminars in pediatric infectious diseases* 17, 55-57.

Garg, A., Simha, V., 2007. Update on dyslipidemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92, 1581-1589.

Ge, T., Hughes, H., Junquero, D.C., Wu, K.K., Vanhoutte, P.M., Boulanger, C.M., 1995. Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression

of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H₂ in the SHR aorta. *Circulation research* 76, 1003-1010.

Geary, G.G., Buchholz, J.N., 2003. Selected contribution: Effects of aging on cerebrovascular tone and [Ca²⁺]_i. *J Appl Physiol* 95, 1746-1754.

Geer, J.C., Haust, M.D., 1972. Smooth muscle cells in atherosclerosis. *Monographs on atherosclerosis* 2, 1-140.

Gehm, B.D., McAndrews, J.M., Chien, P.Y., Jameson, J.L., 1997. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14138-14143.

Geiszt, M., Kopp, J.B., Varnai, P., Leto, T.L., 2000. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 8010-8014.

Gendron, M.E., Thorin-Trescases, N., Villeneuve, L., Thorin, E., 2007. Aging associated with mild dyslipidemia reveals that COX-2 preserves dilation despite endothelial dysfunction. *American journal of physiology* 292, H451-458.

Gendron, M.E., Thorin, E., 2007. A change in the redox environment and thromboxane A₂ production precede endothelial dysfunction in mice. *American journal of physiology*.

Geng, Y.J., Libby, P., 1995. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *The American journal of pathology* 147, 251-266.

Genova, M.L., Pich, M.M., Biondi, A., Bernacchia, A., Falasca, A., Bovina, C., Formigini, G., Parenti Castelli, G., Lenaz, G., 2003. Mitochondrial production of oxygen

radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J) 228, 506-513.

George, J., Afek, A., Shaish, A., Levkovitz, H., Bloom, N., Cyrus, T., Zhao, L., Funk, C.D., Sigal, E., Harats, D., 2001. 12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 104, 1646-1650.

Gerrity, R.G., Cliff, W.J., 1972. The aortic tunica intima in young and aging rats. *Experimental and molecular pathology* 16, 382-402.

Getz, G.S., Reardon, C.A., 2006. Diet and murine atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 242-249.

Gilber, J.D., Harland, W.A., Steel, G., Brooks, C.J., 1969. The isolation and identification of 5 alpha-cholestan-3 beta-ol from the human atheromatous aorta. *Biochimica et biophysica acta* 187, 453-456.

Glavind, J., Hartmann, S., Clemmesen, J., Jessen, K.E., Dam, H., 1952. Studies on the role of lipoperoxides in human pathology. II. The presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aorta. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 30, 1-6.

Gluais, P., Edwards, G., Weston, A.H., Falck, J.R., Vanhoutte, P.M., Feletou, M., 2005a. Role of SK(Ca) and IK(Ca) in endothelium-dependent hyperpolarizations of the guinea-pig isolated carotid artery. *British journal of pharmacology* 144, 477-485.

Gluais, P., Edwards, G., Weston, A.H., Vanhoutte, P.M., Feletou, M., 2005b. Hydrogen peroxide and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *European journal of pharmacology* 513, 219-224.

Gluais, P., Lonchampt, M., Morrow, J.D., Vanhoutte, P.M., Feletou, M., 2005c. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *British journal of pharmacology* 146, 834-845.

Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G., Russell, D.W., Schneider, W.J., 1985. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annual review of cell biology* 1, 1-39.

Gorlach, A., Brandes, R.P., Nguyen, K., Amidi, M., Dehghani, F., Busse, R., 2000. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circulation research* 87, 26-32.

Gotoh, S., Ogihara, T., Nakamaru, M., Masuo, K., Hata, T., Kumahara, Y., 1983. Effect of aging on 6-keto-PGF1 alpha levels in normotensive and essential hypertensive males. *Japanese circulation journal* 47, 309-312.

Govers, R., Rabelink, T.J., 2001. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280, F193-206.

Grady, D., Applegate, W., Bush, T., Furberg, C., Riggs, B., Hulley, S.B., 1998. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS): design, methods, and baseline characteristics. *Controlled clinical trials* 19, 314-335.

Graham, A., Hogg, N., Kalyanaraman, B., O'Leary, V., Darley-Usmar, V., Moncada, S., 1993. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS letters* 330, 181-185.

Graves, J.E., Bates, J.N., Kooy, N.W., Lewis, S.J., 2005. Vasodilator actions of the endothelium-derived relaxing factor L-S-nitrosocysteine in anaesthetized rats are markedly diminished by peroxynitrite. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 32, 1137-1141.

Griendling, K.K., Alexander, R.W., 1997. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 96, 3264-3265.

Griendling, K.K., Sorescu, D., Ushio-Fukai, M., 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation research* 86, 494-501.

Guarente, L., Picard, F., 2005. Calorie restriction--the SIR2 connection. *Cell* 120, 473-482.

Haddy, F.J., Vanhoutte, P.M., Feletou, M., 2006. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290, R546-552.

Hajjar, D.P., Haberland, M.E., 1997. Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and cellular saboteurs. *The Journal of biological chemistry* 272, 22975-22978.

Hakim, I.A., Harris, R.B., Brown, S., Chow, H.H., Wiseman, S., Agarwal, S., Talbot, W., 2003. Effect of increased tea consumption on oxidative DNA damage among smokers: a randomized controlled study. *The Journal of nutrition* 133, 3303S-3309S.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free radicals in biology and medicine*.

Halushka, P.V., Reines, H.D., Barrow, S.E., Blair, I.A., Dollery, C.T., Rambo, W., Cook, J.A., Wise, W.C., 1985. Elevated plasma 6-keto-prostaglandin F1 alpha in patients in septic shock. *Critical care medicine* 13, 451-453.

Hamberg, M., Svensson, J., Samuelsson, B., 1975. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 2994-2998.

Hamilton, C.A., Brosnan, M.J., McIntyre, M., Graham, D., Dominiczak, A.F., 2001. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 37, 529-534.

Han. J., Hajar. D.P., Febbraio. M., Nicholson. A.C., 1997. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *The Journal of biological chemistry* 272, 21654-21659.

Handa. O., Naito, Y., Takagi, T., Ishikawa, T., Ueda, M., Matsumoto, N., Kokura, S., Ichikawa, H., Yoshida, N., Shimoi, K., Yoshikawa, T., 2002. Inhibitory effects of catechins on neutrophil-dependent gastric inflammation. *Redox Rep* 7, 324-328.

Hanukoglu, I., 2006. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug metabolism reviews* 38, 171-196.

Harland. W.A., Gilbert, J.D., Steel, G., Brooks, C.J., 1971. Lipids of human atheroma. 5. The occurrence of a new group of polar sterol esters in various stages of human atherosclerosis. *Atherosclerosis* 13, 239-246.

Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* 11, 298-300.

Harman, D., 1993. Free radical involvement in aging. *Pathophysiology and therapeutic implications. Drugs & aging* 3, 60-80.

Harman, D., 2003. The free radical theory of aging. *Antioxidants & redox signaling* 5, 557-561.

Hatake, K., Kakishita, E., Wakabayashi, I., Sakiyama, N., Hishida, S., 1990. Effect of aging on endothelium-dependent vascular relaxation of isolated human basilar artery to thrombin and bradykinin. *Stroke: a journal of cerebral circulation* 21, 1039-1043.

Hathaway, C.A., Heistad, D.D., Piegor, D.J., Miller, F.J., Jr., 2002. Regression of atherosclerosis in monkeys reduces vascular superoxide levels. *Circulation research* 90, 277-283.

Hatoum, O.A., Binion, D.G., Miura, H., Telford, G., Otterson, M.F., Gutterman, D.D., 2005. Role of hydrogen peroxide in ACh-induced dilation of human submucosal intestinal microvessels. *American journal of physiology* 288, H48-54.

Hayek, T., Fuhrman, B., Vaya, J., Rosenblat, M., Belinky, P., Coleman, R., Elis, A., Aviram, M., 1997. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17, 2744-2752.

Hayflick, L., 1985. Theories of biological aging. *Experimental gerontology* 20, 145-159.

Hazen, S.L., Zhang, R., Shen, Z., Wu, W., Podrez, E.A., MacPherson, J.C., Schmitt, D., Mitra, S.N., Mukhopadhyay, C., Chen, Y., Cohen, P.A., Hoff, H.F., Abu-Soud, H.M., 1999. Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes: pathways for monocyte-mediated protein nitration and lipid peroxidation *In vivo*. *Circulation research* 85, 950-958.

Heinecke, J.W., 1999. Mass spectrometric quantification of amino acid oxidation products in proteins: insights into pathways that promote LDL oxidation in the human artery wall. *FASEB J* 13, 1113-1120.

Heinecke, J.W., Li, W., Francis, G.A., Goldstein, J.A., 1993. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. *The Journal of clinical investigation* 91, 2866-2872.

Hennet, T., Richter, C., Peterhans, E., 1993. Tumour necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells. *The Biochemical journal* 289 (Pt 2), 587-592.

Hertog, M.G., Hollman, P.C., Katan, M.B., Kromhout, D., 1993. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutrition and cancer* 20, 21-29.

Hertog, M.G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., et al., 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of internal medicine* 155, 381-386.

Hertog, M.G., Sweetnam, P.M., Fehily, A.M., Elwood, P.C., Kromhout, D., 1997. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *The American journal of clinical nutrition* 65, 1489-1494.

Heymes, C., Habib, A., Yang, D., Mathieu, E., Marotte, F., Samuel, J., Boulanger, C.M., 2000. Cyclo-oxygenase-1 and -2 contribution to endothelial dysfunction in ageing. *British journal of pharmacology* 131, 804-810.

Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251.

Hogg, N., Darley-Usmar, V.M., Graham, A., Moncada, S., 1993. Peroxynitrite and atherosclerosis. *Biochemical Society transactions* 21, 358-362.

Holliday, R., 1995. *Understanding Aging*. Cambridge University Press, New York.

Holliday, R., 2006. Aging is no longer an unsolved problem in biology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1067, 1-9.

Hongo, K., Nakagomi, T., Kassell, N.F., Sasaki, T., Lehman, M., Vollmer, D.G., Tsukahara, T., Ogawa, H., Torner, J., 1988. Effects of aging and hypertension on endothelium-dependent vascular relaxation in rat carotid artery. *Stroke: a journal of cerebral circulation* 19, 892-897.

Hoover, G.A., Nicolosi, R.J., Camp, R.R., Hayes, K.C., 1982. Characteristics of the aortic intima in young and old cebus and squirrel monkeys. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)* 2, 252-265.

Hornych, A., Forette, F., Bariety, J., Krief, C., Aumont, J., Paris, M., 1991. The influence of age on renal prostaglandin synthesis in man. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 43, 191-195.

Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., Scherer, B., Sinclair, D.A., 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191-196.

Hsieh, T.C., Juan, G., Darzynkiewicz, Z., Wu, J.M., 1999. Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21(WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2. *Cancer research* 59, 2596-2601.

Hu, J.P., Calomme, M., Lasure, A., De Bruyne, T., Pieters, L., Vlietinck, A., Vanden Berghe, D.A., 1995. Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. *Biological trace element research* 47, 327-331.

Hug, H., Enari, M., Nagata, S., 1994. No requirement of reactive oxygen intermediates in Fas-mediated apoptosis. *FEBS letters* 351, 311-313.

Huie, R.E., Padmaja, S., 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free radical research communications* 18, 195-199.

Hynes, R.O., Wagner, D.D., 1996. Genetic manipulation of vascular adhesion molecules in mice. *The Journal of clinical investigation* 98, 2193-2195.

Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., Chaudhry, G., 1987. Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 9265-9269.

Ignarro, L.J., Kadowitz, P.J., 1985. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annual review of pharmacology and toxicology* 25, 171-191.

Iijima, K., Yoshizumi, M., Hashimoto, M., Akishita, M., Kozaki, K., Ako, J., Watanabe, T., Ohike, Y., Son, B., Yu, J., Nakahara, K., Ouchi, Y., 2002. Red wine polyphenols inhibit vascular smooth muscle cell migration through two distinct signaling pathways. *Circulation* 105, 2404-2410.

Iijima, K., Yoshizumi, M., Hashimoto, M., Kim, S., Eto, M., Ako, J., Liang, Y.Q., Sudoh, N., Hosoda, K., Nakahara, K., Toba, K., Ouchi, Y., 2000. Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation* 101, 805-811.

Innes, A.J., Kennedy, G., McLaren, M., Bancroft, A.J., Belch, J.J., 2003. Dark chocolate inhibits platelet aggregation in healthy volunteers. *Platelets* 14, 325-327.

Isemura, M., Saeki, K., Kimura, T., Hayakawa, S., Minami, T., Sazuka, M., 2000. Tea catechins and related polyphenols as anti-cancer agents. *BioFactors (Oxford, England)* 13, 81-85.

Ishibashi, S., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Herz, J., Burns, D.K., 1994. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *The Journal of clinical investigation* 93, 1885-1893.

Isles, C.G., Paterson, J.R., 2000. Identifying patients at risk for coronary heart disease: implications from trials of lipid-lowering drug therapy. *Qjm* 93, 567-574.

Ismail, N.A., Alavi, M.Z., Moore, S., 1994. Lipoprotein-proteoglycan complexes from injured rabbit aortas accelerate lipoprotein uptake by arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 105, 79-87.

Jacob, M.P., 2003. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 57, 195-202.

Jacobson, M.D., Burne, J.F., Raff, M.C., 1994. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *The EMBO journal* 13, 1899-1910.

Jager, U., Nguyen-Duong, H., 1999. Relaxant effect of trans-resveratrol on isolated porcine coronary arteries. *Arzneimittel-Forschung* 49, 207-211.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M., 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science (New York, N.Y)* 275, 218-220.

Jarasch, E.D., Grund, C., Bruder, G., Heid, H.W., Keenan, T.W., Franke, W.W., 1981. Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell* 25, 67-82.

Jasmin, J.F., Lucas, M., Cernacek, P., Dupuis, J., 2001. Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 103, 314-318.

Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Garsetti, M., Rosenberg-Zand, R.S., Jackson, C.J., Agarwal, S., Rao, A.V., Diamandis, E.P., Parker, T., Faulkner, D., Vuksan, V., Vidgen, E., 2000. Effect of soy protein foods on low-density lipoprotein oxidation and ex vivo sex hormone receptor activity--a controlled crossover trial. *Metabolism: clinical and experimental* 49, 537-543.

Jenner, P., 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 53 Suppl 3, S26-36: discussion S36-28.

Jeon, S.Y., Bae, K., Seong, Y.H., Song, K.S., 2003. Green tea catechins as a BACE1 (beta-secretase) inhibitor. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 13, 3905-3908.

Johns, A., Freay, A.D., Adams, D.J., Lategan, T.W., Ryan, U.S., van Breemen, C., 1988. Role of calcium in the activation of endothelial cells. *Journal of cardiovascular pharmacology* 12 Suppl 5, S119-123.

Johnson, T.M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Lowenstein, R.A., Finkel, T., 1996. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11848-11852.

Jung, O., Schreiber, J.G., Geiger, H., Pedrazzini, T., Busse, R., Brandes, R.P., 2004. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation* 109, 1795-1801.

Junqueira, V.B., Barros, S.B., Chan, S.S., Rodrigues, L., Giavarotti, L., Abud, R.L., Deucher, G.P., 2004. Aging and oxidative stress. *Molecular aspects of medicine* 25, 5-16.

Kalinina, N., Agrotis, A., Tararak, E., Antropova, Y., Kanellakis, P., Ilyinskaya, O., Quinn, M.T., Smirnov, V., Bobik, A., 2002. Cytochrome b558-dependent NAD(P)H oxidase-phox units in smooth muscle and macrophages of atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22, 2037-2043.

Kaplan, S., Morgan, J.A., Bisleri, G., Cheema, F.H., Akman, H.O., Topkara, V.K., Oz, M.C., 2005. Effects of resveratrol in storage solution on adhesion molecule expression and nitric oxide synthesis in vein grafts. *The Annals of thoracic surgery* 80, 1773-1778.

Katusic, Z.S., Vanhoutte, P.M., 1989. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *The American journal of physiology* 257, H33-37.

Kawano, H., Motoyama, T., Hirai, N., Kugiyama, K., Yasue, H., Ogawa, H., 2002. Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is improved by L-arginine administration: possible role of oxidative stress. *Atherosclerosis* 161, 375-380.

Kedzierski, R.M., Yanagisawa, M., 2001. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology* 41, 851-876.

Keisari, Y., Braun, L., Flescher, E., 1983. The oxidative burst and related phenomena in mouse macrophages elicited by different sterile inflammatory stimuli. *Immunobiology* 165, 78-89.

Keli, S.O., Hertog, M.G., Feskens, E.J., Kromhout, D., 1996. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Archives of internal medicine* 156, 637-642.

Khan, M.T., Furchgott, R.F., 1987. Additional evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. *In Pharmacology*, 341-344.

Khan, N.Q., Lees, D.M., Douthwaite, J.A., Carrier, M.J., Corder, R., 2002. Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells. *Clin Sci (Lond)* 103 Suppl 48. 72S-75S.

Khanduja, K.L., Bhardwaj, A., Kaushik, G., 2004. Resveratrol inhibits N-nitrosodiethylamine-induced ornithine decarboxylase and cyclooxygenase in mice. *Journal of nutritional science and vitaminology* 50. 61-65.

Kim, B.J., Kim, Y.K., Park, W.H., Ko, J.H., Lee, Y.C., Kim, C.H., 2003. A water-extract of the Korean traditional formulation Geiji-Bokryung-Hwan reduces atherosclerosis and hypercholesteremia in cholesterol-fed rabbits. *International immunopharmacology* 3. 723-734.

Kim, H.J., Jung, K.J., Yu, B.P., Cho, C.G., Chung, H.Y., 2002a. Influence of aging and calorie restriction on MAPKs activity in rat kidney. *Experimental gerontology* 37. 1041-1053.

Kim, H.J., Yu, B.P., Chung, H.Y., 2002b. Molecular exploration of age-related NF-kappaB/IKK downregulation by calorie restriction in rat kidney. *Free radical biology & medicine* 32. 991-1005.

Kimura, Y., Okuda, H., 2001. Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *The Journal of nutrition* 131. 1844-1849.

Kita, T., Nagano, Y., Yokode, M., Ishii, K., Kume, N., Ooshima, A., Yoshida, H., Kawai, C., 1987. Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84. 5928-5931.

Klebanoff, S.J., Vadas, M.A., Harlan, J.M., Sparks, L.H., Gamble, J.R., Agosti, J.M., Waltersdorff, A.M., 1986. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* 136, 4220-4225.

Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A., Maatela, J., 1996. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ (Clinical research ed)* 312, 478-481.

Korsmeyer, S.J., 1995. Regulators of cell death. *Trends Genet* 11, 101-105.

Koubova, J., Guarente, L., 2003. How does calorie restriction work? *Genes & development* 17, 313-321.

Kovacic, P., Jacintho, J.D., 2001. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Current medicinal chemistry* 8, 773-796.

Krieger, M., 1997. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Current opinion in lipidology* 8, 275-280.

Krieger, M., Acton, S., Ashkenas, J., Pearson, A., Penman, M., Resnick, D., 1993. Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors. *The Journal of biological chemistry* 268, 4569-4572.

Kritchevsky, D., Kim, H.K., Tepper, S.A., 1971. Influence of 4,4'-(isopropylidenedithio)bis(2,6-di-*t*-butylphenol) (DH-581) on experimental atherosclerosis in rabbits. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y)* 136, 1216-1221.

Kruk, P.A., Rampino, N.J., Bohr, V.A., 1995. DNA damage and repair in telomeres: relation to aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 258-262.

Krummen, S., Drouin, A., Gendron, M.E., Falck, J.R., Thorin, E., 2006. ROS-sensitive cytochrome P450 activity maintains endothelial dilatation in ageing but is transitory in dyslipidaemic mice. *British journal of pharmacology* 147, 897-904.

Krummen, S., Falck, J.R., Thorin, E., 2005. Two distinct pathways account for EDHF-dependent dilatation in the gracilis artery of dyslipidaemic hApoB^{+/+} mice. *British journal of pharmacology* 145, 264-270.

Kuhlencordt, P.J., Gyurko, R., Han, F., Scherrer-Crosbie, M., Aretz, T.H., Hajjar, R., Picard, M.H., Huang, P.L., 2001. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* 104, 448-454.

Kumari, M.V., Yoneda, T., Hiramatsu, M., 1996. Scavenging activity of "beta catechin" on reactive oxygen species generated by photosensitization of riboflavin. *Biochemistry and molecular biology international* 38, 1163-1170.

Küing, C.F., Lüscher, T.F., 1995. Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension* 25, 194-200.

Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., Iwasaki, H., Iida, A., Shiraki-Iida, T., Nishikawa, S., Nagai, R., Nabeshima, Y.I., 1997. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390, 45-51.

Kurosawa, T., Itoh, F., Nozaki, A., Nakano, Y., Katsuda, S., Osakabe, N., Tsubone, H., Kondo, K., Itakura, H., 2005. Suppressive effects of cacao liquor polyphenols (CLP) on LDL oxidation and the development of atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 179, 237-246.

Kwan, C.Y., Zhang, W.B., Deyama, T., Nishibe, S., 2004. Endothelium-dependent vascular relaxation induced by *Eucommia ulmoides* Oliv. bark extract is mediated by NO and EDHF in small vessels. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 369, 206-211.

Kyriakis, J.M., Avruch, J., 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological reviews* 81, 807-869.

Lacy, P.S., Pilkington, G., Hanvesakul, R., Fish, H.J., Boyle, J.P., Thurston, H., 2000. Evidence against potassium as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat mesenteric small arteries. *British journal of pharmacology* 129, 605-611.

Lan, R.S., Knight, D.A., Stewart, G.A., Henry, P.J., 2001. Role of PGE(2) in protease-activated receptor-1, -2 and -4 mediated relaxation in the mouse isolated trachea. *British journal of pharmacology* 132, 93-100.

Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S.R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S.M., Mitch, W.E., Harrison, D.G., 2003. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *The Journal of clinical investigation* 111, 1201-1209.

Landmesser, U., Harrison, D.G., 2001. Oxidant stress as a marker for cardiovascular events: Ox marks the spot. *Circulation* 104, 2638-2640.

Lapenna, D., de Gioia, S., Ciofani, G., Mezzetti, A., Ucchino, S., Calafiore, A.M., Napolitano, A.M., Di Ilio, C., Cuccurullo, F., 1998. Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 97, 1930-1934.

Laursen, J.B., Somers, M., Kurz, S., McCann, L., Warnholtz, A., Freeman, B.A., Tarpey, M., Fukai, T., Harrison, D.G., 2001. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-

deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 103, 1282-1288.

Lawson, J.A., Patrono, C., Ciabattoni, G., Fitzgerald, G.A., 1986. Long-lived enzymatic metabolites of thromboxane B2 in the human circulation. *Analytical biochemistry* 155, 198-205.

Leanderson, P., Faresjo, A.O., Tagesson, C., 1997. Green tea polyphenols inhibit oxidant-induced DNA strand breakage in cultured lung cells. *Free radical biology & medicine* 23, 235-242.

Lebel, M., Leder, P., 1998. A deletion within the murine Werner syndrome helicase induces sensitivity to inhibitors of topoisomerase and loss of cellular proliferative capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13097-13102.

Lee, G.H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J.I., Friedman, J.M., 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379, 632-635.

Lefer, D.J., Jones, S.P., Girod, W.G., Baines, A., Grisham, M.B., Cockrell, A.S., Huang, P.L., Scalia, R., 1999. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *The American journal of physiology* 276, H1943-1950.

Leikert, J.F., Rathel, T.R., Wohlfart, P., Cheynier, V., Vollmar, A.M., Dirsch, V.M., 2002. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 106, 1614-1617.

Lennon, E.A., Poyser, N.L., 1986. Effect of age on vascular prostaglandin production in male and female rats. *Prostaglandins, leukotrienes, and medicine* 25, 1-15.

Leto, T.L., Geiszt, M., 2006. Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. *Antioxidants & redox signaling* 8, 1549-1561.

Levites, Y., Amit, T., Mandel, S., Youdim, M.B., 2003. Neuroprotection and neurorescue against Abeta toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Faseb J* 17, 952-954.

Levites, Y., Weinreb, O., Maor, G., Youdim, M.B., Mandel, S., 2001. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *Journal of neurochemistry* 78, 1073-1082.

Lewis, S.J., Hoque, A., Walton, T.M., Kooy, N.W., 2005. Potential role of nitration and oxidation reactions in the effects of peroxynitrite on the function of beta-adrenoceptor sub-types in the rat. *European journal of pharmacology* 518, 187-194.

Li, H., Yuan, J., 1999. Deciphering the pathways of life and death. *Current opinion in cell biology* 11, 261-266.

Li, H.F., Chen, S.A., Wu, S.N., 2000. Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca(2+)-activated K⁺ current in vascular endothelial cells. *Cardiovascular research* 45, 1035-1045.

Li, P.L., Campbell, W.B., 1997. Epoxyeicosatrienoic acids activate K⁺ channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein. *Circulation research* 80, 877-884.

Li, Z., Cheng, H., Lederer, W.J., Froehlich, J., Lakatta, E.G., 1997. Enhanced proliferation and migration and altered cytoskeletal proteins in early passage smooth

muscle cells from young and old rat aortic explants. *Experimental and molecular pathology* 64, 1-11.

Li. Z., Froehlich. J., Galis. Z.S., Lakatta. E.G., 1999. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertension* 33, 116-123.

Li. Z., Li. L., Zielke. H.R., Cheng. L., Xiao. R., Crow, M.T., Stetler-Stevenson. W.G., Froehlich. J., Lakatta. E.G., 1996. Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *The American journal of pathology* 148, 121-128.

Libby. P., 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.

Libby. P., Ridker. P.M., Maseri. A., 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105, 1135-1143.

Lin. M.C., Almus-Jacobs. F., Chen. H.H., Parry, G.C., Mackman, N., Shyy. J.Y., Chien. S., 1997. Shear stress induction of the tissue factor gene. *The Journal of clinical investigation* 99, 737-744.

Lin. N., Sato. T., Takayama. Y., Mimaki. Y., Sashida. Y., Yano. M., Ito. A., 2003. Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochemical pharmacology* 65, 2065-2071.

Lin. S.J., Defossez. P.A., Guarente. L., 2000. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (New York, N.Y)* 289, 2126-2128.

Ling. S., Komesaroff. P., Sudhir. K., 2006. Cellular mechanisms underlying the cardiovascular actions of oestrogens. *Clin Sci (Lond)* 111, 107-118.

Liu, J.C., Chen, J.J., Chan, P., Cheng, C.F., Cheng, T.H., 2003. Inhibition of cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression by resveratrol. *Hypertension* 42, 1198-1205.

Liu, Y., Bubolz, A.H., Shi, Y., Newman, P.J., Newman, D.K., Gutterman, D.D., 2006. Peroxynitrite reduces the endothelium-derived hyperpolarizing factor component of coronary flow-mediated dilation in PECAM-1-knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290, R57-65.

Liu, Y., Gutterman, D.D., 2002a. The coronary circulation in diabetes: influence of reactive oxygen species on K⁺ channel-mediated vasodilation. *Vascular pharmacology* 38, 43-49.

Liu, Y., Gutterman, D.D., 2002b. Oxidative stress and potassium channel function. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 29, 305-311.

Liu, Y., Terata, K., Chai, Q., Li, H., Kleinman, L.H., Gutterman, D.D., 2002. Peroxynitrite inhibits Ca²⁺-activated K⁺ channel activity in smooth muscle of human coronary arterioles. *Circulation research* 91, 1070-1076.

Lopez-Collazo, E., Mateo, J., Miras-Portugal, M.T., Bosca, L., 1997. Requirement of nitric oxide and calcium mobilization for the induction of apoptosis in adrenal vascular endothelial cells. *FEBS letters* 413, 124-128.

Lorenz, M., Wessler, S., Follmann, E., Michaelis, W., Dusterhoft, T., Baumann, G., Stangl, K., Stangl, V., 2004. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *The Journal of biological chemistry* 279, 6190-6195.

Luckhoff, A., Pohl, U., Mulsch, A., Busse, R., 1988. Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. *British journal of pharmacology* 95, 189-196.

Luczaj, W., Waszkiewicz, E., Skrzydlewska, E., Roszkowska-Jakimiec, W., 2004. Green tea protection against age-dependent ethanol-induced oxidative stress. *Journal of toxicology and environmental health* 67, 595-606.

Ludwig, A., Lorenz, M., Grimbo, N., Steinle, F., Meiners, S., Bartsch, C., Stangl, K., Baumann, G., Stangl, V., 2004. The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 316, 659-665.

Lundberg, M.S., Crow, M.T., 1999. Age-related changes in the signaling and function of vascular smooth muscle cells. *Experimental gerontology* 34, 549-557.

Luoma, J.S., Stralin, P., Marklund, S.L., Hiltunen, T.P., Sarkioja, T., Yla-Herttuala, S., 1998. Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 18, 157-167.

Lyons, D., Roy, S., Patel, M., Benjamin, N., Swift, C.G., 1997. Impaired nitric oxide-mediated vasodilatation and total body nitric oxide production in healthy old age. *Clin Sci (Lond)* 93, 519-525.

Maiti, T.K., Chatterjee, J., Dasgupta, S., 2003. Effect of green tea polyphenols on angiogenesis induced by an angiogenin-like protein. *Biochemical and biophysical research communications* 308, 64-67.

Majno, G., Palade, G.E., 1961. Studies on inflammation. I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 11, 571-605.

Majno, G., Palade, G.E., Schoefl, G.I., 1961. Studies on inflammation. II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: a topographic study. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 11, 607-626.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 79, 727-747.

Mandel, S., Maor, G., Youdim, M.B., 2004. Iron and alpha-synuclein in the substantia nigra of MPTP-treated mice: effect of neuroprotective drugs R-apomorphine and green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Mol Neurosci* 24, 401-416.

Mantelli, L., Amerini, S., Ledda, F., 1995. Roles of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in vasorelaxant effect of acetylcholine as influenced by aging and hypertension. *Journal of cardiovascular pharmacology* 25, 595-602.

Mao, S.J., Yates, M.T., Parker, R.A., Chi, E.M., Jackson, R.L., 1991. Attenuation of atherosclerosis in a modified strain of hypercholesterolemic Watanabe rabbits with use of a probucol analogue (MDL 29,311) that does not lower serum cholesterol. *Arterioscler Thromb* 11, 1266-1275.

Marchenko, S.M., Sage, S.O., 1994. Smooth muscle cells affect endothelial membrane potential in rat aorta. *The American journal of physiology* 267, H804-811.

Marletta, M.A., 2001. Another activation switch for endothelial nitric oxide synthase: why does it have to be so complicated? *Trends in biochemical sciences* 26, 519-521.

Marrelli, S.P., Eckmann, M.S., Hunte, M.S., 2003. Role of endothelial intermediate conductance K_{Ca} channels in cerebral EDHF-mediated dilations. *American journal of physiology* 285, H1590-1599.

Marshall, F.N., 1982. Pharmacology and toxicology of probucol. *Artery* 10, 7-21.

Martin, S., Andriambeloson, E., Takeda, K., Andriantsitohaina, R., 2002. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. *British journal of pharmacology* 135, 1579-1587.

Martin, S., Favot, L., Matz, R., Lugnier, C., Andriantsitohaina, R., 2003. Delphinidin inhibits endothelial cell proliferation and cell cycle progression through a transient activation of ERK-1/-2. *Biochemical pharmacology* 65, 669-675.

Masoro, E.J., 2000. Caloric restriction and aging: an update. *Experimental gerontology* 35, 299-305.

Masuda, M., Suzui, M., Lim, J.T., Deguchi, A., Soh, J.W., Weinstein, I.B., 2002. Epigallocatechin-3-gallate decreases VEGF production in head and neck and breast carcinoma cells by inhibiting EGFR-related pathways of signal transduction. *Journal of experimental therapeutics & oncology* 2, 350-359.

Mather, S., Dora, K.A., Sandow, S.L., Winter, P., Garland, C.J., 2005. Rapid endothelial cell-selective loading of connexin 40 antibody blocks endothelium-derived hyperpolarizing factor dilation in rat small mesenteric arteries. *Circulation research* 97, 399-407.

Matoba, T., Shimokawa, H., 2003. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *Journal of pharmacological sciences* 92, 1-6.

Matoba, T., Shimokawa, H., Nakashima, M., Hirakawa, Y., Mukai, Y., Hirano, K., Kanaide, H., Takeshita, A., 2000. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *The Journal of clinical investigation* 106, 1521-1530.

Mazumder, P.K., O'Neill, B.T., Roberts, M.W., Buchanan, J., Yun, U.J., Cooksey, R.C., Boudina, S., Abel, E.D., 2004. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes* 53, 2366-2374.

McCaffrey, T.A., Nicholson, A.C., Szabo, P.E., Weksler, M.E., Weksler, B.B., 1988. Aging and arteriosclerosis. The increased proliferation of arterial smooth muscle cells isolated from old rats is associated with increased platelet-derived growth factor-like activity. *The Journal of experimental medicine* 167, 163-174.

McDonald, D.M., Thurston, G., Baluk, P., 1999. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. *Microcirculation* 6, 7-22.

McMurray, H.F., Parthasarathy, S., Steinberg, D., 1993. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *The Journal of clinical investigation* 92, 1004-1008.

McNally, J.S., Davis, M.E., Giddens, D.P., Saha, A., Hwang, J., Dikalov, S., Jo, H., Harrison, D.G., 2003. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *American journal of physiology* 285, H2290-2297.

Medh, R.D., Thompson, E.B., 2000. Hormonal regulation of physiological cell turnover and apoptosis. *Cell and tissue research* 301, 101-124.

Medvedev, Z.A., 1990. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 65, 375-398.

Mehrabian, M., Allayee, H., Wong, J., Shi, W., Wang, X.P., Shaposhnik, Z., Funk, C.D., Lusis, A.J., 2002. Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circulation research* 91, 120-126.

Meier, B., Radeke, H.H., Selle, S., Younes, M., Sies, H., Resch, K., Habermehl, G.G., 1989. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *The Biochemical journal* 263, 539-545.

Mendes, A., Desgranges, C., Cheze, C., Vercauteren, J., Freslon, J.L., 2003. Vasorelaxant effects of grape polyphenols in rat isolated aorta. Possible involvement of a purinergic pathway. *Fundamental & clinical pharmacology* 17, 673-681.

Michel, R.P., Langleben, D., Dupuis, J., 2003. The endothelin system in pulmonary hypertension. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 81, 542-554.

Michiels, C., 2003. Endothelial cell functions. *Journal of cellular physiology* 196, 430-443.

Miura, D., Miura, Y., Yagasaki, K., 2003a. Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats. *Life sciences* 73, 1393-1400.

Miura, H., Bosnjak, J.J., Ning, G., Saito, T., Miura, M., Gutterman, D.D., 2003b. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circulation research* 92, e31-40.

Miura, Y., Chiba, T., Tomita, I., Koizumi, H., Miura, S., Umegaki, K., Hara, Y., Ikeda, M., Tomita, T., 2001. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *The Journal of nutrition* 131, 27-32.

Mizugaki, M., Ishizawa, F., Yamazaki, T., Hishinuma, T., 2000. Epigallocatechin gallate increase the prostacyclin production of bovine aortic endothelial cells. *Prostaglandins & other lipid mediators* 62, 157-164.

Mizutani, K., Ikeda, K., Kawai, Y., Yamori, Y., 2001. Protective effect of resveratrol on oxidative damage in male and female stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 28, 55-59.

Moe, G.W., Rouleau, J.L., Nguyen, Q.T., Cernacek, P., Stewart, D.J., 2003. Role of endothelins in congestive heart failure. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 81, 588-597.

Mohazzab, K.M., Wolin, M.S., 1994. Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. *The American journal of physiology* 267, L815-822.

Mohiuddin, I., Chai, H., Lin, P.H., Lumsden, A.B., Yao, Q., Chen, C., 2006. Nitrotyrosine and chlorotyrosine: clinical significance and biological functions in the vascular system. *The Journal of surgical research* 133, 143-149.

Mombouli, J.V., Vanhoutte, P.M., 1999. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 31, 61-74.

Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., Vane, J.R., 1976. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263, 663-665.

Moncada, S., Vane, J.R., 1979. The role of prostacyclin in vascular tissue. *Federation proceedings* 38, 66-71.

Mondy, J.S., Lindner, V., Miyashiro, J.K., Berk, B.C., Dean, R.H., Geary, R.L., 1997. Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression in response to altered blood flow in vivo. *Circulation research* 81, 320-327.

Moore, R.E., Kawashiri, M.A., Kitajima, K., Secreto, A., Millar, J.S., Pratico, D., Rader, D.J., 2003. Apolipoprotein A-I deficiency results in markedly increased atherosclerosis in mice lacking the LDL receptor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, 1914-1920.

Morel, D.W., Hessler, J.R., Chisolm, G.M., 1983. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *Journal of lipid research* 24, 1070-1076.

Morisaki, N., Saito, I., Tamura, K., Tashiro, J., Masuda, M., Kanzaki, T., Watanabe, S., Masuda, Y., Saito, Y., 1997. New indices of ischemic heart disease and aging: studies on the serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in patients with hypercholesterolemia and ischemic heart disease. *Atherosclerosis* 131, 43-48.

Mosse, P.R., Campbell, G.R., Campbell, J.H., 1986. Smooth muscle phenotypic expression in human carotid arteries. II. Atherosclerosis-free diffuse intimal thickenings compared with the media. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)* 6, 664-669.

Movat, H.Z., More, R.H., Haust, M.D., 1958. The diffuse intimal thickening of the human aorta with aging. *The American journal of pathology* 34, 1023-1031.

Muller-Delp, J.M., Spier, S.A., Ramsey, M.W., Delp, M.D., 2002. Aging impairs endothelium-dependent vasodilation in rat skeletal muscle arterioles. *American journal of physiology* 283, H1662-1672.

Munroe, D.G., Wang, E.Y., MacIntyre, J.P., Tam, S.S., Lee, D.H., Taylor, G.R., Zhou, L., Plante, R.K., Kazmi, S.M., Bauerle, P.A., et al., 1995. Novel intracellular signaling function of prostaglandin H synthase-1 in NF-kappa B activation. *Journal of inflammation* 45, 260-268.

Murohara, T., Yasue, H., Ohgushi, M., Sakaino, N., Jougasaki, M., 1991. Age related attenuation of the endothelium dependent relaxation to noradrenaline in isolated pig coronary arteries. *Cardiovascular research* 25, 1002-1009.

Murphy, K.J., Chronopoulos, A.K., Singh, I., Francis, M.A., Moriarty, H., Pike, M.J., Turner, A.H., Mann, N.J., Sinclair, A.J., 2003. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *The American journal of clinical nutrition* 77, 1466-1473.

Naderali, E.K., Doyle, P.J., Williams, G., 2000. Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs. *Clin Sci (Lond)* 98, 537-543.

Nagel, T., Resnick, N., Atkinson, W.J., Dewey, C.F., Jr., Gimbrone, M.A., Jr., 1994. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *The Journal of clinical investigation* 94, 885-891.

Nair, M.P., Kandaswami, C., Mahajan, S., Chadha, K.C., Chawda, R., Nair, H., Kumar, N., Nair, R.E., Schwartz, S.A., 2002. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN γ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. *Biochimica et biophysica acta* 1593, 29-36.

Nakashima, Y., Plump, A.S., Raines, E.W., Breslow, J.L., Ross, R., 1994. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14, 133-140.

Nakashima, Y., Raines, E.W., Plump, A.S., Breslow, J.L., Ross, R., 1998. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 18, 842-851.

Napoli, C., D'Armiento, F.P., Mancini, F.P., Postiglione, A., Witztum, J.L., Palumbo, G., Palinski, W., 1997. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *The Journal of clinical investigation* 100, 2680-2690.

Nathan, C., Xie, Q.W., 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *The Journal of biological chemistry* 269, 13725-13728.

Naveilhan, P., Svensson, L., Nystrom, S., Ekstrand, A.J., Ernfors, P., 2002. Attenuation of hypercholesterolemia and hyperglycemia in ob/ob mice by NPY Y2 receptor ablation. *Peptides* 23, 1087-1091.

Ndiaye, M., Chataigneau, M., Lobysheva, I., Chataigneau, T., Schini-Kerth, V.B., 2005. Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *Faseb J* 19, 455-457.

Ndiaye, M., Chataigneau, T., Andriantsitohaina, R., Stoclet, J.C., Schini-Kerth, V.B., 2003. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochemical and biophysical research communications* 310, 371-377.

Ndiaye, M., Chataigneau, T., Chataigneau, M., Schini-Kerth, V.B., 2004. Red wine polyphenols induce EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries through the

redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway. *British journal of pharmacology* 142. 1131-1136.

Nelson, M.T., Quayle, J.M., 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *The American journal of physiology* 268. C799-822.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z., 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 13, 9-22.

Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition* 74, 418-425.

Numaguchi, Y., Harada, M., Osanai, H., Hayashi, K., Toki, Y., Okumura, K., Ito, T., Hayakawa, T., 1999. Altered gene expression of prostacyclin synthase and prostacyclin receptor in the thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular research* 41. 682-688.

O'Byrne, D.J., Devaraj, S., Grundy, S.M., Jialal, I., 2002. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids alpha-tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *The American journal of clinical nutrition* 76. 1367-1374.

O'Leary, K.A., de Pascual-Tereasa, S., Needs, P.W., Bao, Y.P., O'Brien, N.M., Williamson, G., 2004. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutation research* 551, 245-254.

Oak, M.H., Chataigneau, M., Keravis, T., Chataigneau, T., Beretz, A., Andriantsitohaina, R., Stoclet, J.C., Chang, S.J., Schini-Kerth, V.B., 2003. Red wine polyphenolic compounds inhibit vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells by preventing the activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23. 1001-1007.

Oak, M.H., El Bedoui, J., Anglard, P., Schini-Kerth, V.B., 2004. Red wine polyphenolic compounds strongly inhibit pro-matrix metalloproteinase-2 expression and its activation in response to thrombin via direct inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 110, 1861-1867.

Oak, M.H., El Bedoui, J., Schini-Kerth, V.B., 2005. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *The Journal of nutritional biochemistry* 16, 1-8.

Oltman, C.L., Weintraub, N.L., VanRollins, M., Dellsperger, K.C., 1998. Epoxyeicosatrienoic acids and dihydroxyeicosatrienoic acids are potent vasodilators in the canine coronary microcirculation. *Circulation research* 83, 932-939.

Orallo, F., Alvarez, E., Camina, M., Leiro, J.M., Gomez, E., Fernandez, P., 2002. The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Molecular pharmacology* 61, 294-302.

Orlandi, A., Bochaton-Piallat, M.L., Gabbiani, G., Spagnoli, L.G., 2006. Aging, smooth muscle cells and vascular pathobiology: implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis* 188, 221-230.

Orlandi, A., Marcellini, M., Spagnoli, L.G., 2000. Aging influences development and progression of early aortic atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20, 1123-1136.

Orlandi, A., Mauriello, A., Marino, B., Spagnoli, L.G., 1993. Age-related modifications of aorta and coronaries in the rabbit: a morphological and morphometrical assessment. *Archives of gerontology and geriatrics* 17, 37-53.

Pagano, P.J., Clark, J.K., Cifuentes-Pagano, M.E., Clark, S.M., Callis, G.M., Quinn, M.T., 1997. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in

rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14483-14488.

Pagano, P.J., Ito, Y., Tornheim, K., Gallop, P.M., Tauber, A.I., Cohen, R.A., 1995. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *The American journal of physiology* 268, H2274-2280.

Palkama, T., 1991. Induction of interleukin-1 production by ligands binding to the scavenger receptor in human monocytes and the THP-1 cell line. *Immunology* 74, 432-438.

Palkama, T., Matikainen, S., Hurme, M., 1993. Tyrosine kinase activity is involved in the protein kinase C induced expression of interleukin-1 beta gene in monocytic cells. *FEBS letters* 319, 100-104.

Pande, V., Ramos, M.J., 2005. Molecular recognition of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 by nuclear factor-kappa B and other cellular proteins. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 15, 4057-4063.

Paper, D.H., 1998. Natural products as angiogenesis inhibitors. *Planta medica* 64, 686-695.

Parekh, A.B., Penner, R., 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiological reviews* 77, 901-930.

Parthasarathy, S., Young, S.G., Witztum, J.L., Pittman, R.C., Steinberg, D., 1986. Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *The Journal of clinical investigation* 77, 641-644.

Pasterkamp, G., Schoneveld, A.H., Hijnen, D.J., de Kleijn, D.P., Teepen, H., van der Wal, A.C., Borst, C., 2000. Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis* 150, 245-253.

Patek, P.R., De Mignard, V.A., Bernick, S., 1968. Changes in structure of coronary arteries: susceptibility to arteriosclerosis in old rats. *Archives of pathology* 85, 388-396.

Patrono, C., Ciabattini, G., Pugliese, F., Pierucci, A., Blair, I.A., FitzGerald, G.A., 1986. Estimated rate of thromboxane secretion into the circulation of normal humans. *The Journal of clinical investigation* 77, 590-594.

Pennathur, S., Bergt, C., Shao, B., Byun, J., Kassim, S.Y., Singh, P., Green, P.S., McDonald, T.O., Brunzell, J., Chait, A., Oram, J.F., O'Brien, K., Geary, R.L., Heinecke, J.W., 2004. Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species. *The Journal of biological chemistry* 279, 42977-42983.

Pignatelli, B., Li, C.Q., Boffetta, P., Chen, Q., Ahrens, W., Nyberg, F., Mukeria, A., Bruske-Hohlfeld, I., Fortes, C., Constantinescu, V., Ischiropoulos, H., Ohshima, H., 2001. Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. *Cancer research* 61, 778-784.

Pignatelli, P., Di Santo, S., Buchetti, B., Sanguigni, V., Brunelli, A., Violi, F., 2006. Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. *Faseb J* 20, 1082-1089.

Plump, A.S., Breslow, J.L., 1995. Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annual review of nutrition* 15, 495-518.

Podrez, E.A., Abu-Soud, H.M., Hazen, S.L., 2000. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free radical biology & medicine* 28, 1717-1725.

Polidori, M.C., 2003. Antioxidant micronutrients in the prevention of age-related diseases. *Journal of postgraduate medicine* 49, 229-235.

Powell-Braxton, L., Veniant, M., Latvala, R.D., Hirano, K.I., Won, W.B., Ross, J., Dybdal, N., Zlot, C.H., Young, S.G., Davidson, N.O., 1998. A mouse model of human familial hypercholesterolemia: markedly elevated low density lipoprotein cholesterol levels and severe atherosclerosis on a low-fat chow diet. *Nature medicine* 4, 934-938.

Prabhakar, N.R., 2000. Oxygen sensing by the carotid body chemoreceptors. *J Appl Physiol* 88, 2287-2295.

Prie, S., Stewart, D.J., Dupuis, J., 1998. EndothelinA receptor blockade improves nitric oxide-mediated vasodilation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 97, 2169-2174.

Prior, H.M., Webster, N., Quinn, K., Beech, D.J., Yates, M.S., 1998. K(+)-induced dilation of a small renal artery: no role for inward rectifier K⁺ channels. *Cardiovascular research* 37, 780-790.

Proctor, S.D., Vine, D.F., Mamo, J.C., 2002. Arterial retention of apolipoprotein B(48)- and B(100)-containing lipoproteins in atherogenesis. *Current opinion in lipidology* 13, 461-470.

Puntarulo, S., Cederbaum, A.I., 1998. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free radical biology & medicine* 24, 1324-1330.

Purcell-Huynh, D.A., Farese, R.V., Jr., Johnson, D.F., Flynn, L.M., Pierotti, V., Newland, D.L., Linton, M.F., Sanan, D.A., Young, S.G., 1995. Transgenic mice expressing high levels of human apolipoprotein B develop severe atherosclerotic lesions in response to a high-fat diet. *The Journal of clinical investigation* 95, 2246-2257.

Quilley, J., McGiff, J.C., 2000. Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? *Trends in pharmacological sciences* 21, 121-124.

Quinn, M.T., Parthasarathy, S., Fong, L.G., Steinberg, D., 1987. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 2995-2998.

Quyyumi, A.A., Dakak, N., Andrews, N.P., Husain, S., Arora, S., Gilligan, D.M., Panza, J.A., Cannon, R.O., 3rd, 1995. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation* 95, 1747-1755.

Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A., 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *The Journal of biological chemistry* 266, 4244-4250.

Rajagopalan, S., Kurz, S., Munzel, T., Tarpey, M., Freeman, B.A., Griending, K.K., Harrison, D.G., 1996a. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *The Journal of clinical investigation* 97, 1916-1923.

Rajagopalan, S., Meng, X.P., Ramasamy, S., Harrison, D.G., Galis, Z.S., 1996b. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *The Journal of clinical investigation* 98, 2572-2579.

Ramachandran, A., Levenon, A.L., Brookes, P.S., Ceaser, E., Shiva, S., Barone, M.C., Darley-Usmar, V., 2002. Mitochondria, nitric oxide, and cardiovascular dysfunction. *Free radical biology & medicine* 33, 1465-1474.

Rao, G.N., Berk, B.C., 1992. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circulation research* 70, 593-599.

Reardon, C.A., Blachowicz, L., Lukens, J., Nissenbaum, M., Getz, G.S., 2003. Genetic background selectively influences innominate artery atherosclerosis: immune system deficiency as a probe. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, 1449-1454.

Renaud, S., de Lorgeril, M., 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339, 1523-1526.

Renaud, S., Gueguen, R., 1998. The French paradox and wine drinking. *Novartis Foundation symposium* 216, 208-217; discussion 217-222, 152-208.

Resnick, N., Collins, T., Atkinson, W., Bonthron, D.T., Dewey, C.F., Jr., Gimbron, M.A., Jr., 1993. Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7908.

Rice-Evans, C., 2001. Flavonoid antioxidants. *Current medicinal chemistry* 8, 797-807.

Richard, J.L., 1987. [Coronary risk factors. The French paradox]. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* 80 Spec No, 17-21.

Ridnour, L.A., Isenberg, J.S., Espey, M.G., Thomas, D.D., Roberts, D.D., Wink, D.A., 2005. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13147-13152.

Rimm, E.B., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J., Willett, W.C., 1996. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Annals of internal medicine* 125, 384-389.

Robak, J., Gryglewski, R.J., 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical pharmacology* 37, 837-841.

Roberts, L.J., 2nd, Sweetman, B.J., Oates, J.A., 1981. Metabolism of thromboxane B₂ in man. Identification of twenty urinary metabolites. *The Journal of biological chemistry* 256, 8384-8393.

Rockstein, M., Sussaman, M.L., Chesky, J., Eds., 1974. *Theoretical Aspects of Aging*. Academic Press, New York.

Rodriguez-Martinez, M.A., Garcia-Cohen, E.C., Baena, A.B., Gonzalez, R., Salaices, M., Marin, J., 1998. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *British journal of pharmacology* 125, 1329-1335.

Rosenwasser, L., 2007. New insights into the pathophysiology of allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc* 28, 10-15.

Ross, R., 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine* 340, 115-126.

Ross, R., Glomset, J.A., 1973. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science (New York, N.Y)* 180, 1332-1339.

Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A., Howard, B.V., Johnson, K.C., Kotchen,

J.M., Ockene, J., 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 288. 321-333.

Rubanyi, G.M., Botelho, L.H., 1991. Endothelins. *Faseb J* 5, 2713-2720.

Rubanyi, G.M., Vanhoutte, P.M., 1986. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *The American journal of physiology* 250, H822-827.

Rudolph, K.L., Chang, S., Lee, H.W., Blasco, M., Gottlieb, G.J., Greider, C., DePinho, R.A., 1999. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 96. 701-712.

Russell, F.D., Davenport, A.P., 1999. Secretory pathways in endothelin synthesis. *British journal of pharmacology* 126. 391-398.

Russell, J.C., Proctor, S.D., 2006. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 15. 318-330.

Sakurai, T., Yanagisawa, M., Masaki, T., 1992. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends in pharmacological sciences* 13. 103-108.

Salmeen, A., Barford, D., 2005. Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxidants & redox signaling* 7. 560-577.

Salzman, P.M., Salmon, J.A., Moncada, S., 1980. Prostacyclin and thromboxane A2 synthesis by rabbit pulmonary artery. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 215. 240-247.

Sanan, D.A., Newland, D.L., Tao, R., Marcovina, S., Wang, J., Mooser, V., Hammer, R.E., Hobbs, H.H., 1998. Low density lipoprotein receptor-negative mice

expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4544-4549.

Sarr, M., Chataigneau, M., Martins, S., Schott, C., El Bedoui, J., Oak, M.H., Muller, B., Chataigneau, T., Schini-Kerth, V.B., 2006. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. *Cardiovascular research* 71, 794-802.

Sartippour, M.R., Shao, Z.M., Heber, D., Beatty, P., Zhang, L., Liu, C., Ellis, L., Liu, W., Go, V.L., Brooks, M.N., 2002. Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. *The Journal of nutrition* 132, 2307-2311.

Sasahara, M., Raines, E.W., Chait, A., Carew, T.E., Steinberg, D., Wahl, P.W., Ross, R., 1994. Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the nonhuman primate by probucol. I. Is the extent of atherosclerosis related to resistance of LDL to oxidation? *The Journal of clinical investigation* 94, 155-164.

Sayre, L.M., Smith, M.A., Perry, G., 2001. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Current medicinal chemistry* 8, 721-738.

Schaller, M.D., Borgman, C.A., Cobb, B.S., Vines, R.R., Reynolds, A.B., Parsons, J.T., 1992. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 5192-5196.

Schewe, T., 2002. 15-lipoxygenase-1: a prooxidant enzyme. *Biological chemistry* 383, 365-374.

Schildknecht, S., Bachschmid, M., Baumann, A., Ullrich, V., 2004. COX-2 inhibitors selectively block prostacyclin synthesis in endotoxin-exposed vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 18, 757-759.

Schleicher, E.D., Wagner, E., Nerlich, A.G., 1997. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *The Journal of clinical investigation* 99, 457-468.

Schmidt, P., Youhnovski, N., Daiber, A., Balan, A., Arsic, M., Bachschmid, M., Przybylski, M., Ullrich, V., 2003. Specific nitration at tyrosine 430 revealed by high resolution mass spectrometry as basis for redox regulation of bovine prostacyclin synthase. *The Journal of biological chemistry* 278, 12813-12819.

Schramm, D.D., Wang, J.F., Holt, R.R., Ensunsa, J.L., Gonsalves, J.L., Lazarus, S.A., Schmitz, H.H., German, J.B., Keen, C.L., 2001. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *The American journal of clinical nutrition* 73, 36-40.

Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J.P., Williams, R.J., Cadenas, E., Rice-Evans, C., 2002. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology of aging* 23, 861-880.

Schulze-Osthoff, K., Bakker, A.C., Vanhaesebroeck, B., Beyaert, R., Jacob, W.A., Fiers, W., 1992. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *The Journal of biological chemistry* 267, 5317-5323.

Secchiero, P., Gonelli, A., Ciabattoni, G., Melloni, E., Grill, V., Rocca, B., Delbello, G., Zauli, G., 2002. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) up-regulates

cyclooxygenase (COX)-1 activity and PGE(2) production in cells of the myeloid lineage. *Journal of leukocyte biology* 72, 986-994.

Sehayek, E., Ono, J.G., Duncan, E.M., Batta, A.K., Salen, G., Shefer, S., Neguyen, L.B., Yang, K., Lipkin, M., Breslow, J.L., 2001. Hyodeoxycholic acid efficiently suppresses atherosclerosis formation and plasma cholesterol levels in mice. *Journal of lipid research* 42, 1250-1256.

Sellak, H., Franzini, E., Hakim, J., Pasquier, C., 1994. Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood* 83, 2669-2677.

Sendobry, S.M., Cornicelli, J.A., Welch, K., Bocan, T., Tait, B., Trivedi, B.K., Colbry, N., Dyer, R.D., Feinmark, S.J., Daugherty, A., 1997. Attenuation of diet-induced atherosclerosis in rabbits with a highly selective 15-lipoxygenase inhibitor lacking significant antioxidant properties. *British journal of pharmacology* 120, 1199-1206.

Sengottuvelan, M., Viswanathan, P., Nalini, N., 2006. Chemopreventive effect of trans-resveratrol--a phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell proliferation in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 27, 1038-1046.

Sentman, M.L., Brannstrom, T., Westerlund, S., Laukkanen, M.O., Yla-Herttuala, S., Basu, S., Marklund, S.L., 2001. Extracellular superoxide dismutase deficiency and atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21, 1477-1482.

Shaw, M., Cohen, P., Alessi, D.R., 1998. The activation of protein kinase B by H₂O₂ or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *The Biochemical journal* 336 (Pt 1), 241-246.

Shi, W., Haberland, M.E., Jien, M.L., Shih, D.M., Lusis, A.J., 2000. Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice. *Circulation* 102, 75-81.

Shimokawa, H., Matoba, T., 2004. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol Res* 49, 543-549.

Siegl, D., Koeppen, M., Wolfle, S.E., Pohl, U., de Wit, C., 2005. Myoendothelial coupling is not prominent in arterioles within the mouse cremaster microcirculation in vivo. *Circulation research* 97, 781-788.

Siems, W.G., Grune, T., Esterbauer, H., 1995. 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine. *Life sciences* 57, 785-789.

Simionescu, M., Simionescu, N., 1993. Proatherosclerotic events: pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration. *Faseb J* 7, 1359-1366.

Singh, N., Prasad, S., Singer, D.R., MacAllister, R.J., 2002. Ageing is associated with impairment of nitric oxide and prostanoid dilator pathways in the human forearm. *Clin Sci (Lond)* 102, 595-600.

Sinha, K., Chaudhary, G., Gupta, Y.K., 2002. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life sciences* 71, 655-665.

Slater, A.F., Stefan, C., Nobel, I., van den Dobbelen, D.J., Orrenius, S., 1995. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicology letters* 82-83, 149-153.

Soares De Moura, R., Costa Viana, F.S., Souza, M.A., Kovary, K., Guedes, D.C., Oliveira, E.P., Rubenich, L.M., Carvalho, L.C., Oliveira, R.M., Tano, T., Gusmao Correia,

M.L.. 2002. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 54, 1515-1520.

Soleas, G.J., Diamandis, E.P., Goldberg, D.M., 1997. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *Journal of clinical laboratory analysis* 11, 287-313.

Sorescu, D., Weiss, D., Lassegue, B., Clempus, R.E., Szocs, K., Sorescu, G.P., Valppu, L., Quinn, M.T., Lambeth, J.D., Vega, J.D., Taylor, W.R., Griending, K.K., 2002. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 105, 1429-1435.

Spagnoli, L.G., Orlandi, A., Mauriello, A., Santeusano, G., de Angelis, C., Lucreziotti, R., Ramacci, M.T., 1991. Aging and atherosclerosis in the rabbit. I. Distribution, prevalence and morphology of atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 89, 11-24.

Sparrow, C.P., Doebber, T.W., Olszewski, J., Wu, M.S., Ventre, J., Stevens, K.A., Chao, Y.S., 1992. Low density lipoprotein is protected from oxidation and the progression of atherosclerosis is slowed in cholesterol-fed rabbits by the antioxidant N,N'-diphenylphenylenediamine. *The Journal of clinical investigation* 89, 1885-1891.

Spiekermann, S., Landmesser, U., Dikalov, S., Brecht, M., Gamez, G., Tatge, H., Reepschlager, N., Hornig, B., Drexler, H., Harrison, D.G., 2003. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* 107, 1383-1389.

Spina, M., Garbisa, S., Hinnie, J., Hunter, J.C., Serafini-Fracassini, A., 1983. Age-related changes in composition and mechanical properties of the tunica media of the upper thoracic human aorta. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)* 3, 64-76.

Springer, T.A., 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.

Srinivasan, S., Hatley, M.E., Bolick, D.T., Palmer, L.A., Edelstein, D., Brownlee, M., Hedrick, C.C., 2004. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia* 47, 1727-1734.

St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., Brand, M.D., 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *The Journal of biological chemistry* 277, 44784-44790.

Stadtman, E.R., 2004. Role of oxidant species in aging. *Current medicinal chemistry* 11, 1105-1112.

Steinberg, D., 1997. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *The Journal of biological chemistry* 272, 20963-20966.

Steinberg, D., Witztum, J.L., 2002. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 105, 2107-2111.

Stiko-Rahm, A., Hultgardh-Nilsson, A., Regnstrom, J., Hamsten, A., Nilsson, J., 1992. Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 12, 1099-1109.

Stocker, R., Keaney, J.F., Jr., 2004. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews* 84, 1381-1478.

Stoclet, J.C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M.H., El Bedoui, J., Chataigneau, M., Schini-Kerth, V.B., 2004. Vascular protection by dietary polyphenols. *European journal of pharmacology* 500, 299-313.

Stoclet, J.C., Kleschyov, A., Andriambeloson, E., Diebolt, M., Andriantsitohaina, R., 1999. Endothelial NO release caused by red wine polyphenols. *J Physiol Pharmacol* 50, 535-540.

Stopeck, A.T., Nicholson, A.C., Mancini, F.P., Hajjar, D.P., 1993. Cytokine regulation of low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 cells. *The Journal of biological chemistry* 268, 17489-17494.

Subbaramaiah, K., Chung, W.J., Michaluart, P., Telang, N., Tanabe, T., Inoue, H., Jang, M., Pezzuto, J.M., Dannenberg, A.J., 1998. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 273, 21875-21882.

Sun, D., Liu, H., Yan, C., Jacobson, A., Ojaimi, C., Huang, A., Kaley, G., 2006. COX-2 contributes to the maintenance of flow-induced dilation in arterioles of eNOS-knockout mice. *American journal of physiology* 291, H1429-1435.

Sun, Y., Oberley, L.W., 1996. Redox regulation of transcriptional activators. *Free radical biology & medicine* 21, 335-348.

Taddei, S., Salvetti, A., 2002. Endothelial dysfunction in essential hypertension: clinical implications. *Journal of hypertension* 20, 1671-1674.

Taddei, S., Virdis, A., Ghiadoni, L., Magagna, A., Salvetti, A., 1997. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension* 29, 274-279.

Taddei. S., Viridis. A., Ghiadoni. L., Magagna. A., Salvetti. A., 1998. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* 97, 2222-2229.

Taddei. S., Viridis. A., Mattei. P., Ghiadoni. L., Gennari. A., Fasolo. C.B., Sudano. I., Salvetti. A., 1995. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation* 91, 1981-1987.

Takaichi. S., Yutani. C., Fujita. H., Yamamoto. A., 1993. Ultrastructural studies on the phenotypic modulation of human intimal smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 100, 197-211.

Takeda. T., Hosokawa. M., Higuchi. K., 1997. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence. *Experimental gerontology* 32, 105-109.

Tangirala. R.K., Casanada. F., Miller. E., Witztum. J.L., Steinberg. D., Palinski. W., 1995. Effect of the antioxidant N,N'-diphenyl 1,4-phenylenediamine (DPPD) on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 15, 1625-1630.

Taubert. D., Berkels. R., Klaus. W., Roesen. R., 2002. Nitric oxide formation and corresponding relaxation of porcine coronary arteries induced by plant phenols: essential structural features. *Journal of cardiovascular pharmacology* 40, 701-713.

Tawara. K., Ishihara. M., Ogawa. H., Tomikawa. M., 1986. Effect of probucol, pantethine and their combinations on serum lipoprotein metabolism and on the incidence of atheromatous lesions in the rabbit. *Japanese journal of pharmacology* 41, 211-222.

Taylor. H.J., Chaytor. A.T., Evans. W.H., Griffith. T.M., 1998. Inhibition of the gap junctional component of endothelium-dependent relaxations in rabbit iliac artery by 18-alpha glycyrrhetic acid. *British journal of pharmacology* 125, 1-3.

Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L1005-1028.

Thorin, E., 2001. Different contribution of endothelial nitric oxide in the relaxation of human coronary arteries of ischemic and dilated cardiomyopathic hearts. *Journal of cardiovascular pharmacology* 37, 227-232.

Thorin, E., Shatos, M.A., Shreeve, S.M., Walters, C.L., Bevan, J.A., 1997. Human vascular endothelium heterogeneity. A comparative study of cerebral and peripheral cultured vascular endothelial cells. *Stroke: a journal of cerebral circulation* 28, 375-381.

Thorin, E., Shreeve, S.M., 1998. Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. *Pharmacology & therapeutics* 78, 155-166.

Tiefenbacher, C.P., Bleeke, T., Vahl, C., Amann, K., Vogt, A., Kubler, W., 2000. Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis. *Circulation* 102, 2172-2179.

Tomasian, D., Keaney, J.F., Vita, J.A., 2000. Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovascular research* 47, 426-435.

Tomita, H., Egashira, K., Kubo-Inoue, M., Usui, M., Koyanagi, M., Shimokawa, H., Takeya, M., Yoshimura, T., Takeshita, A., 1998. Inhibition of NO synthesis induces inflammatory changes and monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat hearts and vessels. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 18, 1456-1464.

Tong, X.K., Nicolakakis, N., Kocharyan, A., Hamel, E., 2005. Vascular remodeling versus amyloid beta-induced oxidative stress in the cerebrovascular dysfunctions associated with Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25, 11165-11174.

Touyz. R.M., 2005. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxidants & redox signaling* 7, 1302-1314.

Touyz. R.M., Schiffrin. E.L., 2003. Role of endothelin in human hypertension. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 81, 533-541.

Tracy. R.E., Strong. J.P., Toca. V.T., Lopez. C.R., 1979. Variable patterns of nonatheromatous aortic intimal thickening. *Laboratory investigation: a journal of technical methods and pathology* 41, 553-559.

Tribble. D.L., Gong. E.L., Leeuwenburgh, C., Heinecke. J.W., Carlson. E.L., Verstuyft. J.G., Epstein. C.J., 1997. Fatty streak formation in fat-fed mice expressing human copper-zinc superoxide dismutase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17, 1734-1740.

Tsao. P.S., McEvoy. L.M., Drexler. H., Butcher. E.C., Cooke. J.P., 1994. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation* 89, 2176-2182.

Tseng. S.H., Lin. S.M., Chen. J.C., Su. Y.H., Huang. H.Y., Chen. C.K., Lin. P.Y., Chen. Y., 2004. Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. *Clin Cancer Res* 10, 2190-2202.

Turrens. J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* 552, 335-344.

Uchida. Y., Yamazaki. H., Watanabe. S., Hayakawa. K., Meng. Y., Hiramatsu. N., Kasai. A., Yamauchi. K., Yao. J., Kitamura. M., 2005. Enhancement of NF-kappaB activity by resveratrol in cytokine-exposed mesangial cells. *Clinical and experimental immunology* 142, 76-83.

Um, H.D., Orenstein, J.M., Wahl, S.M., 1996. Fas mediates apoptosis in human monocytes by a reactive oxygen intermediate dependent pathway. *J Immunol* 156, 3469-3477.

Umansky, V., Rocha, M., Breikreutz, R., Hehner, S., Bucur, M., Erbe, N., Droge, W., Ushmorov, A., 2000. Glutathione is a factor of resistance of Jurkat leukemia cells to nitric oxide-mediated apoptosis. *Journal of cellular biochemistry* 78, 578-587.

Unno, K., Takabayashi, F., Kishido, T., Oku, N., 2004. Suppressive effect of green tea catechins on morphologic and functional regression of the brain in aged mice with accelerated senescence (SAMP10). *Experimental gerontology* 39, 1027-1034.

Ushio-Fukai, M., Tang, Y., Fukai, T., Dikalov, S.I., Ma, Y., Fujimoto, M., Quinn, M.T., Pagano, P.J., Johnson, C., Alexander, R.W., 2002. Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circulation research* 91, 1160-1167.

Ushmorov, A., Ratter, F., Lehmann, V., Droge, W., Schirmacher, V., Umansky, V., 1999. Nitric-oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome C release. *Blood* 93, 2342-2352.

Valenzano, D.R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., Cellerino, A., 2006. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol* 16, 296-300.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 44-84.

Valko, M., Morris, H., Mazur, M., Rapt, P., Bilton, R.F., 2001. Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? *Biochimica et biophysica acta* 1527, 161-166.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 160, 1-40.

Vallance, P., Chan, N., 2001. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart (British Cardiac Society)* 85, 342-350.

van der Loo, B., Labugger, R., Skepper, J.N., Bachschmid, M., Kilo, J., Powell, J.M., Palacios-Callender, M., Erusalimsky, J.D., Quaschnig, T., Malinski, T., Gygi, D., Ullrich, V., Luscher, T.F., 2000. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *The Journal of experimental medicine* 192, 1731-1744.

Vanheel, B., Van de Voorde, J., 2000. EDHF and residual NO: different factors. *Cardiovascular research* 46, 370-375.

Vanhoutte, P.M., 2001. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *The Journal of clinical investigation* 107, 23-25.

Vanhoutte, P.M., Feletou, M., Taddei, S., 2005. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *British journal of pharmacology* 144, 449-458.

Vanhoutte, P.M., Katusic, Z.S., 1988. Endothelium-derived contracting factor: endothelin and/or superoxide anion? *Trends in pharmacological sciences* 9, 229-230.

Vasquez-Vivar, J., Duquaine, D., Whitsett, J., Kalyanaraman, B., Rajagopalan, S., 2002. Altered tetrahydrobiopterin metabolism in atherosclerosis: implications for use of

oxidized tetrahydrobiopterin analogues and thiol antioxidants. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22, 1655-1661.

Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martasek, P., Hogg, N., Masters, B.S., Karoui, H., Tordo, P., Pritchard, K.A., Jr., 1998. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9220-9225.

Veniant, M.M., Pierotti, V., Newland, D., Cham, C.M., Sanan, D.A., Walzem, R.L., Young, S.G., 1997. Susceptibility to atherosclerosis in mice expressing exclusively apolipoprotein B48 or apolipoprotein B100. *The Journal of clinical investigation* 100, 180-188.

Vequaud, P., Thorin, E., 2001. Endothelial G protein beta-subunits trigger nitric oxide-but not endothelium-derived hyperpolarizing factor-dependent dilation in rabbit resistance arteries. *Circulation research* 89, 716-722.

Vina, J., Sastre, J., Pallardo, F., Borras, C., 2003. Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males. *Antioxidants & redox signaling* 5, 549-556.

Vinogradov, A.D., Grivennikova, V.G., 2005. Generation of superoxide-radical by the NADH:ubiquinone oxidoreductase of heart mitochondria. *Biochemistry* 70, 120-127.

Vinson, J.A., Teufel, K., Wu, N., 2001. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis* 156, 67-72.

Viridis, A., Ghiadoni, L., Pinto, S., Lombardo, M., Petraglia, F., Gennazzani, A., Buralli, S., Taddei, S., Salvetti, A., 2000. Mechanisms responsible for endothelial

dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation* 101, 2258-2263.

Virmani, R., Avolio, A.P., Mergner, W.J., Robinowitz, M., Herderick, E.E., Cornhill, J.F., Guo, S.Y., Liu, T.H., Ou, D.Y., O'Rourke, M., 1991. Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis. Comparison between occidental and Chinese communities. *The American journal of pathology* 139, 1119-1129.

Visioli, F., Hagen, T.M., 2007. Nutritional strategies for healthy cardiovascular aging: focus on micronutrients. *Pharmacol Res* 55, 199-206.

Visse, R., Nagase, H., 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research* 92, 827-839.

Vita, J.A., Keaney, J.F., Jr., 2002. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 106, 640-642.

Walford, R.L., 1969. *The immunologic Theory of aging*. Munksgaard, Copenhagen, Denmark.

Wallerath, T., Deckert, G., Ternes, T., Anderson, H., Li, H., Witte, K., Forstermann, U., 2002. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106, 1652-1658.

Wallerath, T., Poleo, D., Li, H., Forstermann, U., 2003. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *Journal of the American College of Cardiology* 41, 471-478.

Wan, Y., Vinson, J.A., Etherton, T.D., Proch, J., Lazarus, S.A., Kris-Etherton, P.M., 2001. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and

prostaglandin concentrations in humans. *The American journal of clinical nutrition* 74, 596-602.

Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L., 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5510-5514.

Wang, L.J., Lee, T.S., Lee, F.Y., Pai, R.C., Chau, L.Y., 1998. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *The American journal of pathology* 152, 711-720.

Wang, Q., Xu, J., Rottinghaus, G.E., Simonyi, A., Lubahn, D., Sun, G.Y., Sun, A.Y., 2002a. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain research* 958, 439-447.

Wang, Z., Huang, Y., Zou, J., Cao, K., Xu, Y., Wu, J.M., 2002b. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *International journal of molecular medicine* 9, 77-79.

Wang, Z., Zou, J., Cao, K., Hsieh, T.C., Huang, Y., Wu, J.M., 2005. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *International journal of molecular medicine* 16, 533-540.

Warner, H.R., Butler, R.N., Sprott, R.L., Schneider, E.L., Eds., 1987. *Modern Biological Theories of Aging*. Raven Press, New York.

Warnholtz, A., Mollnau, H., Oelze, M., Wendt, M., Munzel, T., 2001. Antioxidants and endothelial dysfunction in hyperlipidemia. *Current hypertension reports* 3, 53-60.

Warnholtz, A., Nickenig, G., Schulz, E., Macharzina, R., Brasen, J.H., Skatchkov, M., Heitzer, T., Stasch, J.P., Griendling, K.K., Harrison, D.G., Bohm, M., Meinertz, T.,

Munzel, T., 1999. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 99, 2027-2033.

Wautier, J.L., Schmidt, A.M., 2004. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circulation research* 95, 233-238.

Wei, C.M., Hu, S., Miller, V.M., Burnett, J.C., Jr., 1994. Vascular actions of C-type natriuretic peptide in isolated porcine coronary arteries and coronary vascular smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications* 205, 765-771.

Wenzel, E., Soldo, T., Erbersdobler, H., Somoza, V., 2005. Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Molecular nutrition & food research* 49, 482-494.

Weyand, C.M., Goronzy, J.J., 1997. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The Medical clinics of North America* 81, 29-55.

Widlansky, M.E., Hamburg, N.M., Anter, E., Holbrook, M., Kahn, D.F., Elliott, J.G., Keaney, J.F., Jr., Vita, J.A., 2007. Acute EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Journal of the American College of Nutrition* 26, 95-102.

Williams, M.S., Henkart, P.A., 1996. Role of reactive oxygen intermediates in TCR-induced death of T cell blasts and hybridomas. *J Immunol* 157, 2395-2402.

Wilson, M.D., Rudel, L.L., 1994. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *Journal of lipid research* 35, 943-955.

Winters, B., Mo, Z., Brooks-Asplund, E., Kim, S., Shoukas, A., Li, D., Nyhan, D., Berkowitz, D.E., 2000. Reduction of obesity, as induced by leptin, reverses endothelial dysfunction in obese (Lep(ob)) mice. *J Appl Physiol* 89, 2382-2390.

Wisse, E.. 1970. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *Journal of ultrastructure research* 31, 125-150.

Wissler, R.W., Vesselinovitch, D.. 1983. Combined effects of cholestyramine and probucol on regression of atherosclerosis in rhesus monkey aortas. *Applied pathology* 1, 89-96.

Witting, P.K., Pettersson, K., Ostlund-Lindqvist, A.M., Westerlund, C., Eriksson, A.W., Stocker, R.. 1999. Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *Faseb J* 13, 667-675.

Wolin, M.S.. 2000. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20, 1430-1442.

Wolinsky, H.. 1972. Long-term effects of hypertension on the rat aortic wall and their relation to concurrent aging changes. Morphological and chemical studies. *Circulation research* 30, 301-309.

Wollny, T., Aiello, L., Di Tommaso, D., Bellavia, V., Rotilio, D., Donati, M.B., de Gaetano, G., Iacoviello, L.. 1999. Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production. *British journal of pharmacology* 127, 747-755.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R.. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology* 68, 251-306.

Xia, Y., Tsai, A.L., Berka, V., Zweier, J.L.. 1998. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *The Journal of biological chemistry* 273, 25804-25808.

Xiao, Z., Zhang, Z., Ranjan, V., Diamond, S.L., 1997. Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated. *Journal of cellular physiology* 171, 205-211.

Xie, D., Liu, G., Zhu, G., Wu, W., Ge, S., 2004. (-)-Epigallocatechin-3-gallate protects cultured spiral ganglion cells from H₂O₂-induced oxidizing damage. *Acta otolaryngologica* 124, 464-470.

Yamaguchi, Y., Kagota, S., Haginaka, J., Kunitomo, M., 2002. Participation of peroxynitrite in oxidative modification of LDL by aqueous extracts of cigarette smoke. *FEBS letters* 512, 218-222.

Yamakoshi, J., Kataoka, S., Koga, T., Ariga, T., 1999. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 142, 139-149.

Yamamoto, Y., Fukuta, H., Nakahira, Y., Suzuki, H., 1998. Blockade by 18beta-glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles. *The Journal of physiology* 511 (Pt 2), 501-508.

Yamamoto, Y., Imaeda, K., Suzuki, H., 1999. Endothelium-dependent hyperpolarization and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles. *The Journal of physiology* 514 (Pt 2), 505-513.

Yan, Z.Q., Sirsjo, A., Bochaton-Piallat, M.L., Gabbiani, G., Hansson, G.K., 1999. Augmented expression of inducible NO synthase in vascular smooth muscle cells during aging is associated with enhanced NF-kappaB activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 2854-2862.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., Masaki, T., 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411-415.

Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., Holash, J., 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407, 242-248.

Yang, D., Feletou, M., Boulanger, C.M., Wu, H.F., Levens, N., Zhang, J.N., Vanhoutte, P.M., 2002. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *British journal of pharmacology* 136, 104-110.

Yang, D., Feletou, M., Levens, N., Zhang, J.N., Vanhoutte, P.M., 2003a. A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of SHR. *Hypertension* 41, 143-148.

Yang, D., Levens, N., Zhang, J.N., Vanhoutte, P.M., Feletou, M., 2003b. Specific potentiation of endothelium-dependent contractions in SHR by tetrahydrobiopterin. *Hypertension* 41, 136-142.

Yla-Herttuala, S., Rosenfeld, M.E., Parthasarathy, S., Glass, C.K., Sigal, E., Witztum, J.L., Steinberg, D., 1990. Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 6959-6963.

Yla-Herttuala, S., Solakivi, T., Hirvonen, J., Laaksonen, H., Mottonen, M., Pesonen, E., Raekallio, J., Akerblom, H.K., Nikkari, T., 1987. Glycosaminoglycans and apolipoproteins B and A-I in human aortas. Chemical and immunological analysis of lesion-free aortas from children and adults. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)* 7, 333-340.

Yoo, H.G., Shin, B.A., Park, J.C., Kim, H.S., Kim, W.J., Chay, K.O., Ahn, B.W., Park, R.K., Ellis, L.M., Jung, Y.D., 2002. Induction of apoptosis by the green tea flavonol (-)-epigallocatechin-3-gallate in human endothelial ECV 304 cells. *Anticancer research* 22, 3373-3378.

Yu, B.P., Chung, H.Y., 2001a. Oxidative stress and vascular aging. *Diabetes research and clinical practice* 54 Suppl 2, S73-80.

Yu, B.P., Chung, H.Y., 2001b. Stress resistance by caloric restriction for longevity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 928, 39-47.

Yu, B.P., Chung, H.Y., 2006. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mechanisms of ageing and development* 127, 436-443.

Yu, C.E., Oshima, J., Fu, Y.H., Wijsman, E.M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., Martin, G.M., Mulligan, J., Schellenberg, G.D., 1996. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science (New York, N.Y)* 272, 258-262.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., Kroemer, G., 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *The Journal of experimental medicine* 182, 367-377.

Zaslaver, M., Offer, S., Kerem, Z., Stark, A.H., Weller, J.I., Eliraz, A., Madar, Z., 2005. Natural compounds derived from foods modulate nitric oxide production and oxidative status in epithelial lung cells. *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 9934-9939.

Zaveri, N.T., 2006. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life sciences* 78, 2073-2080.

Zeher, A.M., Drexler, H., Wollschlager, H., Just, H., 1991. Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 83, 391-401.

Zeher, A.M., Fisslthaler, B., Schray-Utz, B., Busse, R., 1995. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circulation research* 76, 980-986.

Zhang, W., Hashimoto, K., Yu, G.Y., Sakagami, H., 2002. Decline of superoxide dismutase activity during antioxidant-induced apoptosis in HL-60 cells. *Anticancer research* 22, 219-224.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.

Zhao, X., Gu, Z., Attele, A.S., Yuan, C.S., 1999. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. *Journal of ethnopharmacology* 67, 279-285.

Zink, M.H., Oltman, C.L., Lu, T., Katakam, P.V., Kaduce, T.L., Lee, H., Dellsperger, K.C., Spector, A.A., Myers, P.R., Weintraub, N.L., 2001. 12-lipoxygenase in porcine coronary microcirculation: implications for coronary vasoregulation. *American journal of physiology* 280, H693-704.

Zou, M., Jendral, M., Ullrich, V., 1999. Prostaglandin endoperoxide-dependent vasospasm in bovine coronary arteries after nitration of prostacyclin synthase. *British journal of pharmacology* 126, 1283-1292.

Zou, M.H., Cohen, R., Ullrich, V., 2004. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium* 11, 89-97.

Zygmunt. P.M., Edwards. G., Weston. A.H., Larsson. B., Hogestatt. E.D., 1997. Involvement of voltage-dependent potassium channels in the EDHF-mediated relaxation of rat hepatic artery. *British journal of pharmacology* 121, 141-149.