

Université de Montréal

**Rôle physiologique et thérapeutique du monoxyde  
d'azote dans la calcification vasculaire et la rigidité  
artérielle dans un modèle d'hypertension systolique  
isolée.**

par

Liz-Ann Gilbert

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)  
en sciences pharmaceutiques  
option pharmacologie

Décembre 2009

© Liz-Ann Gilbert, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Rôle physiologique et thérapeutique du monoxyde d'azote dans la calcification vasculaire  
et la rigidité artérielle dans un modèle de l'hypertension systolique isolée.

présentée par :  
Liz-Ann Gilbert

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Daniel Lévesque, président-rapporteur  
Dr Pierre Moreau, directeur de recherche  
Dr Éric Thorin, membre du jury  
Dr Mohsen Agharazii, examinateur externe  
Dr Yan Burelle, représentant du doyen de la FES

## Résumé

L'hypertension systolique isolée (HSI) est le résultat de changements au niveau de la paroi vasculaire qui ont pour conséquence d'augmenter la rigidité artérielle. Ces modifications surviennent surtout au niveau des grosses artères comme l'aorte et sont associées au vieillissement. La fragmentation des fibres élastiques, leur calcification (élastocalcinose) et la fibrose font partie des changements majeurs observés avec l'âge. En plus de ces changements, le vieillissement vasculaire provoque des modifications au niveau des cellules qui composent la paroi. Les cellules endothéliales sécrètent moins de monoxyde d'azote (NO) provoquant une dysfonction endothéliale et les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) synthétisent maintenant des protéines matricielles et osseuses.

Situé entre le sang et les CMLVs, l'endothélium contrôle le tonus vasculaire par la sécrétion de plusieurs substances vasoactives qui interagissent entre elles afin de maintenir l'homéostasie du système vasculaire. Parmi celles-ci, on note l'endothéline (ET), un puissant vasoconstricteur et le NO, un gaz vasorelaxants. Ce dernier est aussi reconnu pour bloquer la production d'ET par un mécanisme dépendant du guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Comme il y a une interaction entre le NO et l'ET, et que cette dernière est impliquée dans la calcification artérielle, le NO pourrait être impliqué dans la modulation de l'élastocalcinose et de la rigidité artérielle par l'inhibition de l'ET et la modification de la composition de la paroi. Cet effet, qui se produirait au delà des effets vasorelaxants du NO, offre un potentiel thérapeutique intéressant pour l'HSI.

Afin d'évaluer l'implication du NO dans la calcification vasculaire et la rigidité artérielle, un modèle animal d'HSI a été utilisé (modèle warfarine vitamine K, WVK). Ce modèle d'élastocalcinose est basé sur l'inhibition de la maturation d'une protéine anti-calcifiante, la *matrix Gla protein* (MGP), par la warfarine.

Afin de déterminer l'implication physiologique du NO dans l'initiation et la progression de l'élastocalcinose, sa production a été inhibée par un analogue de la L-arginine, le L-N<sup>G</sup>-nitroarginine methyl ester (L-NAME). Lors des processus d'initiation de la calcification, le L-NAME a prévenu l'élastocalcinose sans toutefois modifier la vitesse de l'onde de pouls (PWV). Suite au traitement L-NAME, l'expression de la NO synthase inductible (iNOS) a été diminuée alors qu'elle a été augmentée lors du traitement WVK. Elle pourrait donc être impliquée dans les processus de calcification vasculaire. De plus, la NO synthase endothéliale (eNOS) semble également impliquée puisqu'elle a été augmentée dans le modèle WVK. Cette hausse pourrait être bénéfique pour limiter l'élastocalcinose alors que l'expression de la iNOS serait délétère. Lors de la progression de la calcification, le L-NAME a augmenté l'élastocalcinose et le PWV. Dans ce contexte, l'ET serait impliquée dans l'amplification de la calcification vasculaire entraînant une hausse de la rigidité artérielle. Comme le NO endogène limite la progression de la calcification et conséquemment la rigidité artérielle, il semble être protecteur.

L'efficacité d'une modulation de la voie du NO dans le modèle WVK a été étudiée par l'administration d'un donneur de NO, le sinitrodil, ou d'un inhibiteur de la phosphodiesterase 5 (PDE5), le tadalafil. La modulation de la voie du NO semble être bénéfique sur la rigidité artérielle, mais seulement de façon aiguë. En effet, le sinitrodil a modifié de transitoirement la rigidité au niveau de l'aorte possiblement par la modulation du tonus vasculaire sans toutefois avoir des effets sur la composition de la paroi. Comme le modèle WVK n'affecte pas la fonction endothéliale, les concentrations endogènes de NO semblent être optimales puisque le sinitrodil provoque une augmentation de l'élastocalcinose possiblement par le développement d'une tolérance. Tout comme le sinitrodil, le tadalafil a modulé de manière aiguë la rigidité artérielle sans modifier la composition de la paroi.

Globalement, ces travaux ont permis de mettre en évidence les effets bénéfiques du NO endogène pour limiter le développement de l'HSI, suggérant qu'une dysfonction endothéliale, tel qu'observé lors du vieillissement, a un impact négatif sur la maladie.

**Mots-clés** : monoxyde d'azote, rigidité artérielle, donneurs de NO, inhibiteur de phosphodiésterases, calcification vasculaire, hypertension systolique isolée, vitesse de l'onde de pouls.

## Abstract

Isolated systolic hypertension (ISH) is the result of complex changes in the vascular wall and consequently the increase of arterial stiffness. These modifications occur mainly in conductance arteries, like the aorta, and are associated with aging. The fragmentation of elastic fibers, calcification (elastocalcinosis), and fibrosis are major changes with age. In addition to these changes in the extracellular matrix, vascular aging also induces vascular cell wall modifications. These include decreased production of nitric oxide (NO) by endothelial cells, which induces endothelial dysfunction, and the production of matrix and bone proteins by vascular smooth muscle cells (VSMCs).

Located between the blood and VSMCs, the endothelium controls vascular tone by secreting various vasoactive factors. These factors interact with each other to maintain the hemodynamic of the vascular system. Among these factors, the vasoconstrictor endothelin (ET) and the vasodilator NO. The latter has been shown to block ET production via a cyclic guanosine monophosphates-(cGMP) dependent mechanism, whereas ET has been implicated in arterial calcification. Therefore, NO might be involved in the modulation of elastocalcinosis and arterial stiffness by inhibiting ET and modifying the vascular wall composition. This effect of NO could offer interesting therapeutic potential for ISH.

To evaluate the implication of NO in the vascular calcification and arterial stiffness, an animal model of ISH was used. This model of elastocalcinosis is based on the inhibition of the maturation of the anti-calcific protein, *matrix Gla protein* (MGP), by warfarin (WVK model).

To gain insight into the physiological role of endogenous NO in the initiation and progression of elastocalcinosis, its production was inhibited by the administration of L-NAME. Interestingly, elastocalcinosis was prevented by L-N<sup>G</sup>-nitroarginine methyl ester (L-NAME) administration without any modifications of the pulse wave velocity (PWV) during the initiation of the calcification processes. After the L-NAME treatment, the

expression of inducible NO synthase (iNOS) was decreased, whereas upon treatment with warfarin alone the expression of iNOS was increased, which could be implicated in vascular calcification and arterial stiffness. In addition, endothelial NO synthase (eNOS) seems to be implicated in this process as its expression was also increased upon WVK treatment. This increase could be beneficial to limit elastocalcinosis, whereas the increase in iNOS expression could be harmful. L-NAME administration during the progression of calcification increased elastocalcinosis and PWV. In an endothelial dysfunction context, ET has been shown to be involved in the amplification process of vascular calcification causing an increase in arterial stiffness. As NO limits the progression of calcification and consequently arterial stiffness, endogenous NO seems to be protective in the aorta.

The efficacy of exogenous modulation of the NO pathway in the WVK model was studied upon administration of the NO donor, sinitrodil, or the phosphodiesterase type 5 inhibitor (PDE5), tadalafil. The exogenous modulation of the NO pathway seemed to be beneficial for arterial stiffness, but only in an acute manner. Indeed, sinitrodil modified the acute stiffness in the aorta potentially by vascular tone modulation, without having any effect on vascular wall composition. Since endothelial function was not affected upon WVK model, endogenous NO concentrations seem to be optimal. Thus, exogenous NO potentially caused an increase of elastocalcinosis by inducing tolerance to NO. As well as sinitrodil, tadalafil modulated the arterial stiffness in an acute manner without modifying the composition of the vascular wall.

Broadly, these studies provide evidence that endogenous NO can limit ISH development, suggesting that endothelial dysfunction, as observed in aging, has a negative impact on this pathology.

**Keywords** : nitric oxide, aortic stiffness, NO donors, phosphodiesterase inhibitors, vascular calcification, isolated systolic hypertension, pulse wave velocity.

## Table des matières

1. Anatomie du système vasculaire.....	1
1.1. Vue d'ensemble.....	1
1.2. Paroi vasculaire.....	3
1.2.1. Composition générale.....	3
1.2.1.1. Cellules.....	3
1.2.1.2. Matrice extracellulaire.....	5
1.2.2. Organisation et rôles.....	9
1.2.2.1. Intima.....	10
1.2.2.2. Média.....	10
1.2.2.3. Adventice.....	10
1.3. Description des différents types d'artères.....	12
1.3.1. Artères élastiques.....	12
1.3.2. Artères musculaires.....	13
1.3.3. Artères de résistance et artérioles.....	13
1.3.4. Capillaires.....	14
2. Physiologie du système cardiovasculaire.....	14
2.1. La pression artérielle.....	14
2.1.1. Régulation de la pression artérielle.....	15
2.1.1.1. Régulation à court terme.....	17
2.1.1.2. Régulation à long terme.....	21
2.1.2. Débit cardiaque (Q).....	23
2.1.2.1. Régulation du volume d'éjection.....	24
2.1.2.2. Régulation de la fréquence cardiaque.....	25
2.1.2.3. Contrôle du débit sanguin régional.....	27
2.1.3. Résistance périphérique (R).....	32
2.1.3.1. Mécanisme de contraction des cellules musculaires lisses.....	33
2.1.3.2. Mécanisme de relaxation des cellules musculaires lisses.....	35



2.1.3.3.	Régulation nerveuse de la résistance périphérique .....	37
2.1.3.4.	Régulation par l'endothélium.....	38
2.2.	Rigidité artérielle.....	63
2.2.1.	Facteurs endothéliaux influençant la rigidité artérielle.....	64
2.2.2.	Méthodes de mesure de la rigidité artérielle .....	65
3.	Pathologie du système cardiovasculaire .....	68
3.1.	Hypertension artérielle.....	68
3.2.	Types d'hypertension artérielle.....	68
3.3.	Épidémiologie de l'hypertension systolique isolée.....	71
3.4.	Étiologie de l'hypertension systolique isolée.....	72
3.4.1.	Vieillessement vasculaire et rigidité artérielle.....	74
3.4.1.1.	Changements de la matrice extracellulaire .....	74
3.4.1.2.	Changements cellulaires .....	80
3.4.2.	Rigidité artérielle et hypertension systolique isolée .....	84
3.5.	Risques associés à l'hypertension systolique isolée .....	86
3.6.	Traitement de l'hypertension systolique isolée.....	89
3.7.	Modèles animaux d'hypertension systolique isolée.....	91
3.7.1.	Vieillessement.....	91
3.7.2.	Modèles génétiques.....	92
3.7.2.1.	Modèle de souris déficiente pour le gène de la MGP .....	92
3.7.2.2.	Modèle de souris déficiente pour le gène de la MGP et de l'OPN .....	92
3.7.3.	Modèles d'induction chimique.....	93
3.7.3.1.	Chlorure de calcium .....	93
3.7.3.2.	Modèle vitamine D et nicotine.....	93
3.7.3.3.	Modèle warfarine vitamine K .....	94
4.	Hypothèse et objectifs.....	98
5.	Matériel et méthodes.....	100
5.1.	Design expérimental et traitement des animaux .....	100

5.1.1.	Traitement chronique (L-NAME, sinitrodil et tadalafil) .....	100
5.1.2.	Traitement aigu (sinitrodil) .....	101
5.2.	Mesure des paramètres hémodynamiques.....	101
5.2.1.	Traitement chronique .....	101
5.2.2.	Traitement aigu .....	102
5.3.	Segmentation de l'aorte .....	102
5.4.	Évaluation de la composition des artères.....	103
5.4.1.	Quantification du calcium dans la paroi artérielle .....	103
5.4.2.	Localisation du calcium dans la paroi artérielle.....	103
5.4.3.	Immunohistochimie .....	103
5.4.4.	Immunobuvardage .....	104
5.4.5.	Dosage de l'endothéline tissulaire .....	105
5.4.5.1.	Extraction tissulaire de l'endothéline.....	105
5.4.5.2.	Préparation des échantillons et extraction sur colonne .....	105
5.5.	Mesure des nitrates plasmatiques.....	105
5.6.	Modèle <i>ex vivo</i> de calcification artérielle médiale sur des aortes en culture .....	106
5.7.	Médicaments .....	107
5.8.	Statistiques .....	107
5.9.	Études.....	108
6.	Résultats.....	110
6.1.	Rôle physiologique du NO.....	110
6.1.1.	Bloquer la production de NO par l'administration de L-NAME .....	110
6.1.1.1.	Initiation de la calcification (traitement 4 semaines).....	110
6.1.1.2.	Progression de la calcification (traitement 8 semaines).....	123
6.2.	Aspect thérapeutique.....	135
6.2.1.	Administration exogène de NO.....	135
6.2.1.1.	Effet aigu du sinitrodil .....	135
6.2.1.2.	Effet chronique du sinitrodil .....	139

6.2.2.	Augmentation des effets du NO endogène .....	146
6.2.2.1.	Effet du tadalafil dans l'initiation de la calcification .....	146
6.2.2.2.	Effet du tadalafil dans la progression de la calcification .....	149
7.	Discussion .....	152
7.1.	Général .....	152
7.2.	Aspect physiologique .....	153
7.2.1.	Bloquer la production de NO par l'administration de L-NAME .....	153
7.2.1.1.	Initiation de la calcification .....	154
7.2.1.2.	Progression de la calcification .....	162
7.2.2.	Rôle physiologique du NO et dysfonction endothéliale .....	167
7.3.	Aspect thérapeutique .....	169
7.3.1.	Administration de NO exogène .....	169
7.3.1.1.	Effet aigu du sinitrodil .....	169
7.3.1.2.	Effet chronique du sinitrodil .....	171
7.3.2.	Augmentation des effets endogènes du NO .....	174
7.3.2.1.	Effet du tadalafil dans l'initiation de la calcification .....	174
7.3.2.2.	Effet du tadalafil dans la progression de la calcification .....	176
7.3.3.	Rôle thérapeutique du NO et dysfonction endothéliale .....	177
7.4.	Rôle du NO dans l'hypertension systolique isolée .....	179

## Liste des tableaux

Tableau 1: Affinité des inhibiteurs pour les différentes NOS.....	56
Tableau 2: Sélectivité relative des NOS. ....	57
Tableau 3: Paramètre de mesure de la rigidité artérielle.....	67
Tableau 4 : Changements vasculaires associés au vieillissement.....	73
Tableau 5: Avantages et inconvénients des différents modèles animaux de calcification vasculaire médiale et de vieillissement. ....	97
Tableau 6 : Évolution des paramètres hémodynamiques lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et du L-NAME selon un protocole d'initiation de la calcification. ....	112
Tableau 7 : Évolution de l'expression de la eNOS, la p-eNOS, la iNOS et la GCs lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et du L-NAME selon un protocole d'initiation de la calcification. ....	118
Tableau 8 : Effet de l'administration chronique du traitement WVK et du L-NAME sur les paramètres hémodynamiques. (poursuite du L-NAME).....	120
Tableau 9 : Expression de la eNOS, la phospho-eNOS, la iNOS et la GCs au cours des traitements WVK ainsi que WVK et L-NAME selon un protocole d'initiation de la calcification (poursuite du L-NAME).....	122
Tableau 10 : Évolution des paramètres hémodynamiques lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et du L-NAME selon un protocole de progression de la calcification.....	125
Tableau 11 : Évolution de l'expression de la eNOS, la p-eNOS, la iNOS et la GCs lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et du L-NAME selon un protocole de progression de la calcification.....	130
Tableau 12 : Effet de l'administration chronique du traitement WVK et du L-NAME sur les paramètres hémodynamiques selon un protocole de progression de la calcification (poursuite du L-NAME).....	132

Tableau 13 : Expression de la eNOS, la phospho-eNOS, la iNOS et la GCs au cours des traitements WVK ainsi que WVK et L-NAME selon un protocole de progression de la calcification (poursuite du L-NAME).....	134
Tableau 14 : Paramètres hémodynamiques de base et taux de calcium aortique chez des rats WVK soumis à l'administration aiguë de sinitrodil (Avant l'injection de sinitrodil).	136
Tableau 15 : Effet de l'administration chronique du sinitrodil sur les paramètres hémodynamiques chez des rats WVK. ....	140
Tableau 16 : Effet de l'administration chronique du sinitrodil sur les concentrations aortiques d'ET et de nitrates plasmatiques ainsi que l'expression de la eNOS et de la GCs chez des rats WVK.....	143
Tableau 17 : Effet de l'administration chronique de tadalafil sur les paramètres hémodynamiques selon un protocole d'initiation de la calcification.....	147
Tableau 18 : Effet de l'administration chronique de tadalafil sur les paramètres hémodynamiques selon un protocole de progression de la calcification. ....	150

## Liste des figures

Figure 1:	La circulation sanguine et les différents lits capillaires. ....	2
Figure 2:	Structure d'un vaisseau sanguin. ....	9
Figure 3:	Compositions des différents segments vasculaires. ....	12
Figure 4:	Synthèse des facteurs déterminant la pression artérielle. ....	16
Figure 5:	Mécanisme de contraction des cellules musculaires lisses vasculaires. ....	35
Figure 6:	Mécanisme de relaxation des cellules musculaires lisses. ....	37
Figure 7:	Réactions catalysées par les NOS. ....	41
Figure 8:	Structure des NOS en homodimère et mouvement des électrons. ....	42
Figure 9:	Évolution des pressions systolique et diastolique et pulsée dans le vieillissement. ....	71
Figure 10:	Impact de la rigidité artérielle sur les différents paramètres hémodynamiques, comparaison avec un sujet jeune. ....	86
Figure 11:	Conséquences de l'augmentation de la rigidité artérielle. ....	89
Figure 12:	Effet de la warfarine sur l'activité de la MGP. ....	95
Figure 13:	Évolution des taux de calcium aortiques et du PWV lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK avec du L-NAME selon un protocole d'initiation de la calcification. ....	114
Figure 14:	Évolution des taux d'endothéline aortique lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et du L-NAME selon un protocole d'initiation de la calcification. ....	116
Figure 15:	Évolution de l'expression de la iNOS lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et L-NAME ainsi que sa localisation dans la paroi vasculaire selon un protocole d'initiation de la calcification. ....	117
Figure 16:	Effet du traitement WVK et du L-NAME sur les taux de calcium dans l'aorte selon un protocole d'initiation de la calcification (poursuite du L-NAME). ....	121

Figure 17: Évolution des taux de calcium aortique lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et L-NAME ainsi que la localisation des dépôts de calcium au niveau de la paroi aortique selon un protocole de progression de la calcification.....	126
Figure 18: Évolution du PWV aortique lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et du L-NAME selon un protocole de régression de la calcification.....	127
Figure 19: Évolution des taux d'endothéline aortique lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et du L-NAME ainsi que la localisation de l'ET au niveau de la paroi aortique selon un protocole de progression de la calcification. ....	129
Figure 20: Effet du traitement WVK et du L-NAME sur les taux de calcium dans l'aorte selon un protocole de progression de la calcification (poursuite du L-NAME). ....	133
Figure 21: Variation des valeurs de PWV après une injection i.v. de sinitrodil.....	137
Figure 22: Aire sous la courbe des résultats présentés à la figure 21. ....	138
Figure 23: Effet maximal du sinitrodil sur le PWV (Après l'injection de sinitrodil). ....	139
Figure 24: Effet chronique du sinitrodil sur les taux de calcium et les valeurs de PWV chez des rats WVK.....	142
Figure 25: Effet du DETA/NO sur les taux de calcium aortique dans le modèle <i>ex vivo</i> de calcification vasculaire médiale. ....	144
Figure 26: Effet du T-1032 (iPDE5) sur les taux de calcium aortique dans un modèle <i>ex vivo</i> de calcification vasculaire. ....	145
Figure 27: Effet de l'administration chronique de tadalafil sur les taux de calcium aortique et les valeurs de PWV selon un protocole d'initiation de la calcification. ...	148
Figure 28: Effet de l'administration chronique de tadalafil sur les taux de calcium aortique et le PWV selon un protocole de progression de la calcification. ....	151
Figure 29: Relation entre la calcification de l'aorte et le PWV.....	153

## Liste des abréviations

3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase	HMG CoA réductase
Acétylcholine	Ach
Acide aminé	a.a.
Acide arachidonique	AA
Acide chlorhydrique	HCl
Acide ribonucléique messenger	ARNm
Acide trifluoroacétique	TFA
Accident vasculaire cérébral	AVC
Acides époxyeicosatriénoïques	EET
Adénosine monophosphate cyclique	AMPc
Adénosine triphosphate	ATP
Advanced glycation end products	AGE
AMP-activated protein kinase	AMPK
Angiotensin-converting enzyme	ACE
Angiotensine II	AngII
Anions superoxydes	O <sup>2-</sup>
Antagonistes des récepteurs de l'AngII	ARA
Anti-inflammatoires non-stéroïdiens	AINS
Asymmetric dimethylarginine	ADMA
Battement par minute	bpm
Bloqueurs des canaux calciques	BCC
Bone sialoprotein	BSP
Bradykinine	BK
Ca <sup>2+</sup> /CaM-dependent protein kinase	CaMKII
Calcium	Ca <sup>2+</sup>
Calmoduline	CaM
Canaux potassiques activés par le calcium	KCa
Cavéoline-1	Cav-1
Cellules endothéliales	CE
Cellules musculaires lisses vasculaires	CMLV
Centimètre	cm
Chlorure de calcium	CaCl <sub>2</sub>
Chlorure de sodium	NaCl
Core binding factor $\alpha$ -1	Cbfa-1



Cyclooxygénase	COX
C-type natriuretic peptide	CNP
Débit cardiaque	Q
Diacylglycérol	DAG
Diamètre	D
Diastolique	diast
Diéthylènetriamine-NO	DETA/NO
Différence de pression	$\Delta P$
Diméthylarginine diméthylaminohydrolase	DDAH
Dodécyl sulfate de sodium	SDS
Elastin microfibril interface located protein	EMILIN
Endothelial-derived contracting factor	EDCF
Endothelial-derived relaxing factor	EDRF
Endothéline	ET
Enzyme de conversion de l'angiotensine	ACE
Enzyme de conversion de l'endothéline	ECE
Espèces réactives de l'oxygène	ROS
Facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium	EDHF
Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium	EDHF
Fentomole	fmol
Flavin adénine dinucléotide	FAD
Flavin mononucléotide	FMN
Fréquence cardiaque	FC
Gaz carbonique	CO <sub>2</sub>
Glutathion peroxydase	GPx
Glycoaminoglycanes	GAG
Guanosine monophosphate cyclique	GMPc
Guanosine triphosphate	GTP
Guanylate cyclase membranaire	GC-A
Guanylate cyclase soluble	GCs
heat shock protein 90	HSP90
Hormone antidiurétique	ADH
Index d'augmentation	Aix
Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine	iECA
Inhibiteur de phosphodiésterases	iPDE
Inositol triphosphate	IP <sub>3</sub>

Intra-péritonéale	i.p.
Intraveineux	i.v.
Isosorbide dinitrate	ISDN
Isosorbide mononitrate	ISMN
Kinase de la chaîne légère de myosine	MLCK
L-N <sup>G</sup> -nitroarginine methyl ester	L-NAME
Leukotriène	LT
Lipopolysaccharide	LPS
lysyl-oxydase	LOX
Matrice extracellulaire	MEC
Matrix Gla protein	MGP
Métalloprotéinase matricielle	MMP
Microfibril-associated protein	MAGP
Millilitre	mL
Millimètre	mm
Monoxyde d'azote	NO
Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate	NADPH
Nitroglycérine	NTG
Nitroprussiate de sodium	SNP
NO synthase endothéliale	eNOS
NO synthase inducible	iNOS
NO synthase mitochondriale	mtNOS
NO synthase neuronale	nNOS
NO synthase	NOS
Noradrénaline	NA
Ostéocalcine	OCN
Ostéopontine	OPN
Ostéoprotégérine	OPG
Oxygène	O <sub>2</sub>
Paraformaldéhyde	PFA
Peptide natriurétique auriculaire	ANP
Peroxyde d'hydrogène	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Petit protéoglycane riche en leucine	SLRP
Phosphatase alcaline	ALP
Phosphatase de la chaîne légère de myosine	MLCP
Phosphate	PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>

Phosphatidyl inositol diphosphate	PIP <sub>2</sub>
Phosphatidylinositol-3 kinase	PI <sub>3</sub> K
Phospholipase A <sub>2</sub>	PLA <sub>2</sub>
Phospholipase C	PLC
Potassium	K <sup>+</sup>
Préproendothéline	préproET
Pression artérielle	P
Pression artérielle moyenne	PAM
Prostacycline	PGI <sub>2</sub>
Prostaglandine	PG
Protein kinase C-potentiated inhibitor protein of 17 kDa	CPI-17
Protein phosphatase 2A	PP2A
Protein phosphatase 2B	PP2B
Protéine kinase A	PKA
Protéine kinase B	PKB
Protéine kinase C	PKC
Protéine kinase G	PKG
Protons	H <sup>+</sup>
Récepteur de l'IP <sub>3</sub>	R-IP <sub>3</sub>
Receptor-operated channel	ROC
Résistance périphérique	R
Réticulum sarcoplasmique	RS
RhoA kinase	RhoAK
S-nitroso-N-acétylpenicillamine	SNAP
Seconde	s
Smooth muscle-myosin heavy chain	SM-MHC
Sodium	Na <sup>+</sup>
Superoxyde dismutase	SOD
Systolique	syst
Tampon Tris avec sel et tween 20	TBS-t
Tétrahydrobioptérine	BH <sub>4</sub>
Thromboxane A <sub>2</sub>	TXA <sub>2</sub>
Transforming growth factor-β	TGF-β
Vascular endothelial growth factor	VEGF
Vascular endothelium cadherin	VE-cadherin

Vasoactive intestinal polypeptide	VIP
Vasopressine	AVP
Vitesse de l'onde de pouls	PWV
Volume	V
Volume d'éjection	VE
Zinc	Zn

*À mes parents qui m'ont toujours soutenue  
dans ce que j'entreprenais et qui m'ont  
appris à persévérer malgré les embûches.*

*À Gyslaine Payette qui a été pour moi une  
inspiration. Tu es malheureusement partie  
trop tôt pour voir ce que je pouvais  
accomplir.*

## Remerciements

Entreprendre des études supérieures est considéré par certains comme un acte courageux et mais au-delà du courage, il y a également la détermination, la persévérance et le dépassement de soi qui permettront de les réussir et surtout de les terminer. C'est un long cheminement intellectuel et personnel parsemé d'embûches et de déceptions, mais qui en vaut la peine si ce n'est que pour les bons moments passés avec des gens que j'apprécie énormément. La réussite de mes études est en partie grâce à ces gens qui, durant toutes ces années, m'ont aidée, supportée, encouragée et je tiens à les remercier.

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Pierre Moreau, pour ces 7 années d'études graduées. Tu as été non seulement un mentor, mais aussi un modèle d'équilibre. De par tes qualités de pédagogue, mes études ont été très enrichissantes scientifiquement, mais aussi sur le plan humain. Tu es soucieux de la formation de tes étudiants et à l'écoute de leurs aspirations. Tu mets tout en œuvres pour que nos plans de carrière deviennent réalité. Merci de m'avoir soutenue dans mes démarches pour le programme de biochimie clinique et de m'avoir permis de prendre du temps de laboratoire pour suivre des cours servant à ma formation future. Je veux aussi que tu saches que j'ai beaucoup apprécié ta disponibilité et ce même si dans les dernières années c'était plus difficile. Tu as toujours été là pour moi : dans les bons comme dans les moins bons moments. Merci de m'avoir écoutée étaler mes états d'âme et émettre mes opinions. Il faut toujours que tu te gardes des Kleenex dans ton bureau, car tu vas peut-être superviser d'autres étudiantes aussi sensibles!!

Je tiens également à remercier Louise Ida Grondin. Ton expertise a été très appréciée au cours de ces années. Ton aide a été bien au-delà du plan technique. J'ai beaucoup apprécié nos discussions qui étaient intéressantes, diversifiées et réconfortantes en cas de besoin. Un doctorat, ce n'est pas toujours facile! Tu prends la vie du bon côté et c'est très inspirant. J'espère qu'avec les années et la sagesse, je pourrai en faire autant.

Pour toi, rien n'est impossible... et tout peut se réparer. Je vais peut-être avoir besoin d'une réparatrice Maytag dans le laboratoire à Rouyn. Merci d'avoir été là pour moi, sans ton aide, je serais sûrement encore en train de canuler des rats!

Les études supérieures c'est également l'entraide, la convivialité et l'amitié. Je veux donc remercier tous les étudiants du laboratoire avec qui j'ai passé des moments exceptionnels. Dès mon arrivée, je me suis sentie acceptée et appréciée. Grâce à une ambiance agréable tant dans le laboratoire qu'au niveau de la faculté, j'ai rapidement développé un fort sentiment d'appartenance. Je veux donc, dans un premier temps, remercier les étudiants présents à mon arrivée. Merci à Daphné qui m'a accueillie et supervisée durant mon stage. Malgré une première journée de stage assez éprouvante, j'ai persévéré. Je veux également remercier Huy Hao Dao, Rachida Essalihi, Pierre Beucage, Marie-Pierre Rousseau et Vincent Blouin. Merci pour votre support, vos conseils et votre amitié. Vous avez ensoleillé mes journées. Un merci particulier à Simon Moreau, arrivé dans le laboratoire en 2004. Être en ta compagnie c'est toujours divertissant et je te serai éternellement reconnaissante d'avoir pris soins de mes rats pendant que j'étais en congrès à Cancun avec Rachida, Céline et Daphné. Le doctorat comporte quand même de bons côtés! Je veux également remercier, Céline Bouvet, présente à mon arrivée dans le laboratoire. Au début une collègue, mais maintenant une amie et une confidente. Tu as toujours été là pour moi autant scientifiquement que personnellement. Ton dévouement envers tes amis est incomparable et je t'en suis reconnaissante. Merci de faire partie de ma vie. En 2012, je vais m'installer dans une contrée lointaine, mais ne t'inquiète pas, je vais venir me promener aussi souvent que possible et j'espère que tu vas venir me visiter à Rouyn. Tu pourras enfin voir le désormais célèbre lac Osisko.

Il y a aussi les étudiants des autres laboratoires avec qui j'ai passé de très beaux moments et avec qui j'ai tissé des liens solides. Plusieurs des étudiants que j'ai côtoyés ont déjà quitté, mais je tiens tout de même à les remercier. Je pense à tout d'abord à Marie-Christine Jones et à Marie-Andrée Yessine qui se sont expatriées pour quelques années et

avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir. D'autres avec qui je partage encore de très bons moments, que ce soit à la faculté ou lors d'activités moins scientifiques! Je ne veux oublier personne, mais que se soit Valérie Chénard, Annie Douillette, Nicolas Bertrand, Simon-Pierre Gravel, Christian Jossart, Annie Bibeau-Poirier, Louis-Dominic Tremblay et Jean-François Clément, je vous aime et je suis contente que nos chemins se soient croisés.

Mes années à la faculté de pharmacie ont été stimulantes et agréables. Je suis déjà nostalgique de quitter un milieu de travail qui me plaît énormément, mais c'est la vie. Réaliser des études graduées ne serait pas possible sans le soutien de nombreuses personnes. Je tiens donc à remercier Andrée Mathieu, Monique Leblanc, Gynette Choquette, Sophie Brisebois, Leila Andraos et Lucie Racine. Vous avez été d'une grande aide et d'une gentillesse incroyable.

Ils ne font pas partie de la faculté de pharmacie, mais ils ont toujours été là pour moi et ce depuis toujours. Merci à mes parents, Diane et Jacques, qui non seulement m'ont aidé financièrement, mais également moralement. Depuis mon départ de la maison, il y a maintenant 10 ans, vous m'avez soutenue, encouragée et consolée. Vous m'avez appris à persévérer et surtout à avoir confiance en mes capacités. Merci à mon frère, Christian, ainsi qu'à ma belle sœur, Sophie. Mes premières années à Montréal auraient été beaucoup plus difficiles sans vous. Je veux vous remercier pour votre support et vos encouragements tout au long de mes études, mais comme j'entreprends le programme de biochimie clinique, je vais encore avoir besoin de vous!!

En plus d'avoir été un directeur de recherche hors pair, je veux remercier Pierre Moreau pour m'avoir également supportée financièrement durant mes premières années dans le laboratoire. Par la suite j'ai eu la chance d'obtenir une bourse de la Société québécoise d'hypertension artérielle ainsi que 3 ans de bourse provenant du Fonds de recherche en santé du Québec. Sans cet argent, j'aurais eu à m'endetter davantage.



Ce n'est jamais facile de quitter un milieu de travail qu'on aime et qu'on apprécie. En espérant que mes 2 prochaines années en biochimie clinique soient aussi enrichissantes et divertissantes que les 7 dernières.

Vous allez me manquer. Je vous aime.

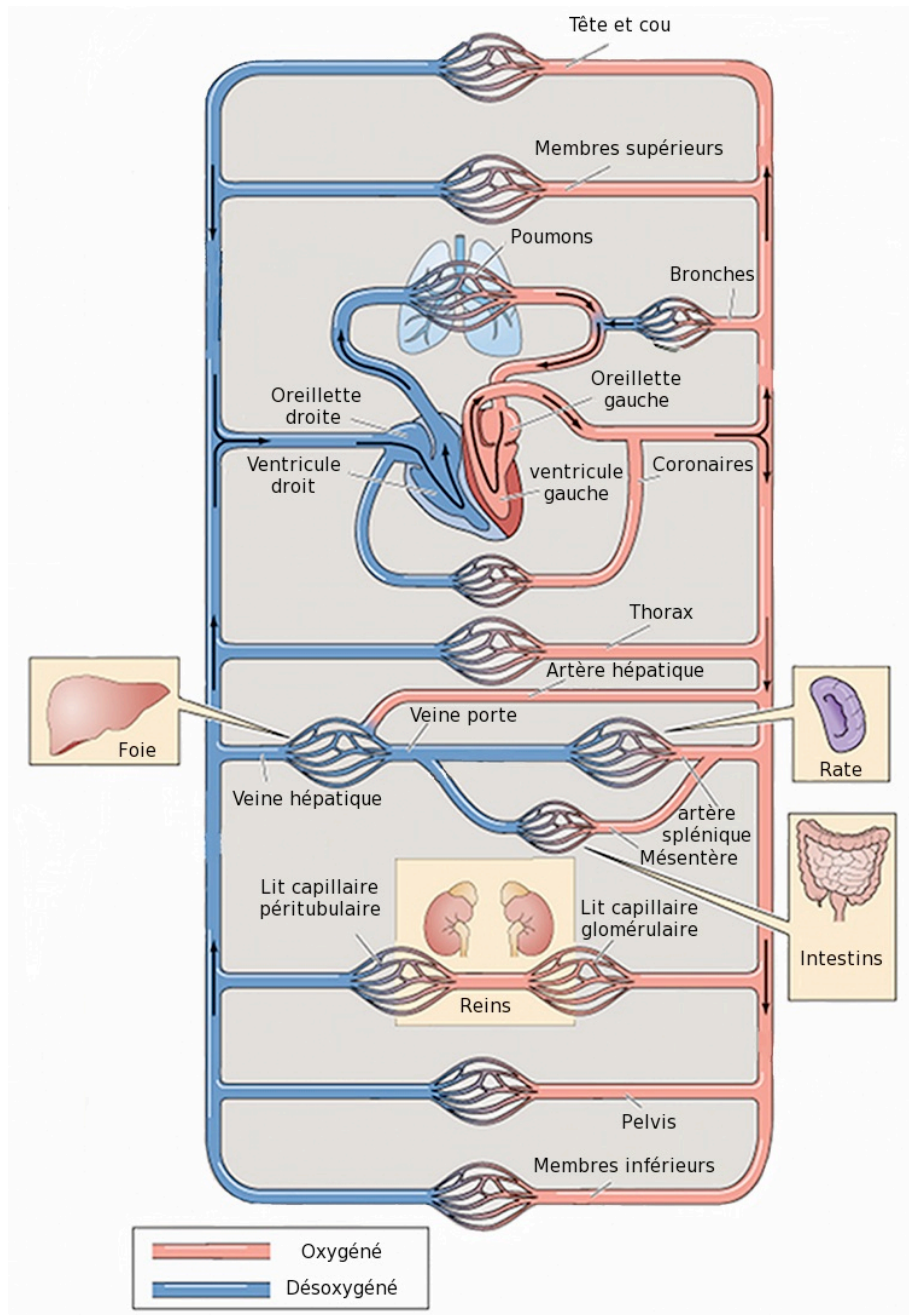
Liz-Ann ☺

# Introduction

## 1. Anatomie du système vasculaire

### 1.1. Vue d'ensemble

La principale fonction du système cardiovasculaire est d'acheminer les nutriments et l'oxygène ( $O_2$ ) nécessaire aux tissus et aux organes (foie, reins, cerveau, cœur, muscles) pour leur croissance et leur réparation ainsi qu'éliminer les déchets. Pour se faire, le sang est pompé par le cœur dans les artères soit vers la circulation systémique ou pulmonaire. Le côté gauche du cœur éjecte le sang oxygéné provenant des poumons dans la circulation systémique, c'est-à-dire dans tout l'organisme, tandis que le côté droit du cœur envoie le sang pauvre en oxygène vers les poumons pour qu'il soit débarrassé de ses déchets et réoxygéné. Durant un cycle cardiaque, le sang sort du ventricule gauche et entre dans la circulation systémique par l'aorte (artère élastique). Tout au long de son cheminement dans l'arbre artériel, le sang s'écoulera dans des vaisseaux de plus en plus petits, passant par des artères musculaires, des artères de résistance, des artérioles et finalement par des capillaires où la diffusion des nutriments et de l'oxygène aux organes est possible. En aval des capillaires, le sang, appauvri en nutriments et en oxygène, est maintenant chargé de gaz carbonique ( $CO_2$ ) et de déchets métaboliques. Il empruntera des veinules qui deviendront de plus en plus grosses pour finalement se déverser dans l'oreillette droite par l'intermédiaire de la veine cave inférieure et supérieure. Le sang passera successivement de l'oreillette droite vers le ventricule droit puis sera envoyé dans la circulation pulmonaire via les artères pulmonaires. Rendu au niveau des capillaires alvéolaires, le sang pourra expulser le  $CO_2$  et capter de l'oxygène. Le sang fraîchement oxygéné quitte les poumons par les veines pulmonaires et entre dans l'oreillette gauche puis le ventricule gauche. Les déchets métaboliques seront, quant à eux, transportés au foie et aux reins pour être éliminés. [1, 2]. (Figure 1).



**Figure 1: La circulation sanguine et les différents lits capillaires.**

Adapté de [2].

Cette description du parcours du sang à travers ce réseau artérioveineux n'est qu'un survol très sommaire de la beauté et de l'ingéniosité, mais aussi de la complexité du système cardiovasculaire. Afin de mieux le comprendre, voici quelques notions d'anatomie.

## **1.2. Paroi vasculaire**

Les vaisseaux sanguins ne sont pas de simples tubes inertes servant à acheminer le sang dans tout le corps, mais plutôt des structures complexes composées de différents types cellulaires et d'un réseau de macromolécules protéiques et glucidique qui sert d'ancrage aux cellules, la matrice extracellulaire (MEC).

### **1.2.1. Composition générale**

#### **1.2.1.1. Cellules**

Les cellules composant la paroi vasculaire sont les cellules endothéliales (CE), les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) et les fibroblastes. Ces différents types de cellules ont tous des rôles bien distincts à jouer.

##### *a. Cellules endothéliales*

Les cellules endothéliales sont des cellules polygonales aplaties couvrant l'ensemble du système cardiovasculaire [3]. Elle forme une monocouche semi-perméable faisant face à la circulation sanguine qu'on appelle également endothélium. Cette semi perméabilité est due au glycocalyx, couche riche en résidus glucidiques sur la face luminale des cellules [4]. La présence de glycoprotéines, de glycolipides et de protéoglycanes sur la surface externe donne une charge nette négative empêchant le passage de grosses molécules, mais qui laisse passer des plus petites comme l'eau et le glucose [3]. Les cellules endothéliales sont reliées entre-elles par des jonctions serrées ainsi que par des jonctions d'adhérence. Ces

dernières sont constituées de VE-cadhérines (*vascular endothelium cadherin*) qui s'associe aux VE-cadhérines de la cellule adjacente tandis que les jonctions serrées sont constituées d'un enchevêtrement d'occludines et de claudines [5]. Afin de permettre la transmission de signaux vasomoteurs d'une cellule à l'autre, les cellules endothéliales possèdent également des jonctions communicantes de type gap (*gap junction*). Finalement, les cellules endothéliales reposent sur la membrane basale et elles sont fixées à celle-ci par des intégrines, protéines transmembranaires liées au cytosquelette situé à l'intérieur des cellules [3].

De par sa localisation ainsi que sa structure, l'endothélium joue plusieurs rôles importants dans l'organisme :

- Modulation des échanges entre le sang et les tissus
- Participation à la défense de l'organisme
- Initiation de l'angiogénèse
- Sécrétion des substances impliquées dans la cascade de coagulation (monoxyde d'azote (NO), prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et le facteur de Von Willebrand)
- Sécrétion de substances vasoactives sur le muscle sous-jacent (NO, PGI<sub>2</sub>, endothéline (ET), facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF), thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), anions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)) [3].

#### *b. Cellules musculaires lisses*

Les cellules musculaires lisses sont de formes allongées avec des extrémités pointues. Elles sont disposées en anneaux parallèles autour de la lumière du vaisseau [1]. Contrairement aux cellules du muscle squelettique, elles possèdent qu'un seul noyau. Elles sont entourées par la MEC composée principalement de collagène et d'élastine. Tout comme les cellules endothéliales, les CMLVs sont ancrées à la MEC par les intégrines. Ces dernières ne servent pas seulement de protéines d'ancrage, mais également de récepteurs. Comme les CMLVs ont un rôle de contraction, elles contiennent de l'actine, de

la myosine et de la tropomyosine mais qui, contrairement aux cellules du muscle cardiaque ou squelettique, ne possèdent pas de troponine et ne forment pas de filaments bien organisés. Par contre, les CMLVs possèdent des corps denses reliés par des filaments de desmine et de vimentine permettant de se contracter uniformément. Elles possèdent également des jonctions de type gap permettant la transmission de la dépolarisation d'une cellule à l'autre [3]. Ainsi, les CMLVs permettent la redistribution des débits sanguins et le maintien d'une pression artérielle adéquate [6]. Elles peuvent également avoir d'autres fonctions comme celle de synthétiser des constituants de la MEC. Cette fonction est importante tant en condition physiologique qu'en condition pathologique [7].

### *c. Fibroblastes*

Les fibroblastes sont de grandes cellules aplaties dotées de plusieurs prolongements ramifiés. Les fibroblastes font partie de la famille des cellules du tissu conjonctif tout comme les chondrocytes et les ostéocytes/ostéoblastes. Les fibroblastes sont responsables de la sécrétion, du réarrangement et de la dégradation de la MEC au niveau de la paroi vasculaire. Ils sont donc responsables de la sécrétion des macromolécules qui composent la matrice [4]. En fonction de leur degré d'activation, ils peuvent être soit des fibrocytes ou des fibroblastes. Un fibrocyte est un fibroblaste qui a une activité moindre. Sous l'effet d'une stimulation par des facteurs de croissance par exemple, le fibrocyte peut devenir un fibroblaste. Il existe également des fibroblastes spécialisés possédant des propriétés contractiles, ce sont les myofibroblastes. Ces derniers expriment plusieurs protéines impliquées dans la formation des fibres de stress dont l' $\alpha$ -actine et la fibronectine [8].

#### **1.2.1.2. Matrice extracellulaire**

La matrice extracellulaire de la paroi vasculaire est un assemblage complexe de macromolécules dans lequel les cellules sont ancrées. Autrefois, la croyance voulait que la MEC ne soit qu'une substance inerte n'ayant pour fonction que le soutien des tissus, mais il en est tout autrement. En effet, en plus de protéger les cellules, les macromolécules

composant la MEC participent à leur développement, à leur prolifération, à leur migration, à leur changement phénotypique et à l'accomplissement de leur rôle physiologique [1]. Ces macromolécules peuvent être divisées en quatre groupes : les fibres de collagène, les fibres élastiques, les protéoglycanes et les glycoprotéines de structure.

#### *a. Les fibres de collagène*

Les fibres de collagène de la paroi vasculaire servent à maintenir l'intégrité du vaisseau lorsque la pression est élevée. Elles résistent à l'étirement. À pression normale, moins de 10% des fibres de collagène sont utilisées tandis qu'à pression plus élevée, le vaisseau devient progressivement moins dilatable au fur et à mesure que les fibres de collagène sont recrutées [9]. Il existe près d'une trentaine de types de collagènes différents et 17 types ont été identifiés dans l'aorte de souris. Les plus abondants sont les collagènes de type I, III, IV, V et VI [10]. Les collagènes peuvent être répartis en deux groupes : les collagènes fibrillaires et les collagènes non-fibrillaires. Parmi les collagènes les plus abondants, les type I, III et V sont des collagènes fibrillaires [11]. Une molécule de collagène est formée de trois chaînes  $\alpha$  qui s'associent en triple hélice. Par la suite, il y aura association de plusieurs triples hélices pour former des fibrilles. Ces hélices tricaténaires sont liées ensemble à l'intérieur de la fibrilles par des liaisons covalentes catalysées par la lysyl-oxydase (LOX) [12]. Finalement, les fibrilles de collagène s'agrègent pour former des fibres de collagènes de 0,5 à 3 $\mu$ m de diamètre [2, 4]. Au niveau vasculaire, les collagènes de type I, III et V s'associent dans la même fibrille formant ainsi une fibrille hétérotypique. Les collagènes de type IV et VI sont des collagènes non-fibrillaires. Au lieu de former des fibrilles, ils forment des feuillettes ou des réseaux. Ils entrent dans la composition de la membrane basale synthétisée par les cellules endothéliales [13]. De plus, on retrouve le collagène de type VI fréquemment associé à des molécules de la MEC comme la fibrilline-1 [14]. Dans un contexte pathologique, des études ont montré l'implication du collagène de type I dans des processus de fibrose vasculaire, mécanisme de

réparation compensatoire mis en branle par l'organisme en réponse à un dommage tissulaire [15, 16].

### *b. Les fibres élastiques*

Les fibres élastiques donnent de l'élasticité à la paroi vasculaire. En effet, les fibres élastiques permettent aux vaisseaux de se dilater et de reprendre leur forme sans être endommagés [17]. Dans les grosses artères comme l'aorte, ce sont les fibres les plus importantes. Elles constituent plus de 50% du poids sec de l'aorte. Par contre, en s'éloignant du cœur et en allant vers la périphérie, la proportion de fibres élastiques diminue. Elles ne forment plus que 10% du poids sec des artérioles [2, 17]. Les fibres élastiques sont principalement composées d'élastine et de microfibrilles. Les CMLVs synthétisent et sécrètent le précurseur soluble de l'élastine, la tropoélastine [18]. Cette protéine non-glycosylée et très hydrophobe se fixe aux microfibrilles qui forment la charpente de la fibre. Les monomères de tropoélastines s'agrègent ensemble de façon ordonnée et subissent une désamination oxydative catalysée par la lysyl-oxydase permettant la formation de liaisons covalentes entre les monomères de tropoélastine et ainsi former les fibres élastique. Ces liaisons covalentes se font lors du développement rendant l'élastine insoluble [19]. Il n'y a pas de réparation coordonnée par la suite ce qui donne à l'élastine une longue demi-vie.

### *c. Les glycoprotéines de structures*

Il a été mentionné précédemment que les fibres élastiques sont principalement formées d'élastine et de microfibrilles. Ces dernières sont constituées de glycoprotéines de structure, notamment les fibrillines [20]. La fibrilline-1 et la fibrilline-2 sont les principales protéines constituant les microfibrilles [21]. Les microfibrilles sont également constituées de MAGPs (*microfibril-associated glycoproteins*). Avec les fibrillines, la MAGP-1 et la MAGP-2 sont nécessaires à l'assemblage des fibres élastiques [22, 23]. En effet, la MAGP-1 interviendrait dans toutes les étapes de l'assemblage des fibres élastiques en



formant des complexes avec certains protéoglycanes, les fibrillines et la tropoélastine [24]. Les EMILIN et les fibulines sont des glycoprotéines également impliquées à divers niveaux dans la formation des fibres élastiques. En effet, les ÉMILINs (*elastin microfibril interface located protein*) se retrouvent à l'interface entre les microfibrilles et l'élastine [25]. L'ÉMILIN-1 peut lier à la fois la tropoélastine et la fibuline-5 suggérant qu'elle pourrait servir de pont entre ces deux molécules [26]. Les fibulines font partie d'une famille comprenant sept membres, fibuline-1 à fibuline-7. Elles se retrouvent toutes au niveau des fibres élastiques sauf les fibuline-6 et 7 [27]. La plupart de ces protéines possèdent des domaines particuliers leur permettant d'interagir avec l'élastine, la membrane ou les intégrines. En effet, les fibrillines et les fibulines possèdent des domaines *calcium-binding epidermal growth factor like* (cbEGF) qui permettent une interaction dépendante du calcium avec l'élastine [28, 29] ainsi que des domaines RGD (arginine, glycine, acide aspartique) qui sont reconnus par certaines intégrines [30]. Les fibrillines possèdent également un domaine *heparin-binding* qui interagit avec un protéoglycane à la surface des cellules, l'héparane sulfate, suggérant une interaction directe avec les cellules [31].

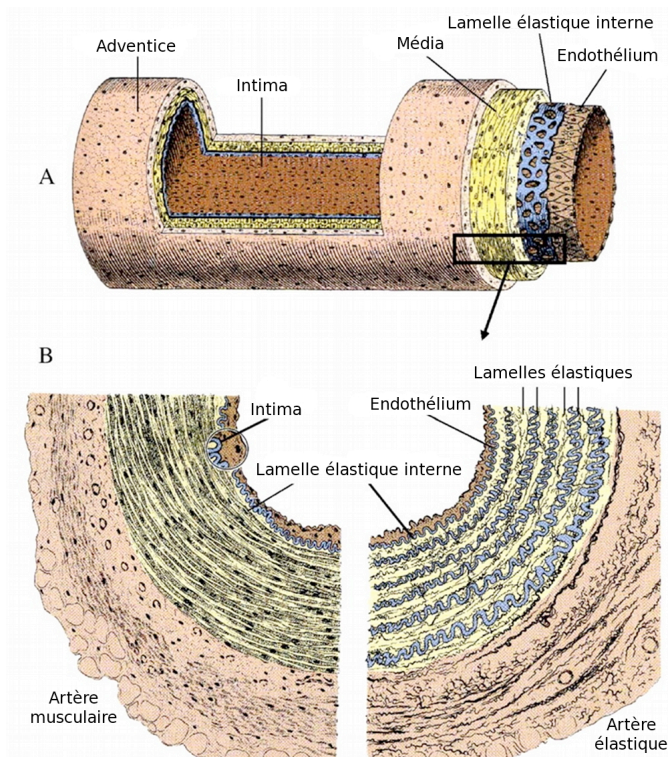
#### d. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes englobent plusieurs familles de protéines multimériques possédant des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) liées de façon covalente. Les protéoglycanes retrouvés au niveau de la paroi vasculaire peuvent être séparés en deux classes : les protéoglycanes larges interagissant avec l'acide hyaluronique et les petits protéoglycanes riches de leucine (*small leucine-rich proteoglycans*, SLRP) [21]. Parmi les protéoglycanes interagissant avec l'acide hyaluronique, il y a le versicane et l'aggrécane. Ils se retrouvent tous les deux dans la média de l'aorte [32, 33]. Le versicane est connu pour induire l'adhésion cellulaire, promouvoir la prolifération et influencer la migration cellulaire, par contre, le rôle de l'aggrécane dans la paroi vasculaire est encore inconnu. Les SLRPs sont quant à eux des protéoglycanes liant des molécules de la matrice extracellulaire comme le collagène, la tropoélastine, les microfibrilles contenant de la

fibrilline [34]. Ils se retrouvent tous au niveau de l'aorte. Cette famille comprend notamment la décorine, le biglycane, et le lumican. Ils lient le collagène et régulent sa fibrillogénèse (synthèse de fibres de collagène) [21, 35].

### 1.2.2. Organisation et rôles

La paroi vasculaire est divisée en trois couches : l'intima, la média et l'adventice. À l'exception des capillaires, qui ne présentent que l'intima, tous les vaisseaux de l'organisme présentent cette structure organisée en trois parties bien distinctes (Figure 2).



**Figure 2: Structure d'un vaisseau sanguin.**

**A.** Vue d'ensemble montrant les différentes couches. **B.** Coupe transversale d'une artère musculaire (gauche) et d'une artère élastique (droite).

Adapté de [17].

### **1.2.2.1. Intima**

L'intima est la couche la plus interne de la paroi. Elle est composée d'une monocouche de cellules endothéliales faisant face au flux sanguin. Étant en contact direct avec la circulation sanguine, les cellules endothéliales servent de senseurs aux variations de flux et de composition du sang [1]. Elles sont posées sur une couche de tissu conjonctif, la membrane basale. Cette membrane est composée de collagène de type IV associé à un réseau de laminine où adhère des protéoglycanes comme le perlécane. Cette structure moins dense que la MEC fournit un support aux cellules endothéliales [36]. L'intima comprend également une région sous-endothéliale contenant des cellules endothéliales (sous-endothéliales) du tissu conjonctif et quelques CMLVs [37]. Collée à cette région, la lamelle élastique interne forme la frontière avec la couche suivante, la média.

### **1.2.2.2. Média**

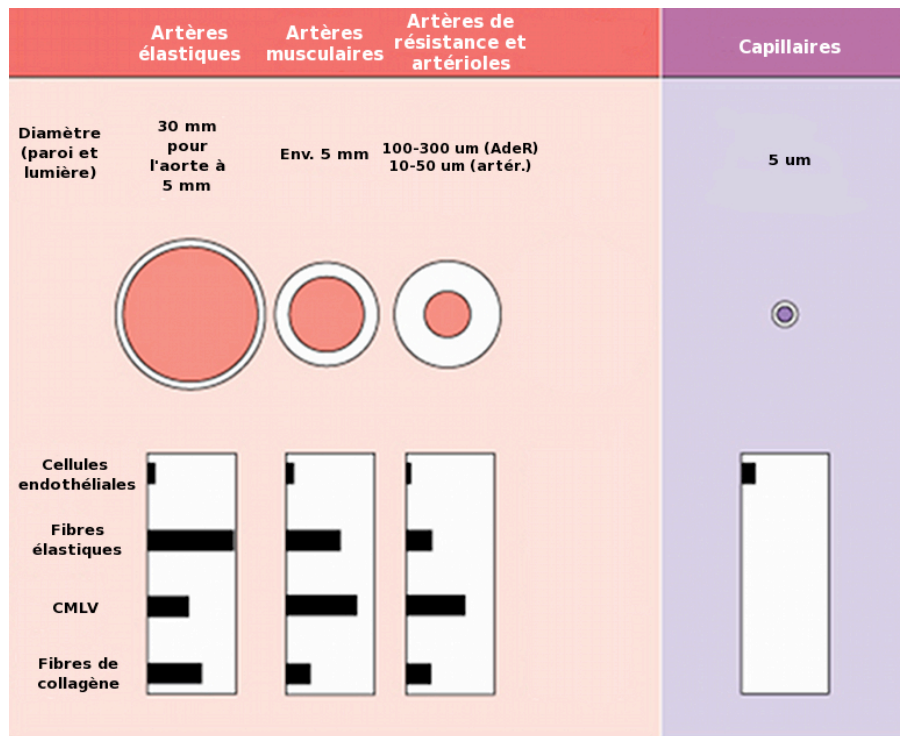
La média est un agencement complexe de plusieurs couches de CMLVs et de MEC. Cette MEC est composée de fibres de collagènes, de fibres élastiques disposées en réseaux, de protéoglycanes et de glycoprotéines de structures. Au niveau de l'aorte, les fibres élastiques sont disposées en feuillets ou lamelles entre lesquelles il y a des fibres de collagènes et des CMLVS. Il y a également des minces fibres élastiques qui se connectent aux lamelles formant ainsi un réseau tridimensionnel. De par sa composition, la média confère au vaisseau la capacité de se dilater et de se contracter [1]. La lamelle élastique externe délimite la média de l'adventice, couche la plus externe de la paroi vasculaire.

### **1.2.2.3. Adventice**

Entourant la média, l'adventice est principalement composée de fibroblastes et d'une MEC riche en collagène. Dans les grosses artères, cette forte proportion de collagène aide à prévenir la rupture du vaisseau à des pressions élevées. Il est maintenant bien accepté que le rôle de l'adventice ne se limite pas à des fonctions mécaniques et

structurelles. En effet, elle est le réservoir de facteurs de régulation de la paroi vasculaire. Certaines études montrent même que les fibroblastes de l'adventice pourraient être impliqués dans la relâche de substances vasoactives comme le NO [38, 39]. L'adventice des grosses artères contient de petits vaisseaux servant à nourrir la média, les vasa vasorum.

Malgré une structure similaire, la composition ainsi que les proportions des différentes cellules et fibres des vaisseaux varient tout au long de l'arbre artériel, donc selon le type d'artères, la structure est modifiée afin de s'adapter à leur fonction particulière. Ainsi, l'architecture des différents segments artériels est organisée de sorte que les échanges de nutriments et de gaz puissent se faire de façon efficace au niveau des capillaires. Pour se faire, le flux sanguin pulsatile sortant du cœur est amorti au niveau de l'aorte grâce à sa forte composante élastique. Le flux devient constant à mesure que le sang s'éloigne du cœur. Les artères de résistance et les artérioles assurent un flux sanguin constant en augmentant la résistance par une contraction musculaire. La figure 3 illustre bien ces variations de structure.



**Figure 3: Compositions des différents segments vasculaires.**

Adapté de [2].

## 1.3. Description des différents types d'artères

### 1.3.1. Artères élastiques

Les artères élastiques, comme le nom l'indique, possèdent une forte proportion de fibres élastiques dans leur paroi. Par cette caractéristique, elles assurent la propulsion du sang au moment où les ventricules se relâchent. Lorsque le sang est éjecté du cœur et entre dans les artères élastiques, leur paroi s'étire à l'arrivée de sang sous pression. En s'étirant, les artères emmagasinent temporairement de l'énergie mécanique et deviennent un

réservoir de pression (effet tampon). Elles reprennent ensuite leur forme initiale et convertissent l'énergie emmagasinée en énergie cinétique permettant au sang de s'écouler dans les artères durant la diastole. Le flux pulsatile est transformé en flux sanguin continu. Les artères élastiques ou de conductance sont les plus grosses artères de l'organisme. Leur paroi est relativement mince par rapport à leur diamètre total. L'aorte, le tronc brachio-céphalique, les carotides communes, les artères sous-clavières, vertébrales, pulmonaires et iliaques sont des artères élastiques [1].

### **1.3.2. Artères musculaires**

Les artères musculaires contiennent beaucoup plus de CMLVs que de fibres élastiques leur permettant de régler la vitesse de l'écoulement sanguin via leur capacité à se dilater ou se contracter. De par la présence d'une forte proportion de CMLVs au niveau de la média, les artères musculaires ont une paroi relativement épaisse. L'artère brachiale, radiale et fémorales sont des exemple d'artères musculaires [1].

### **1.3.3. Artères de résistance et artérioles**

Les artères de résistance regroupent les petites artères (100 et 300  $\mu\text{m}$ ) et les artérioles (10-50  $\mu\text{m}$ ). Elles sont principalement composées de CMLVs. Tout comme les artères musculaires, leur structure permet de produire une vasodilatation ou une vasoconstriction contrôlant ainsi le débit sanguin et la résistance périphérique. Les artérioles jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'écoulement sanguin des artères jusqu'aux capillaires. Elles agissent comme valves contrôlant l'entrée de sang dans le lit capillaire en aval. Selon les besoins métaboliques, les artérioles ont la capacité d'empêcher l'irrigation d'un territoire ou de causer une vasodilatation importante [1, 2].

### **1.3.4. Capillaires**

Les capillaires sont des vaisseaux microscopiques qui relient les artérioles aux veinules. De par leur très grand nombre, les capillaires représentent le segment vasculaire ayant la plus grande surface de contact permettant des échanges nutritionnels et gazeux efficaces. Ces échanges sont possibles grâce à leur structure très perméable. Les capillaires ne sont formés que d'une simple couche de cellules endothéliales qui permet le passage de petites molécules. L'endothélium permet l'échange de fluides, de nutriments, d'électrolytes, de gaz et d'hormones entre le sang et le liquide interstitiel [1].

Cette description des différentes artères montre bien que la variation de composition correspond à des rôles spécifiques des vaisseaux. Malgré des fonctions bien différentes, les vaisseaux sanguins obéissent tous aux mêmes lois.

## **2. Physiologie du système cardiovasculaire**

### **2.1. La pression artérielle**

La pression artérielle (P) est la force exercée par le sang sur les parois des vaisseaux. Elle est mesurée de manière historique en mmHg. Produite par la contraction des ventricules, elle atteint son maximum dans l'aorte et les grosses artères et son minimum dans l'oreillette droite. Une pression dite normale chez un jeune adulte au repos est de 120 mmHg durant la systole (pression systolique PS) et 80 mmHg durant la diastole (pression diastolique PD). Alors que la pression artérielle est pulsatile, la pression artérielle moyenne (PAM) est considérée comme la principale force motrice responsable de l'écoulement du sang. L'équation suivante permet de la calculer :  $PAM = PD + 1/3 (PS - PD)$ . Pour une pression artérielle de 120/80, la PAM est de 93 mmHg [40].

### 2.1.1. Régulation de la pression artérielle

La pression artérielle est un paramètre hautement régulé afin qu'elle assure un écoulement sanguin suffisant dans tout l'organisme. Ainsi, la pression artérielle est influencée par le débit cardiaque (Q) et la résistance périphérique (R). Ces différents paramètres sont liés entre eux par la relation suivante :  $\Delta P = Q \times R$  où R représente la résistance périphérique totale (somme de toutes les résistances du système vasculaire) et la différence de pression ( $\Delta P$ ) représente la pression aortique (pression maximale) moins la pression à l'entrée de l'oreillette droite (pression minimale). Puisque la pression dans l'oreillette droite est nulle ou presque,  $\Delta P$  peut donc être considérée comme la pression artérielle moyenne. Le Q est, quant à lui, influencé par le volume d'éjection (VE) et la fréquence cardiaque (FC) selon l'équation suivante :  $Q = VE \times FC$ . Les variations de ces paramètres provoqueront donc des changements de pression artérielle [1, 40].

L'organisme est pourvu de divers mécanismes de régulation de la pression artérielle. En effet, plusieurs mécanismes de rétro-inhibition interreliés modulent la pression artérielle en jouant constamment sur la fréquence cardiaque, le volume d'éjection, la résistance périphérique et le volume sanguin. Certains mécanismes répondent très rapidement aux changements soudains de pression tandis que d'autres agissent plus lentement et assurent la régulation à long terme. Ainsi, le système nerveux sympathique avec ses barorécepteurs et certaines hormones joue un rôle important dans la régulation à court terme de la pression. Les changements dans la réabsorption/excrétion de l'eau et du sel au niveau des reins sont principalement impliqués dans les changements à long terme de la pression artérielle. La figure 4 résume les principaux mécanismes de régulation de la pression artérielle [1, 40].



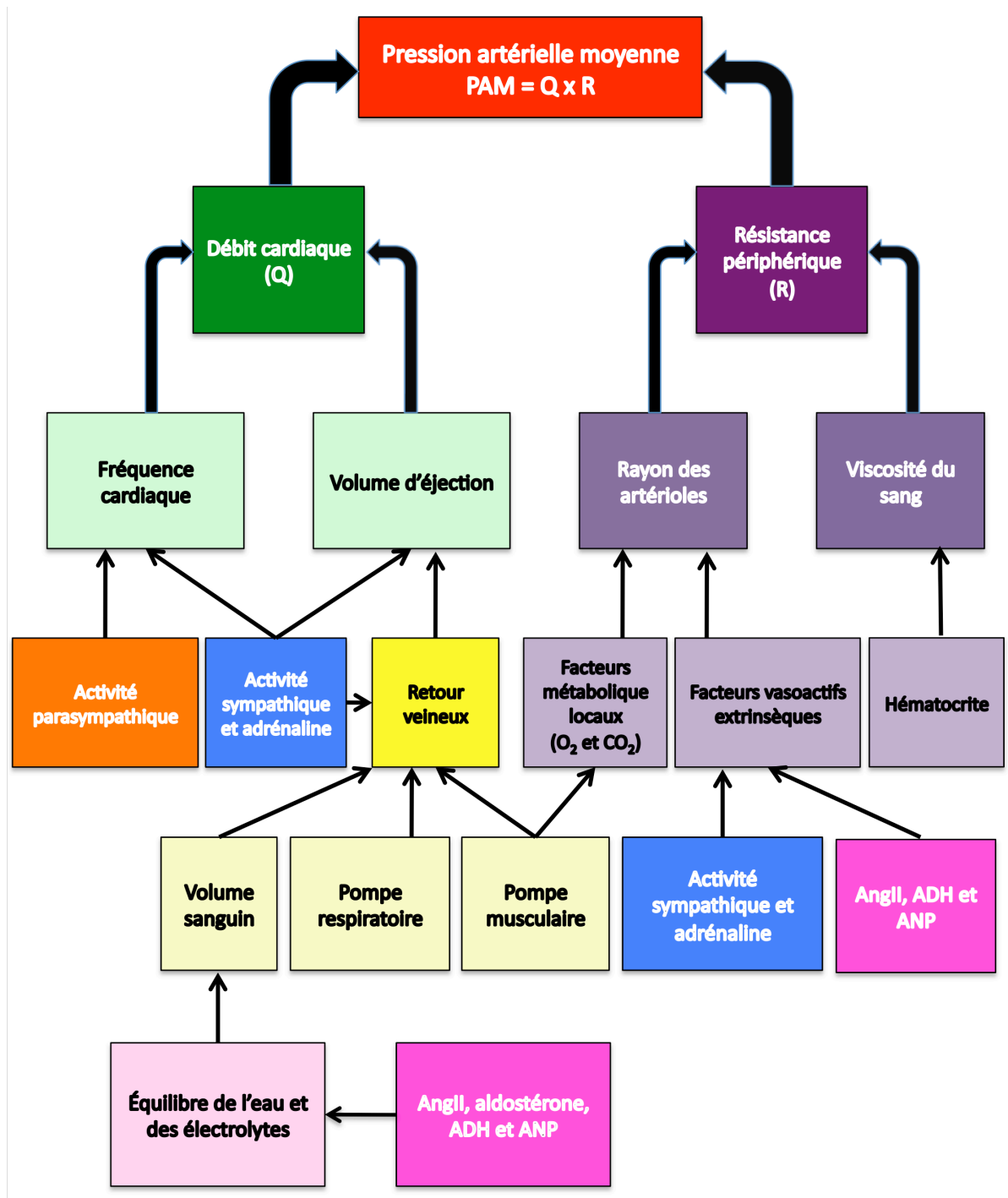


Figure 4: Synthèse des facteurs déterminant la pression artérielle.

Adapté de [40].

### 2.1.1.1. Régulation à court terme

Le contrôle à court terme de la pression artérielle dépend de phénomènes réflexes qui détectent ses variations et y répondent en quelques secondes. Cette rapidité de réponse fait intervenir le système nerveux autonome.

#### *a. Régulation nerveuse de la pression artérielle*

Le centre cardiovasculaire médullaire, situé dans le bulbe rachidien, reçoit des informations provenant des centres cérébraux supérieurs (cortex cérébral, système limbique et hypothalamus) et des récepteurs sensoriels tels que les barorécepteurs et les chimiorécepteurs. Une fois les informations transmises, l'influx nerveux sort du centre cardiovasculaire par différentes fibres sympathiques (excitatrices) et parasympathiques (inhibitrices) du système nerveux autonome et libèrent des neurotransmetteurs. En effet, les fibres sympathiques libèrent de la noradrénaline (NA) et les fibres parasympathiques sécrètent de l'acétylcholine (ACh). Les influx sympathiques empruntent les nerfs cardiaques tandis que les influx parasympathiques utilisent les nerfs vagues. Ces nerfs se rendent tous les deux au cœur, mais ont des effets opposés. En effet, la stimulation sympathique via les nerfs cardiaques a pour effet d'augmenter la fréquence (chronotropie) et la force (inotropie) de contraction du cœur. La stimulation parasympathique par les nerfs vagues diminue la fréquence cardiaque, mais pas la contractilité. De plus, le centre cardiovasculaire envoie continuellement des influx sympathiques aux CMLVs de la paroi vasculaire par l'intermédiaire des nerfs vasomoteurs et entraîne la contraction des vaisseaux [1]. Ainsi, une stimulation sympathique au niveau des veines provoque une vasoconstriction qui a pour effet d'augmenter le retour veineux, donc plus de sang qui arrive dans l'oreillette droite favorisant le remplissage ventriculaire. Un volume de remplissage plus important a pour effet d'augmenter la contractilité du cœur, donc son débit. Une stimulation sympathique au niveau des artères de résistance ou des artérioles provoque une vasoconstriction via la liaison de la NA sur les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques

de la paroi. Cette vasoconstriction contribue à faire augmenter la résistance périphérique. Suite à l'activation des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques par la NA au niveau du cœur, celui-ci se met à battre plus vite (fréquence cardiaque) et plus fortement (contractilité) provoquant une augmentation du débit cardiaque. Globalement, une activation du système nerveux sympathique fait monter la pression artérielle en augmentant la résistance périphérique ou le débit cardiaque. Une stimulation nerveuse parasympathique aura l'effet inverse, mais seulement qu'en modulant le débit cardiaque (récepteurs muscarinique  $M_2$ ). Ses stimulations sont le résultats de l'envoi de signaux en provenance du cœur et des vaisseaux [2, 41].

#### i. Les barorécepteurs

Le système nerveux régule la pression artérielle par des boucles de rétro-inhibition impliquant notamment les barorécepteurs. Ces récepteurs, sensibles à l'étirement de la paroi vasculaire, sont principalement situés dans les sinus carotidiens et dans la crosse aortique. Ainsi, le réflexe sino-carotidien contribue au maintien de la pression artérielle dans l'encéphale tandis que le réflexe aortique régit la pression artérielle systémique. Les deux types de barorécepteurs ne sont pas stimulés par les mêmes niveaux de pression. En effet, les barorécepteurs situés au niveau des carotides sont stimulés dans un intervalle variant entre 60 à 180 mmHg tandis que les barorécepteurs de la crosse aortique sont stimulés à plus hautes pressions soient entre 90 et 210 mmHg [42]. Quand la pression artérielle baisse, la paroi vasculaire est moins étirée et donc les barorécepteurs émettent moins d'influx nerveux vers le centre cardiovasculaire médullaire. Celui-ci réagit en diminuant les stimulations parasympathiques du cœur et augmente les influx sympathiques en direction du cœur et des vaisseaux. Il y a également des fibres nerveuses sympathiques qui relient le centre cardiovasculaire (centre vasomoteur) à la glande produisant l'adrénaline, la médullosurrénale. Tout ceci a pour effet d'augmenter la fréquence et la force de contraction du cœur, favoriser la vasoconstriction des artérioles et stimuler la relâche d'adrénaline dans la circulation. Conséquemment, le débit cardiaque et la

résistance périphérique augmentent. À l'inverse, quand la pression artérielle augmente, les barorécepteurs sont plus étirés et envoient plus d'influx nerveux vers le centre cardiovasculaire médullaire (centre cardioinhibiteur). Pour palier à cette hausse de pression, la composante parasympathique prend le dessus provoquant une diminution de la fréquence cardiaque et une vasodilatation. Ces changements ont pour effet de diminuer le débit cardiaque et la résistance périphérique [1]. Les barorécepteurs ne participent pas à la régulation à long terme de la pression artérielle. En effet, si la pression demeure élevée et ce pour une longue période de temps (quelques jours), les barorécepteurs s'adaptent à cette nouvelle pression, c'est ce qu'on appelle en anglais le « resetting » des barorécepteurs. Ils ne régulent que les changements aigus de pression [42].

#### ii. Les chimiorécepteurs

Les chimiorécepteurs surveillent la composition chimique du sang. Ces récepteurs, situés dans les mêmes régions que les barorécepteurs, détectent la variation des niveaux d'O<sub>2</sub>, de CO<sub>2</sub> et de H<sup>+</sup>. Ainsi, lors d'une baisse des concentrations d'O<sub>2</sub> (hypoxie), une augmentation des concentrations de CO<sub>2</sub> ou une augmentation de l'acidité du sang (acidose), les chimiorécepteurs envoient des influx au centre cardiovasculaire médullaire qui réagit en envoyant des stimulations sympathiques provoquant une constriction des artérioles et conséquemment une augmentation de la pression artérielle [1].

Le contrôle à court terme de la pression fait principalement intervenir le système nerveux autonome, mais il y a également quelques hormones qui sont rapidement libérées en réponse aux changements de pression artérielle.

#### *b. Régulation hormonale de la pression artérielle*

Les hormones impliquées dans la régulation de la pression artérielle jouent surtout sur le volume sanguin en modifiant la réabsorption et l'excrétion d'eau, processus pouvant prendre plusieurs heures. Cependant, l'adrénaline, la noradrénaline, l'angiotensine II

(AngII), la vasopressine (AVP) ou l'hormone antidiurétique (ADH) ainsi que le peptide natriurétique auriculaire (ANP) peuvent influencer rapidement la pression artérielle. Leur influence est toutefois beaucoup plus lente que la régulation par l'entremise du système nerveux.

#### i. Adrénaline et la noradrénaline

L'adrénaline et la noradrénaline sont synthétisées par la médullosurrénale. La noradrénaline est à la fois un neurotransmetteur et une hormone. Dans le cas d'une stimulation des fibres sympathiques au niveau des glandes surrénales, il y a une libération des deux catécholamines, mais c'est principalement l'adrénaline qui est sécrétée. Ainsi, cette dernière se lie aux récepteurs adrénergiques cardiaques pour augmenter la fréquence et la contractilité du cœur, faisant augmenter le débit cardiaque. Contrairement à la noradrénaline, qui a des effets majoritairement vasoconstricteurs, l'adrénaline peut entraîner des réponses différentes au niveau des vaisseaux selon qu'elle se lie aux récepteurs  $\alpha$ - ou  $\beta$ -adrénergiques. Elle entraîne une vasoconstriction des artérioles de l'abdomen et de la peau via sa liaison aux récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques tandis qu'elle provoque une vasodilatation des artérioles des muscles squelettiques et cardiaques via les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. La réponse vasodilatatrice se nomme effet « Fight-or-Flight ». Sous l'effet de l'adrénaline, l'organisme se prépare à se sauver, pour se faire, les vaisseaux des muscles squelettiques nécessitent plus de sang, d'où la dilatation [1, 2].

#### ii. Stimulation de la relâche de rénine et production d'AngII

Une chute de pression artérielle provoque une diminution du débit sanguin qui se répercute sur le débit sanguin rénal. En réaction à cette baisse de débit rénal, l'appareil juxtaglomérulaire des néphrons sécrète la rénine. Cette enzyme est libérée dans la circulation où elle transforme l'angiotensinogène, peptide inactif produit dans le foie, en angiotensine I. Ce dernier, sous l'action de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

(ACE), est transformé en AngII, un puissant vasoconstricteur. L'AngII contractent les artérioles en se fixant à son récepteur  $AT_1$  au niveau du muscle lisse augmentant la résistance périphérique et rétablissant ainsi la pression artérielle. L'AngII a également un rôle à jouer dans le contrôle à long terme de la pression artérielle (section 2.1.1.2) [1].

### iii. Vasopressine ou hormone antidiurétique

L'AVP est une hormone sécrétée par la neurohypophyse. Elle est surtout connue pour son rôle dans la régulation du volume urinaire conséquemment à sa contribution au maintien de l'osmolalité sanguine. Elle possède également des propriétés vasoconstrictrices. Dans les cas de chute importante de pression comme lors d'une hémorragie, l'AVP est sécrétée et provoque une vasoconstriction des artérioles contribuant à rétablir la pression artérielle. Cet effet n'est toutefois que marginal. [1, 2].

### iv. Peptide natriurétique auriculaire

L'ANP est sécrété par les myocytes des oreillettes du cœur en réponse à l'étirement de la paroi de celles-ci. Cet étirement est dû à l'augmentation du volume sanguin, donc à un retour veineux plus important et conséquemment un débit cardiaque augmenté. Contrairement aux autres molécules sécrétées pour réguler la pression artérielle, l'ANP est un vasodilatateur. Ainsi, il diminue la pression artérielle en dilatant les artérioles, mais aussi en favorisant l'excrétion d'eau et de sodium dans l'urine qui fait diminuer le volume sanguin [1].

## **2.1.1.2. Régulation à long terme**

Le principal contrôle de la pression artérielle à long terme passe par la régulation du volume sanguin qui contribue au maintien du retour veineux et du débit cardiaque. Contrairement à la régulation à court terme, la régulation à long terme est un mécanisme

indirect faisant intervenir les reins et plusieurs hormones telles que l'AngII, l'aldostérone, l'ADH et l'ANP.

Les variations de pression artérielle peuvent faire varier le débit sanguin rénal et le taux de filtration glomérulaire. En réaction à ces variations de pression, les reins modifient la réabsorption et l'excrétion d'eau et de sodium. Ainsi, une augmentation de pression artérielle mène à une augmentation de l'excrétion d'eau et de sel dans les urines afin de diminuer le volume sanguin et conséquemment la pression artérielle. Une pression trop basse entraîne l'effet inverse. Ces modifications sont des processus lents qui s'échelonnent sur plusieurs jours [43].

#### *a. Régulation hormonale*

##### *i. Le système rénine-angiotensine-aldostérone*

Lorsque la pression artérielle et le volume sanguin diminuent, les parois des artéioles glomérulaires afférentes sont moins étirées et les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire sécrètent de la rénine dans le sang. S'ensuit la cascade d'évènements qui mène à la transformation de l'angiotensinogène en AngII. Au niveau du rein, l'AngII a plusieurs effets :

- Elle ralentit le débit de filtration glomérulaire en causant une vasoconstriction des artères afférentes.
- Elle augmente la réabsorption de sodium, de chlore et d'eau dans le tubule contourné proximal.
- Elle stimule la libération d'ADH.
- Elle stimule la sécrétion d'aldostérone par le cortex surrénalien. Cette hormone augmente la réabsorption de sodium au niveau du tubule collecteur. De plus, par un effet d'osmose l'eau suit les ions. Cette diminution de l'excrétion de l'eau a pour effet d'augmenter le volume sanguin.

## ii. Hormone antidiurétique

L'ADH régule la réabsorption facultative de l'eau au niveau du tubule collecteur en augmentant la perméabilité des cellules principales pour l'eau. Cette augmentation de perméabilité est due à l'insertion de l'aquaporine 2 dans la membrane apicale. En présence d'ADH, l'eau passe plus facilement du tubule collecteur vers la circulation sanguine pour augmenter le volume sanguin.

## iii. Peptide natriurétique auriculaire

Une forte augmentation du volume sanguin provoque l'étirement de la paroi des oreillettes du cœur et entraîne la libération de l'ANP. Ce peptide peut inhiber la réabsorption de sodium et d'eau au niveau du tubule contourné proximal et du tubule collecteur. Il peut également inhiber la relâche d'aldostérone et d'ADH. Tous ces effets provoquent l'excrétion d'une plus grande quantité de sodium et d'eau dans l'urine, diminuant ainsi le volume sanguin [1].

### **2.1.2. Débit cardiaque (Q)**

Toutes les cellules de l'organisme ont besoin d'une certaine quantité de sang oxygéné afin de pouvoir vivre et réaliser leurs fonctions. Tout dépendant de leurs activités métaboliques, les cellules auront besoins de plus ou moins d'oxygène ce qui a des répercussions sur le cœur. Celui-ci devra modifier sa charge de travail afin de répondre adéquatement aux besoins des cellules. Cette charge de travail se nomme débit cardiaque. Il est un indicateur de la capacité du cœur à pomper le sang et il se définit comme étant le volume de sang éjecté par chaque ventricule en une minute. Comme il a été mentionné précédemment, le débit cardiaque dépend du volume d'éjection et de la fréquence cardiaque. Ces paramètres sont liés entre eux par l'équation suivante :  $Q = VE \times FC$  [1, 43].



Pour bien comprendre le concept de débit cardiaque, il est important de bien décrire les paramètres qui le déterminent.

### **2.1.2.1. Régulation du volume d'éjection**

Le volume d'éjection est le volume de sang éjecté des ventricules à chaque contraction. Un cœur sain expulse tout le sang qui a pénétré dans ses cavités durant la diastole. Plus la quantité de sang qui arrive dans les cavités cardiaques durant la diastole est grande et plus la quantité de sang éjecté sera importante. Trois facteurs régulent le volume d'éjection et assurent l'expulsion d'un volume de sang des ventricules : la précharge, la contractilité et la postcharge.

#### *a. Précharge*

La précharge correspond au niveau d'étirement du muscle relâché immédiatement avant qu'il ne se contracte à nouveau. Ce niveau d'étirement dépend essentiellement du volume de sang qui entre dans les ventricules à la fin de la diastole. Ce volume dépend à son tour du retour veineux. Ce sont les veinules et les veines qui permettent le retour du sang de la périphérie vers le cœur. C'est pour cette raison qu'elles portent également le nom de vaisseaux de conduction. Le retour veineux est facilité par la présence de valves unidirectionnelles et par la contraction des muscles squelettiques (pompe musculaire). Si le retour veineux est augmenté, il provoque un étirement des fibres musculaires du cœur qui aura pour effet d'accroître la force de contractilité cardiaque et par conséquent le débit cardiaque. Les veines servent également de réservoir. Ces vaisseaux de capacitance stockent le sang qui peut être mobilisé en cas de besoin. De par leur facilité à se dilater à cause de leur parois fines, les vaisseaux du système veineux contiennent environ 65% du volume de sang total. En plus du retour veineux, la précharge dépend de la durée de la diastole. Si la fréquence cardiaque est augmentée, la durée de la diastole est diminuée, le temps de remplissage est plus court et la précharge est plus faible [1, 43].

### *b. Contractilité*

La contractilité est la force de contraction du myocarde. Plus le cœur se contracte fortement et plus le volume de sang éjecté des ventricules sera important. Il existe des substances qui peuvent modifier la force de contraction du cœur. En effet, les agents inotropes positifs augmentent la contractilité cardiaque et les agents inotropes négatifs la diminuent. Les substances inotropes positives favorisent souvent l'influx de calcium durant les potentiels d'action cardiaques ce qui fait augmenter la force de contraction des fibres musculaires du cœur. La stimulation nerveuse sympathique et la relâche d'adrénaline provoquent également une augmentation de la contractilité du cœur. Par contre, l'inhibition de la composante nerveuse sympathique, l'anoxie (absence d'O<sub>2</sub>), l'acidose et l'augmentation des concentrations de potassium ont des effets inotropes négatifs [1].

### *c. Postcharge*

La postcharge est la force que le muscle cardiaque doit fournir au cours de sa contraction afin de s'opposer à la pression dans les artères. Elle dépend donc du niveau de pression artérielle. Ainsi, l'hypertension et l'athérosclérose, causant le rétrécissement des artères, augmentent la postcharge. Toutefois, dans un cœur normal, l'augmentation de pression artérielle systémique (postcharge) modifie peu le débit cardiaque, c'est plutôt l'importance du retour veineux (précharge) qui le détermine [1, 43].

#### **2.1.2.2. Régulation de la fréquence cardiaque**

La fréquence cardiaque doit constamment s'adapter pour permettre une régulation adéquate du débit cardiaque. Tout comme pour la régulation de la pression artérielle, la fréquence cardiaque est régulée par le système nerveux autonome et par la sécrétion d'hormones. Comme elle est liée à production de potentiels d'action, la fréquence

cardiaque est également régulée par différents ions sodiques ( $\text{Na}^+$ ), potassiques ( $\text{K}^+$ ) et calciques ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

*a. Régulation par le système nerveux autonome*

La régulation de la fréquence cardiaque fait intervenir le centre cardiovasculaire médullaire qui reçoit des influx provenant de l'encéphale et des différents récepteurs sensoriels, principalement les barorécepteurs. Il existe également des récepteurs au niveau du cœur, notamment les mécanorécepteurs veino-auriculaires myélinisés qui détectent les changements d'étirement de la paroi des oreillettes [3].

Les fibres nerveuses sympathiques passent par les nerfs cardiaques et innervent le nœud sinusal, le nœud auriculo-ventriculaire et la majeure partie du myocarde. Ces nerfs sécrètent de la NA qui se lie aux récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques des cardiomyocytes. Dans le nœud sinusal et auriculo-ventriculaire, la NA accélère la dépolarisation spontanée provoquant une décharge plus rapide des influx nerveux causant une augmentation de la fréquence cardiaque. Au niveau des fibres contractiles des oreillettes et des ventricules, la NA augmente l'entrée de calcium par les canaux calciques de type L provoquant une augmentation de la contractilité du cœur et conséquemment une augmentation du volume d'éjection. Pour une augmentation de fréquence cardiaque modérée, le volume d'éjection n'est pas affecté, car la diminution du temps de remplissage ventriculaire est compensé par l'accroissement de la force de contraction du cœur. Ce n'est toutefois pas le cas lorsque la stimulation sympathique est maximale et que la fréquence cardiaque frôle les 200 battements par minute (bpm) [43].

Les stimulations parasympathiques empruntent les nerfs vagues. Ils sécrètent de l'Ach surtout au niveau du nœud sinusal, du nœud auriculo-ventriculaire et du myocarde auriculaire. Contrairement aux fibres sympathiques, il y a peu de fibres parasympathiques qui innervent les ventricules. Le système parasympathique n'a donc aucun effet sur la contractilité du cœur. Il influence le débit cardiaque en jouant seulement sur la diminution

que la fréquence cardiaque. C'est par une hyperpolarisation et un ralentissement de la dépolarisation spontanée des cellules cardionectrices que les fibres parasympathiques régulent à la baisse la fréquence cardiaque [1].

### *b. Régulation chimique*

#### *i. Hormones*

En plus d'innover le myocarde, les fibres sympathiques sont également présentes au niveau des glandes surrénales et stimulent la relâche de catécholamines. L'adrénaline et un peu de noradrénaline augmentent l'efficacité de la pompe cardiaque. En effet, tout comme les fibres nerveuses sympathiques, elles stimulent les myocytes cardiaques à se contracter plus rapidement et plus fortement.

#### *ii. Ions*

Le processus de potentiel d'action est basé sur les différences de concentrations ioniques entre l'intérieur et l'extérieur des cellules. Un déséquilibre des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  nuirait donc à l'efficacité de la pompe cardiaque. Ainsi, les concentrations sanguines élevées de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{K}^+$  diminuent la fréquence cardiaque et la contractilité. En effet, l'excès de sodium bloque l'entrée du calcium dans les cellules durant les potentiels d'actions cardiaques réduisant la force de contraction du cœur, tandis que l'excès de potassium, bloque carrément la production de potentiels d'action. Comme le calcium est responsable de l'augmentation du nombre d'interactions actine/myosine, fibres responsables de la contraction musculaire, une augmentation de sa concentration favorise la contractilité [1, 44]

### **2.1.2.3. Contrôle du débit sanguin régional**

Dans la section précédente, il a été question de la régulation du débit cardiaque qui correspond à la somme de tous les débits sanguins de l'organisme tandis que le débit

sanguin régional correspond au débit dans une région donnée du corps. Il ne faut donc pas confondre les deux types de débits, l'un systémique, l'autre local. La circulation sanguine permet d'acheminer à un tissu, une région ou un organe la quantité de sang qui lui est nécessaire à son bon fonctionnement. Cette quantité de sang se modifie selon les besoins métaboliques. Le débit sanguin régional (Q) dépend donc de la pression de perfusion ( $\Delta P$ ) et des résistances vasculaires (R). Ces trois paramètres sont liés entre eux selon l'équation suivante :  $Q = \Delta P / R$ . La pression de perfusion correspond à la différence entre la pression artérielle et veineuse. Cette différence est nécessaire pour que les tissus puissent être perfusés adéquatement. Les résistances vasculaires locales correspondent, quant à elles, aux dilatations ou aux constriction locales des artères de résistance et des artérioles dans une région, un tissu ou un organe donné.

#### *a. Contrôle local*

Les tissus ont des besoins métaboliques qui changent constamment, il est donc primordial que le débit sanguin puisse s'adapter à ces demandes variables. Ces adaptations ne surviennent que dans le territoire vasculaire nécessitant des besoins particuliers en mobilisant des facteurs locaux. Le contrôle local du débit sanguin aide à limiter les répercussions systémiques qui autrement se solderaient par des modifications de la pression artérielle.

##### *i. Autorégulation*

Normalement, dans la relation pression-débit, la hausse de pression cause une dilatation provoquant une diminution de la résistance et conséquemment un débit plus important. Toutefois, dans certains lits vasculaires, il existe des mécanismes différents. En effet, malgré des changements importants de pression artérielle, le débit dans ces régions demeure stable. Ce phénomène porte le nom d'autorégulation. Elle repose sur des modifications locales de la résistance vasculaire qui permettent de compenser les variations de pression [2]. L'état contractile des CMLVs dans l'autorégulation est régulé de manière

autonome. Il est complètement indépendant des mécanismes nerveux ou hormonaux. Les mécanismes myogéniques et métaboliques jouent donc un rôle important dans l'ajustement du tonus vasculaire impliqué dans l'autorégulation. Toutefois, l'autorégulation n'est possible que dans un intervalle de pression donné (physiologique). Quand les pressions deviennent trop basses ou trop hautes, l'autorégulation disparaît et le débit devient alors dépendant de la pression artérielle [43]. Dans des conditions physiologiques, l'autorégulation est un processus très important pour les organes, en particulier pour ceux qui sont sensibles à ischémie comme le cœur, les reins et le cerveau [2].

### ii. Régulation myogénique

De par leur capacité à se dilater ou à se contracter activement sous l'effet des changements de pression, les artéioles participent à l'autorégulation du débit sanguin. En effet, suite à une augmentation de pression, les cellules musculaires lisses s'étirent de façon réflexe provoquant une contraction active des cellules, une augmentation de la résistance et conséquemment une diminution de débit sanguin. Plus précisément, cet étirement des membranes des CMLVs active des canaux sensibles à l'étirement provoquant une dépolarisation membranaire qui stimule à son tour l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules provoque une vasoconstriction. À l'inverse, une diminution de pression provoque une vasodilatation et une diminution de la résistance [2].

### iii. Régulation métabolique

Le degré de perfusion d'un tissu dépend de ses besoins métaboliques. Plus un tissu est actif, plus son débit est important. Ce sont les besoins en oxygène qui dictent la perfusion d'un tissu. En effet, un manque d'oxygène dans un tissu ou un organe mène à une dilatation des artéioles et conséquemment une augmentation du débit sanguin dans cette région. Ce phénomène explique l'accroissement du débit sanguin suite à un effort physique (hyperhémie active) ou au repos, suite à une occlusion artérielle temporaire

(hyperhémie réactive). En réaction à un manque d'oxygène (diminution de la perfusion), il y aurait accumulation de substances vasodilatatrices comme du CO<sub>2</sub>, des protons (H<sup>+</sup>), du potassium, de l'acide lactique, des phosphates et de l'adénosine. Il se pourrait également que la baisse d'oxygène affecte directement le tonus contractile du muscle lisse des artérioles en provoquant une vasodilatation. Il existe d'autres substances vasoactives qui ne dépendent pas des besoins métaboliques et qui peuvent être sécrétées localement suite à différents stimuli. En effet, lors d'une inflammation, la bradykinine et l'histamine augmentent le débit sanguin au site atteint tandis que le NO augmente le débit sanguin suite à l'accroissement des forces de cisaillement [43]. Ces dernières correspondent à des mouvements particuliers des molécules du sang lorsqu'elles voyagent dans la circulation sanguine. En effet, dans les vaisseaux, le flux sanguin est laminaire. Les molécules du sang voyagent en formant de fines lames. La vitesse de ces lames est plus rapide au centre du vaisseau et diminue en allant vers les parois. Lorsque le sang circule dans les vaisseaux, il se produit un mouvement de cisaillement qui est en fait un glissement entre deux lames (une lame en avance une autre). De plus, il existe une friction entre les molécules sanguines. Cette friction entraîne les différentes lames à se tirer les unes les autres, provoquant ainsi les forces de cisaillement. Au niveau de la paroi, les mouvements de cisaillement stimulent les cellules endothéliales à relâcher du NO [3]. Les forces de cisaillement stimulent la libération de NO afin de contrecarrer la réponse d'autorégulation myogénique, permettant ainsi de limiter la réponse vasoconstrictrice.

#### *b. Contrôle nerveux*

Tout comme le débit cardiaque, le contrôle nerveux du débit sanguin dépend du système nerveux autonome. Ainsi, le système sympathique libère de la NA au niveau des cellules musculaires lisses des vaisseaux et régule la résistance périphérique [2]. Les nerfs sympathiques sont particulièrement denses au niveau des vaisseaux du système digestif, de la peau et des muscles squelettiques, mais ils sont également présents dans la plupart des organes. Si une chute de pression se produit, le réflexe sympathique diminue le

débit sanguin dans la région concernée tout en épargnant le cœur et le système nerveux central. Ces organes vitaux doivent toujours être bien perfusés. Globalement, ce mécanisme permet l'adaptation de l'organisme à des hausses de pression par une vasoconstriction dans les territoires qui peuvent temporairement s'en passer et ainsi préserver une perfusion adéquate du cœur et du cerveau. Durant l'exercice physique, le système nerveux sympathique est augmenté entraînant une dilatation des vaisseaux des muscles squelettiques par l'intermédiaire de la relâche d'adrénaline par les glandes surrénales et d'Ach par les nerfs sympathiques. Cette vasodilatation est due à la prédominance des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques qui ont un effet vasodilatateur lorsqu'ils sont activés [45]. Il est à noter que normalement, l'Ach est sécrétée par les nerfs parasympathiques, mais dans cette situation, elle est libérée au niveau des muscles squelettiques pour dilater les vaisseaux via les récepteurs muscarinique  $M_2$ . De plus, sous l'effet de la NA et de l'adrénaline, il y a une augmentation de la fréquence et de la force de contraction cardiaque qui conséquemment accroissent le débit sanguin. Cette activation sympathique entraîne également une constriction des vaisseaux situés dans les zones non sollicitées (système digestif, rein) par la sécrétion de NA, où il y a une prédominance des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques. Donc, dans cette situation, c'est l'effet Fight-or-Flight qui est activé (section Adrénaline et noradrénaline p. 20). Tel que mentionné dans la section régulation métabolique (p 29-30), le débit sanguin est également contrôlé par les concentrations sanguines de nutriments, en particulier l'oxygène. Durant un exercice physique, il y a une diminution des taux d'O<sub>2</sub>, une augmentation de CO<sub>2</sub> ainsi qu'une diminution du pH. Ces modulations provoquent une augmentation de la dilatation des vaisseaux des muscles squelettiques et conséquemment un accroissement du débit sanguin [2].

Les nerfs parasympathiques sont beaucoup moins présents au niveau des vaisseaux sanguins. Ils n'ont donc qu'un rôle marginal dans la régulation de la résistance périphérique. Toutefois, ils sont importants dans l'augmentation du débit sanguin local dans les glandes exocrines, dans certains territoires cutanés (rougissement) et dans les tissus



érectiles du pénis. Ces nerfs libèrent habituellement de l'acétylcholine, mais d'autres neurotransmetteurs comme le VIP (*vasoactive intestinal polypeptide*) peuvent également intervenir dans la vasodilatation [43].

### *c. Contrôle hormonal*

Les hormones impliquées dans le contrôle de la pression artérielle ont également un rôle à jouer dans la régulation de la résistance périphérique et donc du débit sanguin local. Ainsi, les catécholamines (adrénaline surtout), l'AngII, l'AVP ont des propriétés vasoconstrictrices dans la plupart des tissus. Il faut toutefois noter que l'adrénaline peut soit contracter ou dilater les vaisseaux. Tout dépend du type de récepteurs auquel elle se lie. En effet, sa liaison aux récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques des artères de résistance provoque une contraction tandis que sa liaison aux récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques de ces mêmes artères entraîne une relaxation [43].

### **2.1.3. Résistance périphérique (R)**

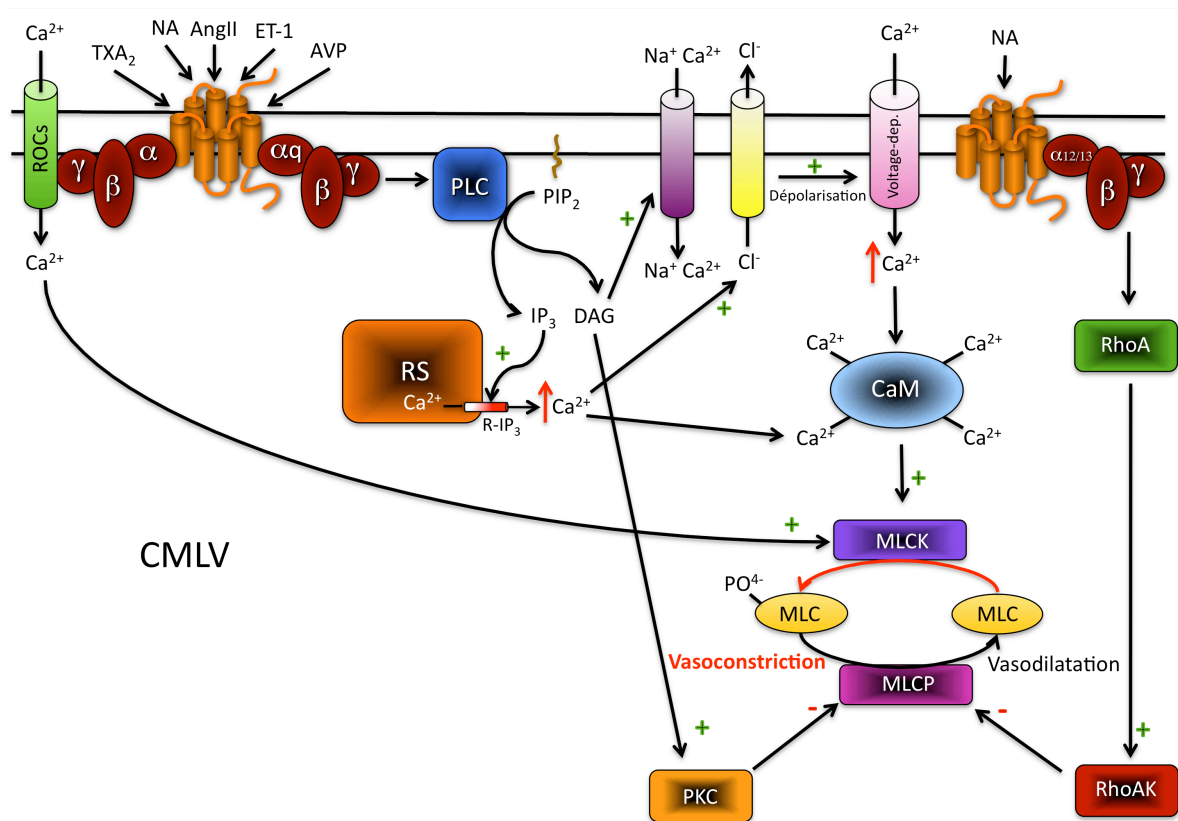
À l'état normal, les artères de résistance et les artérioles sont légèrement contractées et ce de façon continue. C'est le tonus vasculaire de base. Le système nerveux sympathique stimule en permanence ces vaisseaux, établissant la résistance périphérique de repos [1]. La résistance est la force qui s'oppose au débit sanguin. Elle résulte de la friction du sang contre les parois des vaisseaux sanguins. Comme mentionné dans les sections précédentes, les artères de résistance et les artérioles ont la fonction de contrôler la perfusion sanguine des organes afin d'assurer un apport sanguin adéquat répondant à leur besoins métaboliques. De par leur faible rayon, les artères de résistances et les artérioles opposent une forte résistance à l'écoulement sanguin. En effet, selon la loi de Poiseuille,  $R = 8\eta L/\pi r^4$ , où  $\eta$  est la viscosité du sang, L la longueur du vaisseau et r le rayon du vaisseau, une augmentation de la résistance périphérique dépend essentiellement d'une diminution du diamètre interne (rayon) des vaisseaux. Comme r est à la puissance 4, un petit changement

de rayon fera varier énormément la résistance [42, 46]. Dans une moindre mesure, la viscosité du sang et la longueur des vaisseaux peuvent influencer la résistance. La viscosité du sang dépend principalement de son hématicrite (pourcentage de globules rouges par rapport au volume sanguin total), donc toutes situations qui modifient celle-ci, par exemple la déshydratation ou une hémorragie, changera la résistance périphérique et conséquemment la pression artérielle. De plus, selon l'équation élaborée par Poiseuille, plus un vaisseau est long et plus la résistance au débit sera grande. Par exemple, les personnes souffrant d'obésité ont parfois une pression élevée causée par l'accroissement du nombre de vaisseaux dans le tissu adipeux. En effet, pour chaque demi kilogramme d'embonpoint, il y a 300 km de vaisseaux sanguins supplémentaires. Comme l'hématocrite, donc la viscosité, est un paramètre qui change peu et que la longueur des vaisseaux sanguins est relativement stable pour une personne donnée, les fluctuations ponctuelles de la pression artérielle sont majoritairement causées par des changements de rayon des vaisseaux. Ces modifications de rayon impliquent soit une contraction ou une relaxation des CMLVs [1]. Il serait donc pertinent de décrire ces mécanismes.

### **2.1.3.1. Mécanisme de contraction des cellules musculaires lisses**

La force contractile des CMLVs est régulée principalement par l'ion calcique ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Pour que les cellules du muscle lisse se contractent, il faut une mobilisation massive de calcium à l'intérieur des cellules. Ces ions calciques proviennent soit du milieu extracellulaire soit d'un compartiment intracellulaire, le réticulum sarcoplasmique (RS). Les concentrations cytosoliques de  $\text{Ca}^{2+}$  sont déterminées par l'équilibre entre trois processus : l'entrée de calcium dans la cellule par les canaux calciques dépendants du voltage et/ou par les canaux ioniques liés à un récepteur (ROCs pour *receptor-operated channels*), la relâche de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS et finalement, par la sortie d'ions calciques par différentes pompes, principalement la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. La dépolarisation membranaire, suite à la liaison de la NA, provoque l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage et le calcium extracellulaire peut entrer dans les cellules. La liaison de différents agonistes à

leur récepteur respectif peut également entraîner un mouvement des ions calciques vers l'intérieur des cellules. En effet, en plus de la NA ( $\alpha_1$ -adrénergique), l'AngII (AT<sub>1</sub>), l'endothéline (ET, ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>) [47], le TXA<sub>2</sub> (TP) [48] et l'AVP (V1) [49] peuvent également augmenter les taux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaires en activant les ROCs, mais aussi en activant une cascade de signalisation impliquant la phospholipase C (PLC). Cette dernière génère deux seconds messagers, l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et le diacylglycérol (DAG), à partir d'un phospholipide membranaire, le phosphatidyl inositol diphosphate (PIP<sub>2</sub>). Suite à la liaison de l'IP<sub>3</sub> à ses récepteurs situés sur des canaux du RS, il y a une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire provenant de celui-ci. De son côté, le DAG active la protéine kinase C (PKC). Cette enzyme, par l'activation de CPI-17 (*protein kinase C-potentiated inhibitor protein of 17 kDa*) [50], et de RhoA kinase inhibent la phosphatase de la chaîne légère de myosine (MLCP) en la phosphorylant permettant ainsi la sensibilisation de la machinerie contractile. Les deux seconds messagers provoquent également une dépolarisation de la membrane en stimulant la sortie de chlore et l'entrée de cations (Na<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup>). Suite à l'accroissement des taux de calcium intracellulaire, celui-ci se lie à la calmoduline (CaM) pour former le complexe Ca<sup>2+</sup>/calmoduline et activer la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK). Une fois activée, la MLCK phosphoryle la tête de la chaîne légère de myosine afin qu'elle puisse former des ponts avec l'actine et initier le cycle de contraction hydrolysant l'ATP [3]. La figure 5 illustre le mécanisme de contraction des CMLVs.

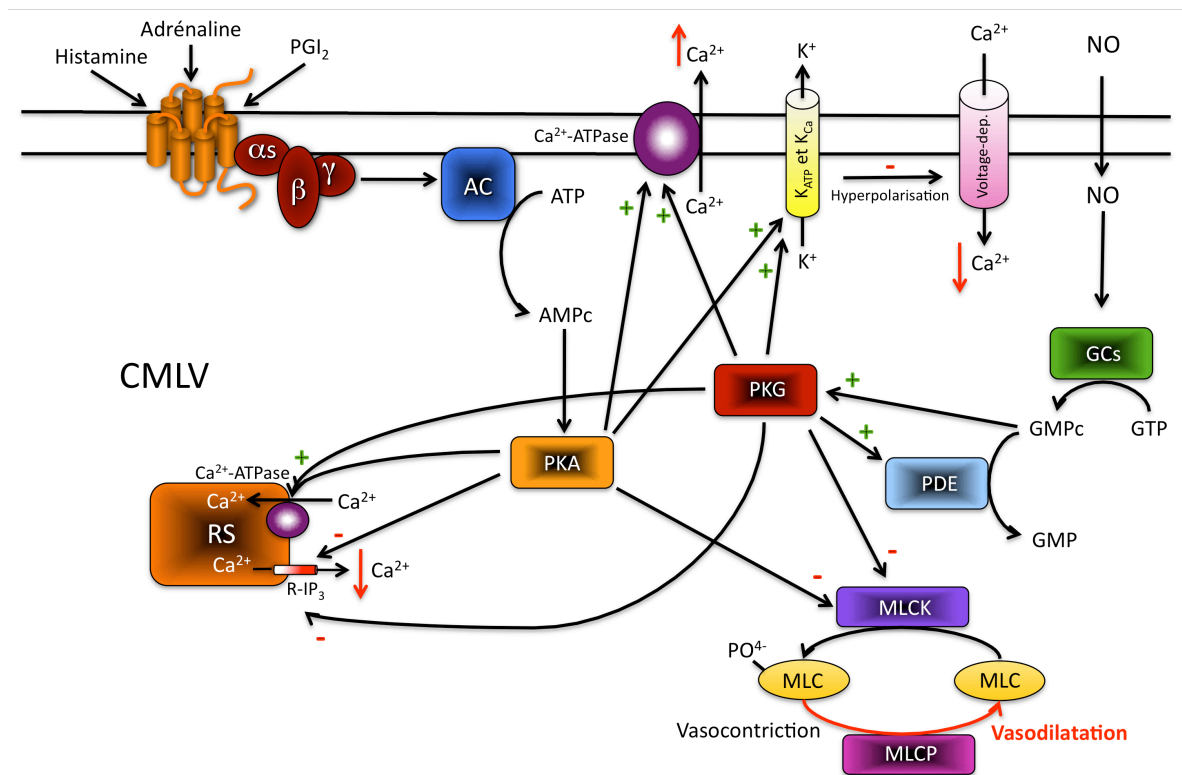


**Figure 5: Mécanisme de contraction des cellules musculaires lisses vasculaires.**  
Inspiré de [3].

### 2.1.3.2. Mécanisme de relaxation des cellules musculaires lisses

Tout comme la contraction, la relaxation des CMLVs dépend des concentrations de Ca<sup>2+</sup>, mais contrairement à la vasoconstriction, le processus de vasodilatation se produit lorsque la quantité d'ions calcique diminue et que la MLCK est inhibée. En effet, la relaxation du muscle lisse vasculaire peut se produire par trois mécanismes différents qui convergeront tous vers la réduction du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire.

- Une hyperpolarisation de la membrane plasmique réduit l'entrée de calcium par les canaux voltage-dépendants.
- L'activation de la voie Gs-AMPC-PKA (protéine kinase A) par la liaison de l'adrénaline ( $\beta_2$ -adrénergique), de la prostacycline ( $\text{PGI}_2$ , IP) et de l'histamine ( $\text{H}_2$ ) à leur récepteur respectif.
  - PKA phosphoryle le phospholambane, régulateur de la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, et active la pompe tant au niveau du RS que de la membrane plasmique permettant au calcium de sortir de la cellule.
  - PKA phosphoryle les canaux potassiques  $\text{K}_{\text{ATP}}$  et  $\text{K}_{\text{Ca}}$  provoquant leur activation. Le  $\text{K}^+$  sort de la cellule entraînant une hyperpolarisation de la membrane et une inhibition des canaux calciques voltage-dépendants. Le calcium demeure à l'extérieur de la cellule.
  - PKA inhibe la MLCK en la phosphorylant ce qui permet à la MLCP de prendre le dessus. Ainsi, les MLC demeurent inactives et celles qui étaient actives sont déphosphorylées provoquant une relaxation des CMLVs.
- L'activation de la voie GMPc-PKG par la liaison du NO (GCs, guanylate cyclase soluble (cytosolique)) ou de l'ANP (GC-A, guanylate cyclase (membranaire)) à leur récepteur respectif.
  - PKG phosphoryle le phospholambane, régulateur de la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, et active la pompe tant au niveau de RS que de la membrane plasmique permettant au calcium de sortir de la cellule.
  - PKG phosphoryle la MLCK. Sous sa forme phosphorylée, la MLCK est inactive. Elle ne peut donc pas activer les MLC et ainsi il y a relaxation du muscle lisse. De plus, par cette inhibition de la MLCK, sa vis-à-vis, la MLCP déphosphoryle les MLC qui sont actives.
  - PKG phosphoryle le canal  $\text{K}_{\text{Ca}}$  provoquant la sortie de  $\text{K}^+$  de la cellule. Cette sortie de potassium provoque une hyperpolarisation de la membrane plasmique et l'inactivation des canaux calciques voltage-dépendants. Ainsi, l'entrée de calcium dans la cellule est réduite.



**Figure 6: Mécanisme de relaxation des cellules musculaires lisses.**

Adapté de [3, 51].

### 2.1.3.3. Régulation nerveuse de la résistance périphérique

Tel que mentionné dans la section traitant de la régulation nerveuse de la pression artérielle, les artères de résistance et les artérioles sont innervées par des fibres sympathiques et dans une moindre mesure par des fibres parasympathiques. L'innervation est particulièrement importante au niveau des reins, de l'estomac et de la peau [42]. Une stimulation sympathique au niveau de ces vaisseaux provoque une vasoconstriction via la liaison de la NA sur les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques de la paroi. Cette vasoconstriction contribue à faire augmenter la résistance périphérique. À l'inverse, comme les fibres parasympathiques sont absentes au niveau des artérioles, une vasodilatation peut survenir

lorsque le stimulus sympathique est levé ou que les glandes surrénales sécrètent de l'adrénaline ( $\beta_2$ -adrénergiques) [1, 43].

#### 2.1.3.4. Régulation par l'endothélium

L'endothélium n'est maintenant plus connu comme une simple barrière entre le sang et la paroi vasculaire mais comme un organe important dans le contrôle de l'homéostasie hémodynamique du système vasculaire. En effet, de par sa position stratégique entre le sang et les couches de CMLVs, il est aux premières loges pour exercer ses multiples fonctions endocrines et paracrines [52]. L'endothélium régule le tonus vasculaire en libérant plusieurs substances vasoactives tant vasodilatatrices que vasoconstrictrices. Ainsi, les cellules endothéliales sécrètent le NO, le facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium (EDHF) et la  $PGI_2$ . Ces substances provoquent une vasorelaxation des cellules du muscle lisse tandis que le  $TXA_2$ , l'ET et l'anions superoxyde entraîne une vasoconstriction. Ces substances interagissent entre elles. La sommation de ces interactions locales avec la constriction basale, contrôlée par le système nerveux sympathique, permet d'obtenir le tonus vasculaire total [3].

##### a. $PGI_2$

L'idée que l'endothélium pouvait être impliqué dans la régulation du tonus vasculaire a commencé à faire son chemin dans les années 70 lorsque des chercheurs ont découvert que les vaisseaux sanguins sécrétaient une substance vasodilatatrice, la prostacycline [3]. Cette dernière fait partie de la superfamille des eicosanoïdes. Cette famille comprend principalement les prostaglandines (PG) et les leukotriènes (LT). Ils dérivent tous d'une molécule commune, l'acide arachidonique (AA). Cette molécule commune est produite à partir d'un phospholipide membranaire. Sous l'effet d'une enzyme, la phospholipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ), le phospholipide est clivé et l'AA est libéré. Par la suite, l'AA peut être transformé en prostaglandine  $G_2$  ( $PGG_2$ ) puis en prostaglandine  $H_2$  ( $PGH_2$ ) sous l'effet de la cyclooxygénase (COX). Finalement, la prostacycline synthase

transforme la  $PGH_2$  en prostacycline [2]. Au niveau des plaquettes, elle inhibe leur l'agrégation tandis qu'au niveau des cellules endothéliales (CE), la prostacycline entraîne une relaxation musculaire. En effet, elle se fixe à son récepteur couplé à la protéine Gs et active l'AC. Cette enzyme produit de l'AMPc à partir de l'ATP. L'AMPc active une kinase, la PKA, qui provoque une diminution des concentrations de  $Ca^{2+}$  intracellulaires, une hyperpolarisation de la membrane et une inhibition de la MLCK (figure 6).

### b. NO

Après la découverte de la sécrétion de prostacycline au niveau de l'endothélium [53], un deuxième vasodilatateur sécrété par les cellules endothéliales a été mis au jour en 1980 [54]. À cette époque, son identité n'était pas encore connue et jusqu'à la fin des années 80, cette substance relaxante portait le nom de EDRF (*endothelial-derived relaxing factor*). Ce facteur endothélial stimulé par l'Ach a été identifié comme étant le monoxyde d'azote [55-57]. Le NO est un gaz soluble et lipophile, généré de façon continue par l'endothélium, qui diffuse facilement à travers les membranes. Son principal rôle est de moduler le tonus vasculaire de base par l'induction d'une vasodilatation [3]. La relâche de NO est stimulée par une hausse des besoins métaboliques ainsi que par une augmentation des forces de cisaillements induite par une augmentation du débit (*flow-induced vasodilatation*), mécanisme compensatoire suite à une diminution du diamètre des vaisseaux (réponse myogénique). En effet, il s'oppose à la composante constrictrice vasculaire empêchant une contraction trop importante des artères de résistances. Avec les années, les recherches ont permis de lui attribuer plusieurs autres fonctions dans le maintien de l'homéostasie vasculaire basées sur des propriétés anti-apoptotiques, antiprolifératives, anti-inflammatoires, antiathérogéniques et antiplaquettaires [52].

#### i. Description des NOS

Le NO est synthétisé par une famille d'enzymes contenant un groupement hème, les NO-synthases (NOS) à partir de la L-arginine. Classiquement, la formation du NO

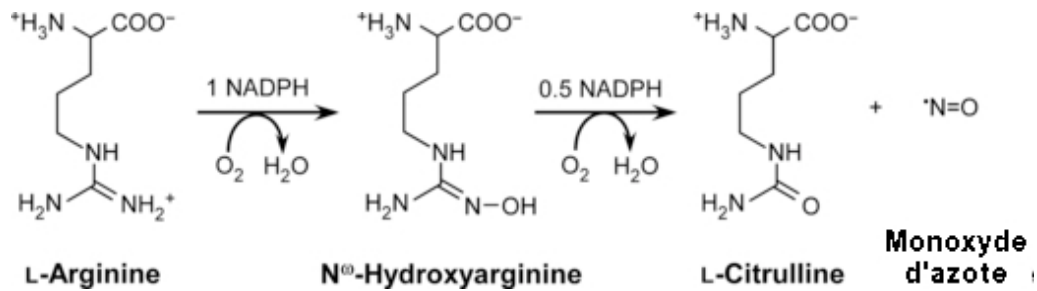


nécessite une augmentation de calcium intracellulaire dans les cellules endothéliales qui, une fois lié à la CaM, active la NOS avec l'aide de différents cofacteurs tels que le NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), la FAD/FMN (flavoprotéines : *flavin adenine dinucleotide / flavin mononucleotide*) et le BH<sub>4</sub> (tétrahydrobioptérine) (figure 8). Jusqu'à présent, trois isoformes de NOS sont bien caractérisées : la NOS endothéliale (eNOS ou NOS III), la NOS inductible (iNOS ou NOS II) et la NOS neuronale (nNOS ou NOS I) [58]. Récemment, une forme mitochondriale (mtNOS) a été identifiée chez le rat [59, 60]. Cette découverte est cependant encore controversée [61]. La eNOS et la nNOS sont des enzymes constitutives qui sont particulièrement présentes dans l'endothélium vasculaire et le système nerveux. Leur activation dépend de la CaM et lorsqu'elles sont activées, elles produisent du NO, mais seulement en petites quantités pendant de courtes périodes (secondes à minutes). Par contre, la iNOS est activée dans des conditions pathologiques par des agents pro-inflammatoires au niveau de plusieurs types de cellules comme les macrophages, les hépatocytes, les chondrocytes et les CMLVs [62]. Elle produit une grande quantité de NO sur de longues périodes de temps (heures à jours) indépendamment du complexe Ca<sup>2+</sup>/CaM [63, 64].

## ii. Structure des NOS et synthèse de NO

Même si les NOS ne sont pas toutes exprimées et régulées de la même façon et que l'homologie entre les différentes isoformes (I, II et III) n'est que de 50 à 60%, la réaction d'oxydation de la L-arginine ainsi que les différents sites de liaison pour les cofacteurs et la CaM demeurent identiques [63]. Toutes les isoformes contiennent un site de liaison pour le NADPH, le FAD, FMN et le complexe Ca<sup>2+</sup>/CaM dans leur domaine C-terminal, c'est le domaine réductase de la NOS. Le domaine N-terminal contient le site de liaison pour le groupement hème (ion ferrique), le cofacteur BH<sub>4</sub> et la L-arginine, c'est le domaine oxygénase [63, 65]. C'est également dans ce domaine qu'il y a des résidus sérine et thréonine pouvant être phosphorylés et des sites de myristoylation et palmitoylation permettant à la eNOS de se fixer à la membrane [62]. Ces deux domaines forment un

monomère de NOS. Les NOS sont actives qu'à l'état d'homodimère. Ainsi les deux monomères s'alignent de façon à ce que les deux domaines oxygénase soient un en face de l'autre [66]. Les deux monomères sont fixés ensemble par quatre cystéines (Cys) situées dans les domaines oxygénases. Elles sont deux par monomère et sont reliées entre elles par l'intermédiaire d'un ion zinc (Zn) (figure 8). L'oxydation de la L-arginine en L-citrulline et en NO implique deux étapes séparées avec la formation d'un intermédiaire, la NOHA (N<sup>o</sup>-hydroxyarginine) (figure 7). Dans la première étape, l'oxygène est incorporé à la L-arginine pour former la NOHA. La deuxième étape consiste en un clivage oxydatif du lien C=NOH de la molécule intermédiaire afin de libérer le NO et la L-citrulline [58, 67].

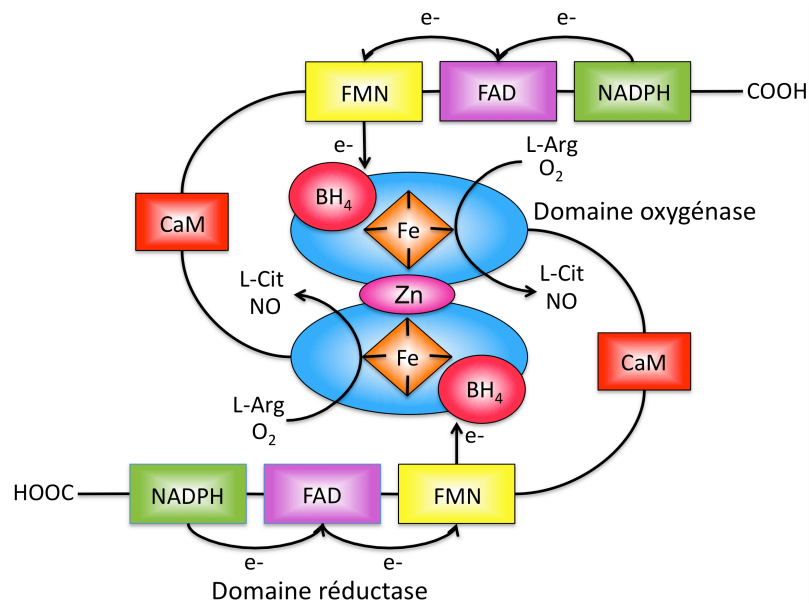


**Figure 7: Réactions catalysées par les NOS.**

Adapté de [66].

Les cofacteurs FAD et FMN acceptent deux électrons provenant du NADPH et les transfèrent au groupement hème dans la partie oxygénase de l'enzyme. Ils permettent ainsi qu'un donneur de deux électrons (NADPH) puisse donner à un accepteur d'un seul électron (hème) en formant des radicaux intermédiaires stables [58]. La CaM accélère le transfert des électrons entre les cofacteurs situés dans la partie réductase et l'hème situé dans le domaine oxygénase [68]. Les études s'entendent toutes sur la nécessité du BH<sub>4</sub> dans l'activité de la NOS, mais il existe encore de la controverse sur son rôle exacte. Ainsi, le BH<sub>4</sub> serait notamment impliqué dans la dimérisation de l'enzyme [69], dans le couplage

oxydatif du NADPH avec la synthèse du NO [70] ainsi que dans l'inhibition de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) [71]. De plus, le  $BH_4$  serait directement impliqué dans le transfert d'électrons au groupement hème [72].



**Figure 8: Structure des NOS en homodimère et mouvement des électrons.**

Adapté de [66, 73-75]

### iii. Stimulation de la relâche de NO

L'activité de la eNOS est continuellement stimulée par les forces de cisaillement provoquées par le flux sanguin artériel. Les forces de cisaillement activent la voie de la phosphatidylinositol-3-kinase ( $PI_3K$ ) et l'activation subséquente d'Akt et de PKA. Ces deux kinases phosphorylent la eNOS provoquant l'activation de celle-ci [76-78]. L'activité de la eNOS peut également être stimulée par la liaison d'une multitude d'agonistes à la surface des cellules endothéliales. Ainsi l'acétylcholine, la BK, l'histamine, l'ATP, l'ADP augmentent l'influx de calcium par l'activation de la voie de la PLC (protéine  $G_q$ ). Tout comme dans les CMLVs, cette enzyme entraîne la formation d' $IP_3$  stimulant la relâche de calcium du RS via les canaux sensibles à l' $IP_3$ . Dans les cellules endothéliales, cette

augmentation de calcium intracellulaire active la CaM qui se lie à la eNOS et l'active [3, 79]. En plus des forces de cisaillement, d'autres agonistes comme l'insuline et le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) augmentent l'activité de la eNOS par l'activation de la PI<sub>3</sub>K et une phosphorylation de la eNOS [80-83]. Ces mécanismes ne provoquent pas d'entrée de calcium dans la cellule. Suite à la stimulation de la eNOS, celle-ci synthétise du NO qui pourra diffuser au niveau des CMLVs et produire une vasodilatation telle que présentée à la figure 6. Cette vue d'ensemble de la stimulation de la synthèse de NO est très simplifiée. Voici un exemple qui illustre bien la complexité des processus de stimulation des NOS. Une molécule comme la bradykinine peut activer la eNOS par plus d'un mécanismes et faire intervenir une grande variété de modulateurs. En effet, la BK peut stimuler la eNOS par l'augmentation de calcium intracellulaire, mais aussi par la phosphorylation de celle-ci. Cette phosphorylation peut se produire sur différents résidus et par plusieurs kinases différentes. La BK active également la eNOS en stimulant sa liaison à une chaperones moléculaires, la *heat shock protein 90* (HSP90), provoquant simultanément sa dissociation d'avec la cavéoline-1 au niveau des cavéoles [84]. Afin d'y voir un peu plus clair dans tous ces mécanismes et modulateurs, la section qui suit traite de la régulation des NOS.

#### iv. Régulation endogène de la synthèse de NO

Le NO est un médiateur chimique important dans l'organisme. Il est synthétisé dans beaucoup de tissus et est appelé à exercer une multitude de fonctions différentes. La régulation de l'activité des NOS permet au NO d'exercer ses fonctions adéquatement. L'activité des NOS (eNOS et nNOS surtout) peut être modulée par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation et l'acylation (eNOS). Elle peut également être modulée par l'intermédiaire des molécules qui lui sont associées comme la CaM, le BH<sub>4</sub> et la HSP90. La localisation des NOS peut, quant à elle, être régulée via l'acylation (palmitoylation et myristoylation) ainsi que par des protéines contenues dans les cavéoles, notamment, la cavéoline-1 (Cav-1). Tous ces mécanismes et ces modulateurs impliqués

dans la régulation de la synthèse du NO montrent la complexité mais aussi l'importance de ces processus, car leur dysfonctionnement mène souvent à des pathologies telles que hypertension et l'athérosclérose. Voici donc un aperçu des mécanismes ainsi que des différentes molécules qui interviennent dans la régulation des NOS.

### Phosphorylation des NOS

Jusqu'à maintenant, cinq sites de phosphorylation sur la eNOS ont été identifiés. Ces phosphorylations se produisent sur des sérines et des thréonines situées principalement dans le domaine réductase. Certaines sont activatrices tandis que d'autres sont inhibitrices. En effet, l'activité de la eNOS est augmentée par la phosphorylation des sérines 1177 et 633 [85-88]. Par contre, la phosphorylation de la sérine 495 située dans le domaine de liaison de la CaM inhibe l'activité de la eNOS [86, 89]. La phosphorylation des sérines 114 et 615 suscite toutefois encore la controverse [87, 88].

La Ser<sup>1177</sup> est située dans le domaine réductase de la eNOS. Elle est phosphorylée en réponse à de nombreux stimuli tels que les forces de cisaillement, les statines ainsi que certaines hormones comme la bradykinine (BK) et l'insuline [80-83]. Cette sérine apparaît comme étant le plus important site de phosphorylation de la eNOS. En effet, l'activation de la eNOS, suite à ces stimuli, passe presque exclusivement via la phosphorylation de cette sérine. L'activation de la eNOS est stimulée par la liaison du complexe Ca<sup>2+</sup>/CaM et cette activation peut être davantage augmentée suite à la phosphorylation de la sérine 1177. Cette phosphorylation peut même augmenter l'activité de la eNOS sans augmentation préalable des concentrations de calcium [81, 86, 88]. Les différentes kinases impliquées dans la phosphorylation en Ser<sup>1177</sup> sont l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) [86], la protéine kinase B (PKB) ou Akt [78, 85, 90], la PKA [83, 88], la CaMKII (*Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent protein kinase*) [91], PKG [92] et la PP2A (*protein phosphatase 2A*) [93]. Contrairement aux autres enzymes, PP2A déphosphoryle Ser<sup>1177</sup> et conséquemment inhibe l'activité de la eNOS. Par ailleurs, il a été proposé que la phosphorylation de la sérine 1177

provoquerait un changement de conformation du domaine réductase qui permettrait le transfert d'électrons d'un monomère à l'autre. Par contre, lorsque la Ser<sup>1177</sup> n'est pas phosphorylée, le domaine réductase agirait comme une clôture et empêcherait le transfert d'électrons entre les deux monomères [94].

Contrairement aux autres sites, la phosphorylation de la thréonine 495 diminue l'activité de eNOS. Ce site est principalement phosphorylé par la PKC et peut-être également par l'AMPK [86, 89]. Comme la Thr<sup>495</sup> est située dans le domaine de liaison de la CaM et que celle-ci est essentielle à l'activation de la eNOS, sa phosphorylation empêcherait la liaison de la CaM à son site [91]. La déphosphorylation de la thréonine 495 est observée suite à la liaison de la bradykinine et du VEGF sur leur récepteur respectif [82, 93]. Les enzymes responsables de cette déphosphorylation sont la protéine phosphatase 1 (PP1) [91], la PP2A [95] et la calcineurine (*protein phosphatase 2B*, PP2B) [82].

L'activité de la eNOS peut également être augmentée par la phosphorylation de la sérine 633. Cette sérine est située dans le domaine de liaison du FMN connu comme étant le domaine auto-inhibiteur de la CaM [87, 88]. La PKA est la principale kinase responsable de la phosphorylation en Ser<sup>633</sup> [88, 96]. Cette sérine peut être déphosphorylée par une phosphatase, mais son identité est encore inconnue. De plus, la plupart des activateurs de la phosphorylation de la sérine 1177 stimulent également la phosphorylation de la sérine 633. Ainsi, l'ATP, la bradykinine, le VEGF, les forces de cisaillement et les statines phosphorylent la eNOS au niveau de la sérine 633 [80, 87, 88, 96]. La vitesse de cette phosphorylation serait, par contre, plus lente que celle qui se produit sur la sérine 1177 et serait indépendante de l'influx de calcium [96, 97]. Ces observations amènent à penser que la phosphorylation en Ser<sup>633</sup> serait importante dans le maintien de l'activité de eNOS suite à l'entrée de calcium et/ou à la phosphorylation en Sérine 1177 [84].

### Acylation de la eNOS

L'acylation est une modification post-traductionnelle qui consiste à lier de manière covalente une chaîne d'acides gras par un mécanisme enzymatique. Cette addition lipidique permet l'ancrage de la protéine à la membrane plasmique [4]. Ainsi l'acylation influence la localisation d'eNOS au niveau de la membrane plasmique et conséquemment son activation. Pour être active, la eNOS doit être ancrée à la membrane plasmique, plus précisément au niveau des cavéoles [98, 99]. La eNOS subit deux types d'acylation, la myristoylation et la palmitoylation permettant sa localisation adéquate [98, 100]. La myristoylation est l'ajout d'une chaîne d'acides gras saturés contenant 14 carbones, le myristate, à l'extrémité N-terminal de la eNOS [101]. La palmitoylation est, quant à elle, l'addition d'un palmitate (molécules de 16 carbones) sur les cystéines 15 et 26 de l'extrémité C-terminal de l'enzyme [102, 103]. La palmitoylation est stimulée par la liaison d'agonistes qui modifient l'entrée de calcium dans les cellules [104].

### CaM et calcium

La CaM est la première protéine à avoir été découverte comme interagissant avec les NOS [105]. Son rôle est essentiel pour l'activité enzymatique des trois isoformes, mais plus particulièrement pour la eNOS et la nNOS. De par sa haute affinité pour la CaM, la iNOS ne semble pas être influencée par les variations de concentrations intracellulaires de calcium [63, 65]. Lorsque fixée à son domaine de liaison, la CaM augmente le transfert des électrons du domaine réductase au domaine oxygénase [106, 107]. En plus d'être dépendantes du complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , la eNOS et la nNOS possèdent une séquence de 40 à 50 acides aminés situés dans le domaine de liaison de FMN portant le nom de domaine auto-inhibiteur de la CaM [108]. Cette séquence, formant une boucle, déstabilise la liaison de la CaM à faibles concentrations de calcium et inhibe le transfert d'électrons du FMN (domaine réductase) vers le groupement hème (domaine oxygénase) en absence du complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  [109, 110]. Par contre, lorsque le calcium intracellulaire augmente, la

liaison de la CaM à son domaine provoque le déplacement de la boucle inhibitrice permettant le passage des électrons [111].

La eNOS est l'enzyme qui est la plus sensible aux changements de concentrations de calcium à l'intérieur des cellules [112]. Cependant, elle peut être activée par certains stimuli qui n'entraînent pas d'importants influx de calcium. C'est le cas des forces de cisaillement [113]. Ce stimulus active la PI<sub>3</sub>K et l'activation subséquente d'Akt et de PKA. Ces deux kinases phosphorylent la eNOS sur la sérine 1177 provoquant l'activation de celle-ci. Ce mécanisme a été qualifié d'activation indépendante du Ca<sup>2+</sup>. Des études ont cependant montré que c'était plutôt une activation à des concentrations basales de calcium, car l'activation de la eNOS était inhibée suite à une chélation du calcium [76-78]. Par contre, d'autres stimuli comme la BK et l'histamine ont besoin d'une augmentation du calcium intracellulaire afin de pouvoir activer la eNOS par phosphorylation. La différence entre les forces de cisaillement et ces agonistes se situe au niveau de la sensibilité de la kinase pour le calcium. Ainsi, la CaMKII nécessite une plus grande augmentation de calcium intracellulaire pour être active tandis qu'Akt, qui a été activée par les forces de cisaillements, n'est pas affectée par les changements de concentrations de calcium [78, 91].

#### BH<sub>4</sub>

Le BH<sub>4</sub> se lie au domaine oxygénase de chaque monomère. Il y a deux molécules de BH<sub>4</sub> par complexe enzymatique. Comme il a été mentionné précédemment, le BH<sub>4</sub> possède plusieurs fonctions dont celles de stabiliser et de transférer les électrons en provenance du domaine réductase vers le domaine oxygénase. En effet, le BH<sub>4</sub> donne des électrons au groupement hème complexé à l'oxygène (complexe Fe-O<sub>2</sub>) et le stabilise [114-116]. Par contre, lorsque sa concentration diminue, le transfert d'électrons des flavoprotéines vers le groupement hème n'est plus possible. Le transfert d'électrons n'est donc plus couplé à l'oxydation de la L-arginine, le complexe Fer-oxygène se dissocie et le domaine oxygénase produit maintenant des anions superoxydes au lieu de produire du NO



[117-119]. Le découplage de la NOS, observées dans plusieurs pathologies telle que le diabète [120], l'hypertension [121], l'athérosclérose [122], ainsi que dans certaines situations particulières comme la tolérance aux nitrates et le tabagisme, influence fortement la biodisponibilité du NO [123, 124]. En effet, la production de NO est diminuée tandis que celle de l'anion superoxyde est augmentée, ce qui réduit davantage la disponibilité du NO puisqu'il est utilisé pour former du peroxyde d'azote ( $O_2^- + NO = ONOO^-$ ) [75]. De plus, le  $BH_4$  serait également impliqué dans la stabilisation du dimère d'eNOS. Dans chaque domaine oxygénase, la eNOS possède deux cystéines. Ces Cys seraient essentielles à la liaison du  $BH_4$  à son site dans le domaine oxygénase. Sans liaison du  $BH_4$ , il y a un découplage de la eNOS et une déstabilisation du dimère [125, 126]. Le stress oxydatif ainsi engendré par le découplage de la eNOS oxyde le  $BH_4$  entraînant son inactivation et donc davantage d'anions superoxyde produits.

#### Cavéoles et cavéoline

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique formées de protéines comme les cavéolines. Ces micro-domaines membranaires sont impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires telles que la transduction du signal. Au niveau de la membrane plasmique des cellules endothéliales, la majorité des eNOS sont situées dans les cavéoles et elles lient la cavéoline-1 (cav-1) [98, 127, 128]. La liaison entre la cav-1 et la eNOS inhibe l'activité de cette dernière [129]. La eNOS demeure liée jusqu'à sa stimulation via l'augmentation des concentrations de calcium intracellulaires suite à la liaison d'agonistes à leur récepteur (Ach, BK) et l'augmentation des forces de cisaillement [130]. Ainsi, la dissociation du complexe eNOS/cavéoline-1 entraîne l'activation de la eNOS puis son désenclavement de la membrane plasmique et son retour dans le cytosol suite à la dépalmitoylation de l'enzyme [131].

## HSP90

Faisant partie de la famille des chaperones moléculaires, la HSP90 a été identifiée comme étant un régulateur de l'activité de la eNOS possiblement de façon allostérique. Certains stimulateurs de la relâche de NO tels que l'estradiol, le VEGF, la BK et l'histamine augmentent l'interaction de HSP90 avec la eNOS. Cette interaction, qui passe par une phosphorylation de HSP90, augmente l'activité de l'enzyme de deux à trois fois [58, 132]. HSP90 est une protéine d'échafaudage (*scaffold*) qui lit à la fois la eNOS et la kinase Akt sur des régions adjacentes de son domaine M. Ainsi, suite à une stimulation, Akt et eNOS sont recrutées au niveau d'HSP90. Akt phosphoryle HSP90 ainsi qu'eNOS et provoque l'activation de celle-ci [133]. HSP90 faciliterait également le détachement de la cav-1 de la eNOS suite à la liaison du complexe  $Ca^{2+}/CaM$  [134]. Des études ont montré qu'il y aurait également une interaction similaire entre la nNOS et HSP90. En effet, HSP90 augmenterait l'affinité de nNOS pour la CaM [135].

### v. Régulation exogène de la synthèse de NO

La section précédente traite de la régulation endogène de la relâche de NO, mais il est également possible de contrôler la quantité de NO disponible de façon exogène par l'administration de médicaments agissant à différents niveaux.

## Donneurs de NO

L'endothélium vasculaire a des effets protecteurs de par la sécrétion de certaines molécules comme le NO. Par contre, la perte de ces effets protecteurs se produit dans plusieurs maladies telles que l'athérosclérose, l'hypertension, les maladies coronariennes, les accidents vasculaires cérébraux (AVC) [136-138]. La dysfonction endothéliale peut être due à une diminution de la synthèse de NO, à une diminution de sa biodisponibilité ou à une augmentation de son inactivation [139]. Pour remédier à la situation, le remplacement ou l'augmentation des concentrations de NO endogène sont possibles grâce à

l'administration de donneurs de NO. Ils forment une classe hétérogène de médicaments, mais ultimement ils relâchent tous du NO qui permet de rétablir l'équilibre vasculaire ou du moins l'améliorer. Certaines molécules sont utilisées depuis plus de 100 ans, c'est le cas de la nitroglycérine (NTG). Ce nitrate ainsi que d'autres nitrates comme l'isosorbide mononitrate (ISMN), l'isosorbide dinitrate (ISDN) et le nicorandil sont utilisés depuis longtemps pour traiter les maladies ischémiques comme l'angine, l'insuffisance cardiaque et l'hypertension, mais leur utilisation est limitée par leur temps de demi-vie court, le développement de tolérance et leurs effets secondaires à cause de leur manque de sélectivité [136, 138]. La tolérance est un phénomène complexe multifactoriel qui mène à une réduction de la réponse des vaisseaux aux nitrates. Il existe beaucoup de causes possibles dont notamment la désensibilisation de la GCs et l'augmentation du stress oxydatif [140-142]. Pour palier à ces limitations, depuis le milieu des années 80, une multitude de nouvelles molécules a fait son apparition. Il est possible de diviser cette classe de médicaments en trois catégories :

- Les donneurs directs tels que le SNP, les diazéniumdiolates ou NONOates (diéthylènetriamine, DETA/NO), les S-nitrosothiols (S-nitroso-N-acétylpénicillamine, SNAP) et les sydnonimines (molsidomine et 3-morpholino-sydnonimine, SIN-1) [139, 142, 143].
- Les donneurs nécessitant une transformation tels que la NTG, ISDN, ISMN et le sinitrodil.
  - Les nitrates classiques nécessitent tous une transformation préalable afin de pouvoir libérer le NO. Ils sont donc plus susceptibles à la tolérance.
  - Le sinitrodil possède une plus grande sélectivité pour les grosses artères et provoque moins de maux de tête que les nitrates [139, 144].
- Les donneurs bifonctionnels ou hybrides tels que la nitroaspirine.
  - Cette catégorie de donneur de NO représente une nouvelle approche qui consiste à modifier des molécules déjà existantes afin de pouvoir leur greffer un groupement NO. C'est le cas des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS). Le but de cette approche est de synthétiser des molécules qui gardent l'activité pharmacologique de la molécule parent tout en libérant du NO [143].

Les effets bénéfiques des donneurs de NO ne se limitent pas aux maladies ischémiques mais ils sont également efficaces dans le traitement de l'athérosclérose [145, 146], du diabète [147] et de l'hypertension systolique isolée [148].

#### Les PDE et leur inhibiteur (iPDE)

En plus de la régulation des NOS, la voie du NO peut également être contrôlée au niveau du GMPc par une famille d'enzymes, les phosphodiésterases (PDE) qui inactive le GMPc en le transformant en GMP. Dans le système cardiovasculaire, quatre isoformes sont prédominantes, soient la PDE1, la PDE2, la PDE3 et la PDE5. Cependant, la PDE3 est sélective pour l'AMPc et la PDE2 ne se retrouve qu'au niveau du cœur. La PDE1 est dépendante du complexe  $Ca^{2+}/CaM$  et possède autant d'affinité pour l'AMPc que pour le GMPc. Elle se retrouve dans le cœur ainsi qu'au niveau des CMLVs. La PDE5 est une isoforme très sélective pour le GMPc qui se retrouve dans le cœur ainsi qu'au niveau du muscle lisse vasculaire. Avec l'existence d'inhibiteurs très sélectifs comme le sildénafil (Viagra), le tadalafil (Cialis) et le vardénafil (Lévitra), la PDE5 est l'isoforme la plus étudiée. Ces inhibiteurs sont utilisés dans le traitement de la dysfonction érectile depuis une quinzaine d'années et plus récemment, ils ont été approuvés pour le traitement de l'hypertension pulmonaire. Au niveau des vaisseaux, la dégradation du GMPc est principalement catalysée par la PDE1 et la PDE5 [149].

Comme mentionné précédemment, la PDE1 est dépendante de la CaM. Elle est donc sensible aux changements de calcium intracellulaire. En effet, en absence de calcium, la PDE1 est très peu active à cause de la présence d'un domaine auto-inhibiteur dans sa structure. Par contre, lorsque le calcium augmente, l'enzyme est activée [150]. Cette isoforme est stimulée par la NA, l'AngII et l'ET-1. Suite à la liaison de ces agonistes à la surface des CMLVs, les concentrations de calcium augmentent et la PDE1 est activée afin de dégrader le GMPc et ainsi augmenter la vasoconstriction [151]. L'activation chronique de la PDE1 a été associée à la tolérance aux nitrates ainsi qu'à la prolifération vasculaire.

Son inhibition par la vinpocétine renverse partiellement la tolérance [152, 153]. L'activité de la PDE5 est également augmentée par l'administration chronique de nitrates et son inhibition par des iPDE5 renverse la tolérance [154, 155].

La PDE5 a été découverte comme liant le GMPc au niveau des poumons. C'est seulement plus tard qu'on lui attribua une activité hydrolytique pour le GMPc. Elle a un rôle important dans le contrôle du tonus vasculaire, en particulier dans le système veineux du corps caverneux du pénis et au niveau des vaisseaux pulmonaires [156]. La PDE5 interagit étroitement avec le système NO/GCs/GMPc. Cette interaction est toutefois abolie par des inhibiteurs de NOS comme le L-NAME (N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine méthylester). Cette observation ainsi que d'autres études ont montré que l'inhibition pharmacologique des NOS supprime l'action vasodilatatrice de la PDE5 tant *in vitro* qu'*in vivo* [157, 158]. En effet, une étude a montré que le sildénafil est moins efficace dans des pathologies qui sont associées à une activité réduite des NOS comme le diabète. L'efficacité du sildénafil a pu être rétablie en transférant le gène de la eNOS dans le corps caverneux des rats [159]. La PDE5 module la voie du NO, mais cette dernière peut également moduler la PDE5. Le GMPc et la PKG régulent l'activité catalytique des PDE5. Certaines PDE, comme la PDE5, possèdent des domaines de régulation appelés GAF où le GMPc peut se lier et stimuler l'activité catalytique de l'enzyme. En effet, la liaison du GMPc aux domaines GAF augmente la phosphorylation de la PDE5 par la PKG [160, 161]. Cette phosphorylation à l'extrémité N-terminal induit, quant à elle, un changement de conformation qui augmente l'affinité du GMPc pour les domaines GAF et provoquant du même coup une hausse de l'activité catalytique de l'enzyme de 50 à 70% [162]. Ce mécanisme joue un rôle important dans la signalisation par le NO. En effet, l'administration exogène de NO provoque une hausse marquée des taux de GMPc, puis une chute rapide suite à l'activation de l'enzyme par le GMPc [163]. Le GMPc peut également lier la PDE5 sans toutefois être dégradé. Cette liaison allostérique du GMPc servirait de site d'entreposage et de pool de GMPc dans les situations où ses niveaux diminuent [164, 165].

### Activateurs et stimulateurs directs de la GCs

Tel que mentionné précédemment, le NO produit ses effets vasodilatateurs par sa liaison à une enzyme qui transforme le GTP en GMPc, la GCs. Le GMPc ainsi produit active par la suite la PKG et provoque la relaxation des CMLVs. Alors que certaines molécules entraînent la libération de NO, il existe des molécules qui se fixent à la GCs et l'activent et ce indépendamment de la relâche de NO. Il existe deux types de molécules, les stimulateurs et les activateurs de la GCs. Les stimulateurs se fixent à la forme réduite (groupement hème réduit) de la GCs tandis que les activateurs lient la forme oxydée. L'administration simultanée d'un stimulateur de la GCs avec un donneur de NO ou tout autre substance provoquant la relâche de NO entraîne un effet synergique sur la réponse vasodilatatrice [166]. Contrairement aux donneurs de NO, ces molécules ne provoquent pas de tolérance [140] et leurs effets ne sont pas dépendants de leur biotransformation [167].

### Autres modulateurs

La modulation tant endogène qu'exogène de la voie du NO est complexe. La participation directe ou indirecte d'un grand nombre de substances telles que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (iECA), certaines statines, les inhibiteurs des canaux calciques (BCC) de type dihydropyridine et les  $\beta$ -bloqueurs comme le nébivolol en sont la preuve.

#### iECA

Les iECAs sont prescrits dans le traitement de l'hypertension artérielle pour diminuer les taux d'AngII qui est un puissant vasoconstricteur. L'AngII et la BK sont toutes deux contrôlées par la ACE (*angiotensin-converting enzyme*) [168]. Lorsque la ACE est active, il y a plus de conversion d'AngI en d'AngII, mais moins de BK, car la ACE la dégrade. La BK est un stimulateur important de la voie du NO, donc diminuer sa

dégradation en inhibant la ACE aurait des effets bénéfiques au niveau vasculaire [169, 170]. De plus, l'AngII active la NADPH oxydase, enzyme responsable de la formation de l'anion superoxyde. Elle contribue donc à l'augmentation du stress oxydatif et à la diminution de la biodisponibilité du NO par la formation de peroxynitrite [171]. Cet effet néfaste sur la voie du NO est diminué par l'administration d'iECA [172, 173].

### Statines

Les statines forment une famille de médicaments servant à diminuer le cholestérol en inhibant l'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG CoA réductase). En plus de diminuer l'incidence d'évènements cardiovasculaires ainsi que la mortalité, les statines sont capables d'augmenter l'expression et l'activité de la eNOS [174]. En effet, elles améliorent la vasodilatation, réduisent l'inflammation vasculaire et diminuent l'agrégation plaquettaire [173, 175]. Tous ces effets sont en partie reliés à eNOS étant donné que l'administration d'un inhibiteur, le L-NMMA (N<sup>o</sup>-monométhyl-L-arginine), bloque ces effets [176, 177]. De plus, de par leur capacité à inhiber l'isoprénylation de Rac1, sous-unités de la NADPH oxydase, les statines permettent de réduire la production d'anions superoxydes et ainsi de rétablir l'équilibre vasculaire [178, 179].

### Dihydropyridines

Les BCC, plus précisément les bloqueurs des canaux calciques de type dihydropyridine, sont utilisés depuis plusieurs années dans le traitement de l'hypertension et l'angine [180]. Ils inhibent les canaux calciques de type L au niveau du muscle lisse. Ils empêchent donc l'entrée de calcium dans les cellules et provoquent une vasodilatation [139]. Les dihydropyridines peuvent également induire la relâche de NO au niveau des cellules endothéliales [180]. En effet, les BCC augmenteraient l'expression de la eNOS et l'activité d'une enzyme antioxydante, la superoxyde dismutase (SOD) [181, 182]. L'action

antioxydante de la SOD augmente la biodisponibilité du NO en diminuant l'anion superoxyde. En effet, la SOD transforme l' $O_2^-$  en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  [183].

### Néбиволол

Les  $\beta$ -bloqueurs sont utilisés depuis plus de 40 ans dans le traitement de l'hypertension [184]. Le néбиволол est un  $\beta$ -bloqueur de troisième génération qui est très sélectif pour les récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques. En plus de ses effets bénéfiques dans l'insuffisance cardiaque [185], le néбиволол est capable de réduire la résistance périphérique et même de renverser la dysfonction endothéliale chez des patients hypertendus [186]. Cette particularité du néбиволол est due à sa capacité d'induire la production de NO. En effet, il augmente l'activité de la eNOS via une activation des récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques au niveau des cellules endothéliales [187]. En plus de la stimulation de la synthèse de NO, le néбиволол a des propriétés antioxydantes [188] et diminue les taux d'ADMA (*asymmetric dimethylarginine*), analogue endogène de la L-arginine qui bloque la eNOS [189]. De par son action directe sur l'anion superoxyde, le néбиволол diminue le stress oxydatif et la formation de peroxyde d'azote [190]. Il augmente donc la production de NO par l'activation de la eNOS et il augmente sa biodisponibilité en réduisant le stress oxydatif.

### Inhibiteur des NOS

Il existe plusieurs types d'inhibiteurs des NOS dont la plupart agissent au site actif de l'enzyme. Il y a les inhibiteurs ne dérivant pas des acides aminés, les ligands de l'hème et les plus utilisés, les analogues de la L-arginine. Les études sur les NOS ont été facilitées par l'identification du L-NMMA comme étant un inhibiteur compétitif des NOS, mais avec par contre, peu de sélectivité [191]. Depuis, beaucoup d'autres inhibiteurs ont été développés dans le but d'obtenir une plus grande affinité pour les NOS ou avoir une meilleure sélectivité pour une isoforme en particulier [62]. Un dérivé de la L-arginine, le L-NAME est fréquemment utilisé comme inhibiteur non sélectif, même si les études rapportent qu'il serait sélectif pour les formes constitutives, soient la nNOS et la eNOS



[192-194]. Le iminoéthyl-L-lysine (L-NIL) est un puissant inhibiteur possédant une grande sélectivité pour la forme inductible des NOS (iNOS) [195]. Faisant partie des inhibiteurs non acides aminés, l'aminoguanidine (AG) et le 1400W inhibent efficacement et sélectivement la iNOS [196, 197]. Finalement, certaines molécules ont la capacité de fixer le groupement hème de l'enzyme, groupement essentiel à l'oxydation de la L-arginine et à la production de NO. Ainsi, le 7-nitroindazole (7-NI) est un bon inhibiteur avec une sélectivité pour la nNOS [198]. Malgré leur mode d'action différent, l'utilisation des inhibiteurs des NOS diminue la production de NO et conséquemment augmente la résistance périphérique et la pression artérielle [199]. Voici deux tableaux rassemblant quelques inhibiteurs avec leur efficacité d'inhibition exprimée en terme de la concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'effet (IC<sub>50</sub>) dans l'un (tableau 1) et leur sélectivité relative dans l'autre (tableau 2).

**Tableau 1: Affinité des inhibiteurs pour les différentes NOS.**

Adapté [58].

Composé	Type d'inhibiteur	IC <sub>50</sub> pour nNOS (µM)	IC <sub>50</sub> pour eNOS (µM)	IC <sub>50</sub> pour iNOS (µM)
L-NMMA (N-méthyl-L-arginine)	Analogue de la L-Arg	4,9	3,5	6,6
L-NNA (N-nitro-L-arginine) et L-NAME	Analogue de la L-Arg	0,29	0,35	3,1
L-NIL (iminoéthyl-L-lysine)	Analogue de la L-Arg	37	49	1,6
AG (aminoguanidine)	Non acide aminé	170	330	31
1400W N-(3-(aminométhyl)benzyl)acetamide)	Non acide aminé	7,3	1000	0,23
7-NI (7-nitroindazole)	Ligand de l'hème	8,3	11,8	9,7

**Tableau 2: Sélectivité relative des NOS.**

Adapté [58].

Composé	Type d'inhibiteur	iNOS vs nNOS	iNOS vs eNOS	nNOS vs eNOS
L-NMMA (N-méthyl-L-arginine)	Analogue de la L-Arg	0,7	0,5	0,7
L-NNA (N-nitro-L-arginine) et L-NAME	Analogue de la L-Arg	0,09	0,11	1,2
L-NIL (iminoéthyl-L-lysine)	Analogue de la L-Arg	23	49	1,3
AG (aminoguanidine)	Non acide aminé	5,5	11	1,9
1400W N-(3-(aminométhyl)benzyl)acetamidine)	Non acide aminé	32	>4000	>130
7-NI (7-nitroindazole)	Ligand de l'hème	0,9	1,2	1,4

### c. Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

En plus du NO, l'endothélium libère une seconde molécule dépendante de l'Ach. En effet, la découverte de cette substance, qui relaxe le muscle lisse de la paroi vasculaire en ouvrant des canaux potassiques et en hyperpolarisant la membrane plasmique, s'est fait lors de l'inhibition de synthèse du NO et de la COX suite à une stimulation à l'Ach [200]. L'identité réelle de l'EDHF suscite encore la controverse. Plusieurs molécules telles que le CNP (*C-type natriuretic peptide*), l'anandamide, les EETs (acides époxyeicosatriénoïques), l'ion potassique et le peroxyde d'hydrogène ont été proposées pour être l'EDHF [201]. Deux substances semblent plus importantes, soit les molécules de la familles des EETs [202, 203] et l'ion potassium [204-206].

### i. EET

Tout comme la prostacycline, les EET sont synthétisées à partir de l'AA dans les cellules endothéliales. L'enzyme responsable de leur formation est l'époxygénase du cytochrome P450. Leur action d'hyperpolarisation de la membrane des CMLVs passe par l'ouverture de canaux potassiques activés par le calcium ( $K_{Ca}$ ). Cette hyperpolarisation inhibe les canaux calciques voltage-dépendants entraînant une diminution des concentrations de calcium intracellulaires et conséquemment une relaxation des cellules par une inhibition de la MLCK. Tout comme plusieurs substances vasodilatatrices ( $PGI_2$ , adrénaline, histamine), le récepteur de l'EDHF serait couplé à une protéine Gs. Cependant, la voie enzymatique utilisée pour la transduction du signal n'est pas encore connue [202]. En plus de l'Ach, l'EDHF serait également activé par la bradykinine ainsi que par les forces de cisaillements et serait impliqué dans des fonctions autres que la vasodilatation. En effet, il stimulerait l'angiogénèse, inhiberait l'agrégation plaquettaire et l'expression de certaines molécules d'adhésion au niveau des cellules endothéliales [207-209].

### ii. Ion potassium ( $K^+$ )

L'augmentation des concentrations extracellulaires d'ions potassium aurait également une action hyperpolarisante au niveau des CMLVs. Son effet a été étudié au niveau des jonctions gap qui relient les cellules entre elles. Suite à un stimulus comme les forces de cisaillement et la liaison de l'Ach, il y a une entrée de calcium au niveau des cellules endothéliales. Cette augmentation intracellulaire de calcium active l'ouverture des canaux potassiques dépendant du calcium ( $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$ ) au niveau des cellules endothéliales et provoque une sortie de potassium [201]. Cette hausse de potassium extracellulaire entraîne une relaxation des CMLVs par l'activation des canaux potassiques  $K_{IR}$  [210] et de la pompe  $Na^+/K^+$  ATPase [211].

L'EDHF contribuerait davantage que le NO à la vasodilatation dépendante d'un agoniste dans les petits vaisseaux tandis que le NO prédominerait dans les grosses artères [3].

#### *d. Thromboxane A<sub>2</sub>*

Le TXA<sub>2</sub> est un puissant vasoconstricteur et un agent thrombotique. Tout comme le PGI<sub>2</sub>, il est synthétisé à partir de l'AA qui est, par la suite, transformé en PGG<sub>2</sub> puis en PGH<sub>2</sub> sous l'effet de la COX. Finalement, la thromboxane synthase transforme la PGH<sub>2</sub> en TXA<sub>2</sub> [2]. Il est synthétisé au niveau des cellules endothéliales et provoque, une fois lié à son récepteur TP au niveau des CMLVs une vasoconstriction en augmentant la synthèse d'IP<sub>3</sub> et conséquemment la hausse des taux de calcium intracellulaires [48] (figure 5). Par contre, bien que le TXA<sub>2</sub> soit produit par les cellules endothéliales, il est principalement synthétisé par les plaquettes et est impliqué dans l'agrégation plaquettaire. Il active les plaquettes de façon autocrine en se fixant à son récepteur TP [3, 212].

#### *e. Endothéline*

L'endothéline est le plus puissant vasoconstricteur connu à ce jour [213]. Cette famille comporte trois membres, l'ET-1, l'ET-2 et l'ET-3 qui diffèrent entre elles que par quelques acides aminés [214]. L'ET est constituée d'une chaîne de 21 acides aminés (a.a.) formant une boucle grâce à deux ponts disulfures formés par les quatre Cys de la chaîne [215]. Avant d'arriver à sa forme mature, l'ET est synthétisée sous forme de préproendothéline (préproET) contenant 212 a.a. La préproET est convertie en proET suite au clivage de la séquence de sécrétion puis sous l'action d'une enzyme de type furine, la proET est transformée en big ET, peptide de 38 a.a. Finalement, l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) convertit la big ET en ET [216-218]. Cette protéine a été découverte à l'origine dans les cellules endothéliales, mais il est maintenant connu qu'elle est exprimée ailleurs dans l'organisme. En effet, l'ET-1 est produite dans les cellules

épithéliales des poumons, les macrophages, les fibroblastes, les cardiomyocytes, les hépatocytes, les cellules du tubule collecteur au niveau du rein et les neurones, mais elle est produite majoritairement dans les cellules endothéliales [219]. Sa relâche est stimulée par plusieurs facteurs, dont le TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ), l'AngII, l'AVP et les catécholamines [220]. Au niveau de l'endothélium, l'ET-1 est stimulée par la hausse de pression ainsi que par la réduction des forces de cisaillement alors qu'elle est inhibée par une baisse de pression et une hausse des forces de cisaillement [221].

Une fois synthétisée, l'ET induit ses multiples effets par l'intermédiaire de deux récepteurs à sept domaines transmembranaires, le récepteur ET<sub>A</sub> et le récepteur ET<sub>B</sub>. Dans plusieurs tissus, ces récepteurs, couplés à une protéine G<sub>q</sub>, induisent la contraction, la prolifération ainsi que l'hypertrophie cellulaire. Au niveau vasculaire, les ET<sub>A</sub> sont situés au niveau des CMLVs et les ET<sub>B</sub> se retrouvent à la fois au niveau des CE et au niveau des CMLVs. Dans les CMLVs, l'ET-1 provoque une vasoconstriction par une mobilisation du calcium intracellulaire suite à l'ouverture de canaux calciques membranaires et sarcoplasmiques sensibles à l'IP<sub>3</sub> ainsi que l'activation de la PKC (figure 5). Afin de contrecarrer la constriction induite par le récepteur ET<sub>A</sub>, l'ET-1 peut également se lier au récepteur ET<sub>B</sub> des CE et produire une vasodilatation par la stimulation de synthèse de NO et de PGI<sub>2</sub> [221]. Cette relâche de NO induite par l'ET peut également mener à l'inhibition de l'expression de celle-ci. L'inhibition se ferait au niveau de la transcription de l'ARNm (acide ribonucléique messenger) de la préproET par un mécanisme dépendant du GMPc [222, 223]. Il a été question précédemment que l'augmentation des forces de cisaillement diminue l'ET. Cette diminution serait due à l'augmentation du NO suite à une stimulation par les forces de cisaillement [224]. La rétroaction négative de l'ET n'est probablement pas seulement due au NO. La prostacycline ainsi que l'EDHF pourraient également intervenir dans l'inhibition de l'ET [225, 226]. En plus de stimuler la vasoconstriction et l'hypertrophie, l'ET, via son récepteur ET<sub>A</sub> augmente le stress oxydatif en stimulant la NADPH oxydase. [221].

*f. ROS et stress oxydatif*

Le contrôle du tonus vasculaire dépend d'une multitude de substances qui ont des effets opposés. Il existe un équilibre entre les substances vasodilatatrices et vasoconstrictrices au niveau de la paroi vasculaire, mais lorsque ce fragile équilibre est rompu, il y a développement de pathologies telles que l'hypertension et l'athérosclérose [227, 228]. De par ses nombreux effets protecteurs sur la paroi, le NO est une substance essentielle à la santé vasculaire, mais de par sa nature chimique, il est aussi très vulnérable. En effet, la production et la disponibilité du NO sont dépendants de plusieurs facteurs qui, lorsque défectueux, mènent à un phénomène appelé dysfonction endothéliale [183]. Cette dernière est un événement précoce dans le développement des maladies vasculaires [229].

La disponibilité du NO dépend de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*). Physiologiquement, la présence d'enzymes antioxydantes comme la SOD, la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase permet de maintenir la disponibilité du NO. Par contre, un débalancement entre la production de NO et celle des ROS, mène à une dysfonction endothéliale par une augmentation du stress oxydatif. Les ROS sont produits par une grande variété d'enzymes incluant la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, la COX, la eNOS découplée, la lipoxigénase, la glucose oxydase et la chaîne mitochondriale de transport d'électrons. Au niveau des cellules endothéliales et des CMLVs, ces enzymes produisent de l'anion superoxyde qui pourra être, par la suite, transformé en d'autres espèces comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyl (OH) et le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) [183]. Parmi toutes ces enzymes, la NADPH oxydase est la plus importante ainsi que la seule à produire directement de l'anion superoxyde. Il existe sept isoformes de NADPH oxydase dont les isoformes NOX-1, 2, 4 et 5 qui sont présentes au niveau vasculaire. La plupart des isoformes sont associées à des protéines régulatrices comme p22<sup>phox</sup> qui stabiliserait NOX à la membrane et Rac1. D'autres comme NOX-2 contiennent d'autres sous-unités comme p67<sup>phox</sup> (sous-unité activatrice), p40<sup>phox</sup> et p47<sup>phox</sup>. D'ailleurs, cette isoforme ainsi que la NOX-4 seraient responsables de la production basale

d'anions superoxyde en conditions physiologiques [230]. En plus de l' $O_2^-$ , la NOX-4 produirait du  $H_2O_2$  [231, 232]. En conditions pathologiques, la NOX-1, forme inductible exprimée dans les CMLVs, ainsi que la NOX-2 sont augmentées tandis que la NOX-4 n'est pas modulée [233, 234]. Cette augmentation de stress oxydatif pousse la eNOS à produire de l'anion superoxyde suite à l'inactivation du  $BH_4$  par les ROS et ainsi à augmenter davantage le stress oxydatif [119, 235]. La capacité de la eNOS à produire à la fois du NO et du  $O_2^-$  diminue sa disponibilité étant donné que le peu de NO généré sera utilisé pour former du peroxyde nitrite [118, 121].

Au niveau de l'endothélium, il existe également un équilibre entre la composante vasodilatatrice (EDRF) et la composante vasoconstrictrice (EDCF, *endothelial-derived contracting factors*). Il est certain que les cellules endothéliales produisent des composés vasoconstricteurs comme l'ET et l'AngII (conversion), mais leur relâche ne provoque pas de changements instantanés du tonus vasculaire. Une étude réalisée au début des années 80 a montré que l'administration d'acide arachidonique et de thrombine augmente la contraction des veines chez le chien au lieu de produire une relaxation [236]. Par la suite, d'autres études ont montré que cette vasoconstriction est due à une ou des substances générées par la COX-1 endothéliale [237-239], soient les prostanoïdes comme les endoperoxydes ( $PGH_2$ ), la  $PGI_2$ , le  $TXA_2$  et la  $PGE_2$  [237]. En situation normale, la prostacycline induit une vasodilatation en se liant à son récepteur IP [240]. Par contre, lors du vieillissement [241] ainsi que dans certaines pathologies comme l'hypertension [242], il y a une réduction importante, même une abolition de l'expression du récepteur IP [243]. Ainsi, malgré une faible affinité pour le récepteur TP [242], la prostacycline, tout comme la  $PGH_2$ , le  $TXA_2$  et la  $PGE_2$  induisent une vasoconstriction en se fixant à ce récepteur au niveau des CMLVs [244, 245]. La stimulation du récepteur TP provoque l'entrée de calcium dans les CMLVs par l'intermédiaire des ROCs et des canaux calciques voltage-dépendants [246, 247]. De plus, des études ont montré que les ROS amplifient l'effet vasoconstricteur des EDCF en diminuant la disponibilité du NO [248, 249], mais peuvent agir directement sur les CMLVs (diffusion ou passage par les jonctions gap) et stimuler la

COX à produire des prostanoïdes qui activeraient le récepteur TP [250]. Les ROS seraient donc eux mêmes des EDCF. Contrairement aux résultats de certaines études [251, 252], le médiateur pour contracter les vaisseaux serait le peroxyde d'hydrogène et non l'anion superoxyde. Il a la capacité de diffuser à travers les membranes et d'aller stimuler les COX au niveau des CMLVs [253, 254], ce que l'anion superoxyde n'a pas le temps de faire étant donné son temps de demi vie extrêmement court [237].

## 2.2. Rigidité artérielle

Le terme rigidité artérielle a une connotation pathologique. Cependant, physiologiquement, les artères ont toutes une certaine rigidité qui dépend de plusieurs facteurs tels que l'épaisseur de la paroi et le rayon du vaisseau [255]. Ainsi, lorsque le sang sort du cœur durant la systole, il produit une onde le long de la paroi vasculaire. Cette onde se déplace à une certaine vitesse qui est dépendante des facteurs mentionnés précédemment. Lorsque l'onde de pouls générée par le cœur rencontre une résistance, elle produit une autre onde en sens inverse. La réflexion de l'onde de pouls survient physiologiquement le long de l'arbre vasculaire. En effet, plus on s'éloigne du cœur, plus la paroi vasculaire est rigide en raison d'une réduction des taux d'élastine et du diamètre des artères. Ainsi, puisque le rapport collagène/élastine augmente du cœur vers la périphérie, de par sa forte proportion de fibres élastiques, l'aorte est plus compliant que les artères musculaires qui contiennent moins d'élastine et plus de cellules musculaires lisses.

Il est difficile de parler de rigidité artérielle sans parler de pression pulsée. En effet, la PP est un paramètre qui permet d'exprimer les fluctuations de pression au cours d'un cycle cardiaque. Elle est la différence entre la pression au cours de la systole (PS) et la pression en fin de diastole (PD). Elle dépend beaucoup de la rigidité artérielle, mais également de l'éjection ventriculaire et de la réflexion de l'onde pulsatile [256]. De plus, l'influence de la rigidité artérielle sur la PP est incorporée dans le concept d'impédance. C'est une mesure de tous les facteurs qui limitent l'écoulement du sang [257]. Tout comme



la rigidité artérielle, l'impédance augmente graduellement, et ce de manière physiologique, le long de l'arbre artérielle en raison de la hausse du rapport collagène/élastine et de la diminution du diamètre des vaisseaux à mesure que le sang s'éloigne du cœur [258].

Ainsi, chez des sujets jeunes, la réflexion de l'onde de pouls survient au moment de la diastole, car l'onde de pouls se déplace lentement. Par contre, chez des sujets âgés, l'aorte est plus rigide provoquant une augmentation de la vitesse de l'onde de pouls (*pulse wave velocity*, PWV) et conséquemment l'onde réfléchie arrive en même temps que la systole. Ceci se traduit par une baisse de la PD et une hausse de la PS due à la réflexion de l'onde de pouls ainsi qu'à l'accroissement de l'impédance aortique. Ces modifications de pression entraîne conséquemment une hausse de la PP.

### **2.2.1. Facteurs endothéliaux influençant la rigidité artérielle**

En plus de contrôler le tonus vasculaire, certains facteurs endothéliaux comme le NO, l'ET-1, l'EDHF et la PGI<sub>2</sub> influencent la rigidité artérielle ou la compliance. La compliance représente la capacité d'une artère à se dilater sous l'effet de la pression. Plus une artère est compliant et plus elle se dilate. Au contraire, la rigidité artérielle est une perte de compliance due à plusieurs facteurs tels un déséquilibre entre les composantes élastiques de la paroi et les composantes plus rigides comme le collagène, la fragmentation des fibres élastiques et leur calcification ainsi que l'augmentation du tonus vasculaire [259].

Le NO est le facteur le plus important dans le contrôle aigu de la rigidité. Qu'il soit produit de façon basale, stimulé par l'Ach ou administré de façon exogène, le NO diminue la rigidité artérielle. Par contre, lorsque les vaisseaux sont privés de leur endothélium, la rigidité est augmentée [260]. Il est possible d'observer des effets similaires en diminuant la production de NO par perfusion de L-NMMA ou de L-NAME. Ceux-ci augmentent certains indices de rigidité artérielle comme l'indice d'augmentation (Aix) et le PWV [261, 262]. Des études chez l'homme ont également montré une altération de la compliance par l'administration de L-NAME [257] et de L-NMMA [263, 264]. L'administration de

donneurs de NO comme la NTG et le nébivolol diminue le PWV [265-267]. Ils rétablissent même la dysfonction endothéliale [186, 268]. L'ET est également très important dans la régulation de la rigidité artérielle, mais contrairement au NO, sa présence l'augmente [269]. L'inhibition de ET-1 par un inhibiteur de son récepteur ET<sub>A</sub> permet de diminuer le PWV. Une étude chez des patients souffrants de maladies coronariennes a montré que les taux circulants d'ET-1 corrélaient bien avec la rigidité artérielle [270]. Toutefois, des études récentes ont montré que les taux circulants d'ET-1 ne reflètent pas sa production tissulaire [271, 272]. Finalement, dans une moindre mesure l'EDHF et la PGI<sub>2</sub> influencent la rigidité artérielle. Une étude montre que les patients souffrant de résistance à l'insuline ont une augmentation compensatoire du NO et d'EDHF dans les premiers stades de la maladie provoquant une diminution de la rigidité artérielle [273]. La PGI<sub>2</sub> est un agent vasodilatateur qui, en plus de relaxer les vaisseaux, peut également diminuer la rigidité artérielle. Un analogue synthétique de la prostacycline, le beraprost, prévient l'augmentation du PWV chez des patients ayant eu un infarctus cérébral [274].

### **2.2.2. Méthodes de mesure de la rigidité artérielle**

Contrairement aux expérimentations animales, la mesure de la rigidité chez l'homme ne peut pas se faire par des méthodes invasives. Il a été développé, au cours des années, des méthodes non-invasives qui permettent d'évaluer indirectement la rigidité artérielle. Il existe plusieurs méthodes qui mesurent soit le temps de transit des ondes vers la périphérie comme le PWV, soit des estimations directes de la rigidité par des mesures du diamètre des vaisseaux en fonction de la pression. Le PWV semble représenter de plus en plus le marqueur de choix pour l'évaluation de la rigidité artérielle, certains même le décrivent comme étant l'étalon or (*gold standard*) pour la mesure de la rigidité artérielle [255]. En effet, il est accepté comme étant la méthode non-invasive la plus simple et la plus reproductible. En 2006, un groupe d'experts s'est penché sur une standardisation de la mesure du PWV afin qu'il puisse être efficacement utilisé en clinique pour la prévention et le traitements des maladies cardiovasculaires. Les valeurs normales de PWV chez

l'homme en santé varient entre 4 et 5 m/s dans l'aorte ascendante, 5 et 6 m/s dans l'aorte abdominale et augmente à 8-9 m/s dans les artères iliaques et fémorales [275]. De plus, plusieurs études ont montré que la mesure du PWV est une valeur prédictive indépendante pour la mortalité cardiovasculaire dans la population en générale, chez les gens hypertendus et les personnes âgées de plus 70 ans, mais aussi chez des gens souffrant d'insuffisance rénale et de diabète [276]. Certaines études ont même montré que son augmentation était associée à une hausse de la mortalité cardiovasculaire. En effet, Blacher et al. ont montré qu'un PWV supérieur à 13 m/s était associé à une augmentation de la mortalité cardiovasculaire [277] alors que l'équipe de Laurent a montré, chez des patients hypertendus, qu'une hausse de la rigidité artérielle de 5 m/s est associée à une augmentation de 50% de la mortalité cardiovasculaire [278]. Avec ces études, il était nécessaire d'établir des balises. Ainsi, la détermination de la rigidité artérielle telle que mesurée par le PWV entre la carotide et la fémorale a été recommandée par le guide 2007 de la Société européenne/internationale d'hypertension (*2007 Guidelines for the Management of Hypertension*) afin d'évaluer les dommages artériels et les niveaux de risques cardiovasculaires. Les auteurs de ce guide ont également suggéré une valeur seuil de PWV >12 m/s servant à estimer les altérations de la fonction aortique chez les patients hypertendus [279]. Toutefois, chez des gens en bonne santé, la validité de cette valeur seuil de PWV reste encore à être déterminée. Une valeur seuil propre à cette population devrait être établie [280].

Malgré que la mesure du PWV soit très répandue, son utilisation est limitée par des difficultés à estimer le temps d'arrivée de l'onde à l'autre extrémité ainsi que par la nécessité de faire des mesures simultanément à différents endroits et d'avoir une grande distance entre deux points afin d'obtenir des résultats valables [281]. La plupart des paramètres sont mesurés à l'aide de techniques d'écho-doppler pour déterminer le diamètre, le volume et l'épaisseur de la paroi ainsi que la tonométrie pour mesurer les pressions [276]. Le tableau suivant résume les différents paramètres et méthodes utilisés pour mesurer la rigidité artérielle [282, 283].

**Tableau 3: Paramètre de mesure de la rigidité artérielle.**

Adapté de [282, 283].

Paramètre	Définition	Équation
Vitesse de l'onde de pouls (PWV)	Vitesse de parcours de l'onde de pression le long d'un segment artériel défini.	$PWV = \text{distance} / \Delta\text{temps}$ (cm/s)
Pression pulsée (PP)	Différence entre la PS et la PD	$PP = PS - PD$ (mmHg)
Indice de rigidité $\beta$	Rapport entre la pression et le changement relatif de diamètre.	$\beta = [\ln (PS / PD)] / [(D_{\text{syst}} - D_{\text{diast}}) / D_{\text{diast}}]$
Indice d'augmentation (AIx)	Proportion de la PP résultant de l'onde de réflexion.	$AIx = (\Delta P / PP) \times 100$
Impédance ( $Z_c$ )	Rapport entre le changement de pression et le débit sanguin. Dépend du D des vaisseaux, de la rigidité artérielle et des ondes de retour.	$Z_c = PP / Q$ (mmHg/cm/s)
Compliance artérielle (CA)	Rapport entre le changement de diamètre du vaisseau ou de volume sanguin et le changement de pression.	$CA = \Delta D / \Delta P$ ou $\Delta V / \Delta P$ (cm ou cm <sup>2</sup> /mmHg)
Compliance artérielle systémique (CAS)	Rapport entre le volume d'éjection et la pression pulsée.	$CAS = VE / PP$
Distensibilité artérielle (DA)	Relation entre la fraction de changement de compliance et le changement de diamètre correspondant.	$DA = \Delta D / (\Delta P \times D)$ (mmHg <sup>-1</sup> )
Module élastique (E)	Rapport entre la déformation du vaisseau et la force requise pour la produire. L'inverse de la DA.	$E = (\Delta P \times D) / \Delta D$ (mmHg)

D = diamètre; V = volume; syst = systolique; diast = diastolique

L'augmentation de la rigidité artérielle fait partie du processus de vieillissement. La diminution de la compliance provoque une augmentation de la pression systolique et une diminution de la pression diastolique, caractéristiques associées à l'hypertension systolique isolée.

### **3. Pathologie du système cardiovasculaire**

#### **3.1. Hypertension artérielle**

L'hypertension artérielle est le terme général pour parler d'une pression qui est anormalement élevée. Les valeurs normales de pression sont de 120 mmHg pour la pression systolique et de 80 mmHg pour la pression diastolique. L'hypertension artérielle présente plusieurs grades dont celui de normal élevé qui est caractérisé par des valeurs se situant entre 130-139 mmHg pour la pression systolique et 85-89 mmHg pour la pression diastolique, donc au-delà de ces valeurs, c'est une hypertension artérielle [284].

L'hypertension artérielle est une pathologie sournoise puisque la majorité des gens qui en souffrent ne le savent pas et une hypertension non traitée augmente les risques de maladies cardiovasculaires. L'hypertension artérielle est également une maladie importante puisqu'environ 50% des personnes âgées de plus de 60 ans ont une pression artérielle supérieure à 140/90 mmHg et l'incidence augmente avec l'âge. Il est donc important de diagnostiquer et de traiter adéquatement l'hypertension afin de réduire la mortalité et la morbidité [285].

#### **3.2. Types d'hypertension artérielle**

Il existe deux grandes classes d'hypertension : l'hypertension systolo-diastolique et l'hypertension systolique isolée (HSI).

L'hypertension systolo-diastolique se caractérise par une augmentation à la fois de la pression systolique et diastolique. Dans cette classe d'hypertension, il y a l'hypertension essentielle ou primaire et l'hypertension secondaire.

L'hypertension essentielle est la forme d'hypertension la plus commune. Elle est qualifiée d'essentielle car les véritables causes de son apparition ne sont pas connues. Ainsi, plus de 90% des cas d'hypertension sont de causes inconnues, mais il a été rapporté qu'une composante génétique pourrait jouer dans le développement de l'hypertension. Il ne faut pas non plus négliger l'hygiène de vie et ses facteurs associés tels que l'obésité, la résistance à l'insuline, la sédentarité, la consommation de grandes quantités d'alcool, la consommation de sel et le stress [286, 287]. Elle affecte de 20 à 35% de la population adulte dans les pays industrialisés ainsi que dans les pays en voie de développement. Cette proportion grimpe à environ 70% chez les personnes âgées de plus de 70 ans [288].

Comme il a été mentionné dans la section traitant de la régulation de la pression artérielle, celle-ci dépend du débit cardiaque (Q) et de la résistance périphérique (R). La hausse de pression est la conséquence de l'augmentation de l'un et/ou de l'autre de ces paramètres. Selon le stade de développement de l'hypertension, les paramètres ne réagissent pas de la même façon. En effet, lors de l'établissement de la maladie (stades précoces) le débit cardiaque est augmenté, mais la résistance périphérique est légèrement sous la normale. Par contre, lorsque l'hypertension est bien installée, le débit cardiaque est normal et la résistance périphérique est augmentée. Cette augmentation de résistance périphérique provoque une hausse des pressions systolique et diastolique.

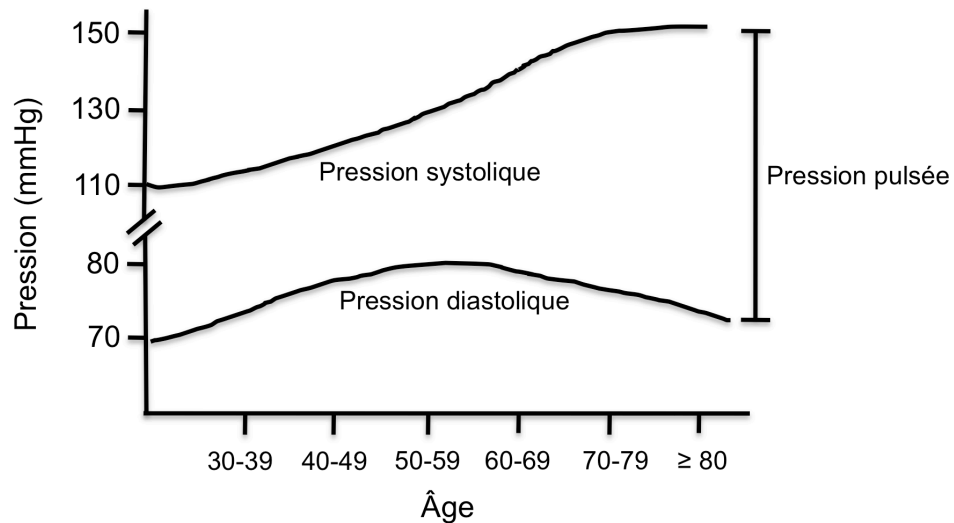
L'hypertension systolo-diastolique peut également être secondaire. Elle porte ce nom étant donné qu'elle est la conséquence d'une autre pathologie ou dans certains cas, elle se produit durant la grossesse. Les causes les plus communes sont :

- L'hyperaldostéronisme (syndrome de Conn) causé par une tumeur au niveau des glandes surrénales (cortex). L'excès d'aldostérone entraîne une rétention excessive

de sodium et d'eau ainsi qu'une excrétion de potassium et de protons. La rétention sodique entraîne une hausse du volume sanguin et par conséquent une élévation de la pression artérielle.

- La sténose unilatérale ou bilatérale d'une artère rénale entraîne une baisse de la perfusion du rein qui provoque une activation du système rénine angiotensine suivie d'une augmentation de la résistance et du volume sanguin.
- Le phéochromocytome (hyperplasie de la glande surrénale) est une tumeur sécrétant des catécholamines qui provoquent une activation des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques et, par conséquent, l'augmentation de la résistance par une vasoconstriction.
- La pré-éclampsie est la forme la plus courante d'hypertension secondaire. C'est une ischémie placentaire qui cause la relâche de facteurs provoquant une dysfonction endothéliale et une vasoconstriction [3].

L'hypertension systolique isolée se caractérise, quant à elle, par une augmentation de la pression systolique, par contre la pression diastolique change peu et a même tendance à diminuer légèrement. En effet, la pression systolique doit être égale ou supérieure à 140 mmHg et la pression diastolique doit être égale ou inférieure à 90 mmHg [284]. Ainsi, la pression pulsée, qui est la différence entre la pression systolique et la pression diastolique, est augmentée, tandis que la pression moyenne demeure la même. Avec l'âge, les pressions systolique et diastolique augmentent, mais vers l'âge de 50 ans, il y a une dissociation entre les deux pressions et la pression diastolique se met alors à diminuer [289]. C'est pour cette raison que la prévalence de l'HSI augmente avec l'âge (Figure 9). Des études ont montré que les risques cardiovasculaires associés à une pression systolique élevée sont plus importants que ceux associés à une pression diastolique accrue [290, 291].



**Figure 9:** Évolution des pressions systolique et diastolique et pulsée dans le vieillissement.

Adapté de [289].

### 3.3. Épidémiologie de l'hypertension systolique isolée

Avec le faible taux de natalité et l'espérance de vie qui augmente, la population vieillit. Ainsi les sociétés occidentales ont vu accroître leur population dans la tranche d'âge des 65 ans et plus. Sa proportion par rapport à la population totale est passée de 6,9 à 12% dans les pays développés [292]. Avec le vieillissement de la population, le portrait de l'hypertension change, surtout avec l'augmentation des cas d'hypertension systolique isolée. Dans une étude de Framingham, en tenant compte de tous les patients hypertendus, 57,4% des hommes et 65,1% des femmes âgés de plus de 65 ans souffraient d'HSI comparativement à 30,3% des hommes et 27,7% des femmes souffrant d'hypertension systolo-diastolique. Elle est donc la forme d'hypertension la plus répandue chez les personnes âgées de plus de 65 ans, mais malgré cela, son traitement demeure encore sous optimal [293, 294]. Un sondage du *National Health and Nutrition Examination* montre que trois personnes sur quatre souffrant d'hypertension est âgées de 50 ans et plus. De ce



nombre, c'est 80% des gens souffrant d'HSI qui ne sont pas adéquatement traités ou même, pas traités du tout [295]. Cette difficulté vient du fait que la PD a été longtemps le critère principal pour le diagnostic d'hypertension ainsi que la cible de choix pour diminuer la pression. Les médicaments actuels diminuent préférentiellement la PD et ont ainsi très peu d'effet sur la PP [296, 297], même que dans certains cas ils aggravent la situation en augmentant la PP [298, 299].

### **3.4. Étiologie de l'hypertension systolique isolée**

L'hypertension systolique isolée est le résultat de changements complexes au niveau de la paroi vasculaire qui sont associés au vieillissement. Ces modifications surviennent surtout au niveau des grosses artères comme l'aorte. L'épaississement de la paroi, la dilatation des artères élastiques, la dysfonction endothéliale ainsi que la rigidité artérielle sont les changements majeurs observés avec l'âge [300, 301]. Le tableau suivant résume les principaux changements qui surviennent au niveau de l'aorte au cours du vieillissement [300].

## Tableau 4 : Changements vasculaires associés au vieillissement

Adapté de [300].

Altérations vasculaires	
•	↑ du diamètre du vaisseau
•	↑ de la rigidité de la paroi
•	↑ de l'épaisseur de la paroi
–	<i>Intima</i>
»	↑ de l'épaisseur : CMLVs et matrice extracellulaire
»	↑ du TGF-β, mais ↓ diminution des effets antiprolifératifs
»	↑ des niveaux et de l'activité des MMPs (métalloprotéinase matricielle)
»	↑ de l'expression de molécules d'adhésion
»	↑ de l'activité de la ACE
–	<i>Média</i>
»	↑ l'épaisseur
»	↑ de la grosseur mais ↓ du nombre de CMLVs
–	<i>Matrice extracellulaire</i>
»	↑ du contenu en collagène
»	↑ des liaisons intermoléculaires ( <i>cross-link</i> ) par glycation non enzymatique
»	↑ de la fibronectine
»	↓ de l'élastine : calcification et fragmentation
»	↑ des glycosaminoglycanes
•	↑ Dysfonction endothéliale
–	<i>Cellules endothéliales :</i>
»	↓ NO, ↑ anion superoxyde, ↑ peroxy-nitrite
»	↑ l'expression de molécules d'adhésion
»	↑ de la perméabilité
»	↑ de l'ET-1

### 3.4.1. Vieillesse vasculaire et rigidité artérielle

Comme résumé dans le tableau précédent, les artères à proximité du cœur comme l'aorte et les carotides subissent différents changements. En effet, l'épaississement de l'intima est dû à la migration des CMLVs et à la synthèse de MEC par celles-ci. Tandis que l'épaississement de la média est provoquée par une accumulation de collagène et de fibronectine ainsi que par l'hypertrophie des CMLVs [300, 302]. Par contre, les artères plus distales comme les artères brachiales et fémorales se modifient très peu avec l'âge. Chez des patients hypertendus ou diabétiques, l'aorte devient plus rigide, mais l'artère brachiale demeure normale ou la rigidité diminue même avec l'âge [303, 304]. Contrairement aux artères musculaires, qui sont peu influencées par ce type de changements liés à l'âge, les artères de conductance, de par la forte proportion en fibres élastiques dans leur paroi, sont très vulnérables aux attaques tant mécaniques que chimiques.

#### 3.4.1.1. Changements de la matrice extracellulaire

Avec le temps, les artères élastiques subissent des changements qui altèrent leur principale propriété, la compliance. Au niveau de la matrice extracellulaire, les deux principales composantes sont le collagène et l'élastine. Au cours du vieillissement, il y a un déséquilibre entre ces deux protéines de structure. Ainsi, les fibres élastiques, composées à 90% d'élastine [305], sont amincies, fragmentées et calcifiées tandis que les CMLVs sécrètent plus de collagène [306].

##### *a. Altération de l'élastine*

###### *i. Dégradation et fragmentation*

En 1976, une étude suggère que l'amincissement et la fragmentation de l'élastine seraient dus à une fatigue progressive des lamelles élastiques associées à l'âge [307]. Une étude plus récente montre que les altérations des fibres élastiques seraient associées aux

effets cumulatifs des cycles cardiaques et de l'âge. Plus le nombre de cycles cardiaques est élevé, plus le nombre de fois que la paroi est étirée est élevé et plus les fibres sont fragmentées et déstructurées [308]. En plus, chez l'adulte, le renouvellement des macromolécules comme l'élastine est lent. En conditions physiologiques, la demi-vie de l'élastine est plus de 40 ans, même que certaines publications parlent de 70 ans [309, 310]. Il serait donc plausible qu'avec l'âge l'élastine se fragilise et se désorganise. D'ailleurs, la fragmentation de l'élastine a été observée dans des modèles animaux de calcification vasculaire. En effet, une étude, utilisant un modèle de calcification vasculaire induit par l'administration de vitamine D et de nicotine, a montré une fragmentation de l'élastine [311]. Dans un modèle de calcification vasculaire médiale induite par la warfarine, en plus d'une augmentation du ratio collagène/élastine [312], il est également possible d'observer une augmentation des bris d'élastine. Par l'administration d'un inhibiteur des MMPs, la doxycycline, la fragmentation de l'élastine a été prévenue, suggérant fortement l'implication des protéines matricielles dans la dégradation de l'élastine [313].

Les études sur les MMPs dans la rigidité artérielle ont mis en évidence trois MMPs : deux gélatinases (MMP-2 et 9) qui dégradent l'élastine et la stromélysine (MMP-3). Une étude clinique chez des patients âgés entre 60 et 76 ans souffrant d'HSI a montré que l'augmentation sérique de la MMP-2 ainsi que la MMP-9 corrèle avec l'élévation du PWV dans l'aorte suggérant son implication dans les mécanismes de rigidité artérielle et le développement de l'HSI [314]. La MMP-9 serait même un important prédicteur du PWV avant l'âge. Cette même équipe a montré l'association entre la MMP-9 et le PWV chez des patients normotendus suggérant que l'élastolyse pourrait être une cause de l'HSI [315]. D'autres ont montré une corrélation positive entre l'activité de la MMP-2 dans l'aorte et l'âge des patients suggérant son implication dans la rigidité artérielle au cours du vieillissement [316, 317]. De plus, des études de génétique ont permis de démontrer un lien entre la MMP-3, la MMP-9 et l'augmentation de la rigidité artérielle. Medley et al. ont mis en évidence un polymorphisme au niveau du promoteur de la MMP-3 (5A/6A). La présence de 5 ou 6 adénines modifie la liaison du facteur de transcription au promoteur.

Ainsi, l'allèle possédant 5 adénines au niveau de son promoteur possède une meilleure activité comparativement à l'allèle possédant 6 adénines. Les patients homozygotes 5A/5A ont donc une expression accrue du gène de MMP-3 et subséquemment une augmentation de l'expression de la protéine. En effet, l'expression génique de la MMP-3 est quatre fois plus grande tandis que les homozygotes 6A/6A voient leur expression génique diminuée d'environ deux fois comparativement aux hétérozygotes. Cette augmentation d'expression de MMP-3 est associée à une augmentation de la rigidité artérielle [318]. Alors que l'allèle 5A est responsable d'un accroissement de la rigidité artérielle, probablement par une dégradation accrue des fibres élastiques, l'allèle 6A est associé à l'épaississement de la paroi vasculaire [319]. L'équipe de Medley a mise en évidence un autre polymorphisme (C1562T) impliquant cette fois-ci la MMP-9. Les individus ayant une thymine au lieu d'une cytosine (TT et CT) au niveau du promoteur de la MMP-9 possèdent des artères plus rigides, une pression pulsée carotidienne et une pression systolique plus élevées que les patients homozygotes CC. L'expression du gène de MMP-9 est augmentée de cinq fois et la protéine d'environ deux fois comparativement aux patients homozygotes [320]. Cette étude suggère que la rigidité artérielle pourrait donc être causée par une dégradation excessive des fibres élastiques. Globalement, la dégradation et la fragmentation des fibres élastiques, principalement par les MMPs, seraient impliquées dans la rigidité artérielle, probablement par une diminution de leur capacité à se dilater durant la systole et réduisant ainsi leur effet tampon. D'autres modifications des fibres élastiques contribueraient à l'accroissement de la rigidité artérielle notamment la diminution avec l'âge des liaisons intermoléculaires entre les fibres élastiques [321] ainsi que la déposition de calcium sur celles-ci.

## ii. Calcification

La calcification vasculaire est un phénomène qui a été observé il y a déjà maintenant plus d'un siècle. Dès 1905, des chercheurs ont montré la présence de dépôts de calcium au niveau des grosses artères [322]. De plus, en 1944, Blumenthal a étudié des

aortes de patients décédés et a montré que seulement 4% des patients âgés entre 20 et 30 ans avaient une calcification significative, mais que la proportion montait à 98% chez les gens âgés de plus de 50 ans [323]. Ces deux études suggèrent que ce type de dégénération n'est pas associé au style de vie moderne. Cette calcification se retrouve au niveau de la média de la paroi vasculaire et porte le nom de calcification artérielle médiale ou élastocalcinose, car c'est une calcification des fibres élastiques. Elle implique les CMLVs médiales, mais pas de processus inflammatoires, donc aucune infiltration de macrophages ou de cellules T. Elle est caractérisée par l'expression de protéines osseuses suite à des changements phénotypiques des CMLVs qui deviennent des cellules de type *osteoblast-like*. Elle est souvent associée au diabète, à l'insuffisance rénale ainsi qu'au vieillissement. En plus de l'élastocalcinose, il existe d'autres types de calcification :

- La calcification intimale ou athérosclérotique est caractérisée par une déposition de calcium au niveau de l'intima avec des infiltrations de lipoprotéines, de macrophages et des cellules T dans un contexte inflammatoire précédée d'une dysfonction endothéliale. Elle est associée à l'athérosclérose et à l'hypercholestérolémie.
- La calcification valvulaire est caractérisée par une déposition de calcium sur les valves du cœur en réponse à un stress mécanique et à de l'inflammation accompagnée d'infiltration de macrophages et de cellules T ainsi qu'une accumulation de lipides.
- La calciphylaxie vasculaire est caractérisée par une déposition de calcium et de phosphate au niveau des tissus mous suite à un déséquilibre phosphocalcique. Contrairement aux autres types de calcification, celle-ci n'implique pas l'expression de protéines osseuses. Elle est associée à l'insuffisance rénale terminale [324].

La calcification est associée préférentiellement aux fibres élastiques plutôt qu'aux fibres musculaires (CMLVs) et plus la proportion d'élastine est élevée dans une artère et plus la calcification est importante [325]. Les processus de dégradation associés au vieillissement facilitent la déposition de calcium sur les fibres élastiques. Intrinsèquement, l'élastine possède déjà beaucoup d'affinité pour le calcium [326], mais avec l'âge, la fragmentation de l'élastine libère des acides aminés polaires qui accentuent davantage cette

affinité et conséquemment les fibres élastiques sont plus calcifiées [327, 328]. Comme les MMPs sont impliquées dans la dégradation de l'élastine, elles pourraient être responsables de l'augmentation de la déposition de calcium au cours du vieillissement. Plusieurs études ont montré leur implication directe dans la calcification de l'élastine. En effet, en utilisant un modèle d'implantation de fibres d'élastine purifiées sous la peau, l'équipe de Vyavahare a montré à plusieurs reprises l'association entre la calcification de l'élastine, l'augmentation des ARNm et l'activité des MMPs (MMP-2 et MMP-9) [326, 329]. Dans une de ces études, ils ont prétraité des fibres d'élastine avec du chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ). L'aluminium se lie irréversiblement à l'élastine inhibant la calcification [330]. L'ion aluminium a permis de protéger l'élastine de la dégradation par les MMPs [326]. Dans une autre étude, les MMP-2 et 9 ont été inhibées directement ce qui a permis de bloquer la déposition de calcium [329]. En utilisant un modèle de souris déficientes pour la MMP-2 et la MMP-9, une étude a montré que suite à l'induction de la calcification par du chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ), ces souris n'ont pas développé de calcification comparativement à des souris sauvages [331]. Globalement, ces études suggèrent toutes l'implication des MMPs dans la calcification. Des études utilisant des modèles se rapprochant plus de la pathophysiologie de l'élastocalcinose ont également montré l'implication délétère des MMPs. En utilisant un modèle de calcification induite par l'administration de vitamine D ou de warfarine, ces études ont montré l'augmentation de l'activité de la MMP-9 et son inhibition par des inhibiteurs comme le GM6001 ou la doxycycline ont permis de prévenir la calcification [313, 332]. Tout comme sa dégradation, la calcification de l'élastine est associée à la rigidité artérielle. Plusieurs études chez l'animal ont montré une relation directe entre la calcification vasculaire et l'augmentation de rigidité artérielle [312, 313, 333, 334]. Dao et al. ont montré même une corrélation positive ayant un coefficient de corrélation de 0,56 entre les taux de calcium dans l'aorte et le PWV [335]. En clinique, la rigidité artérielle associée à l'élastocalcinose est fréquemment observée chez les patients souffrant d'insuffisance rénale [336, 337]. En effet, dans une étude où les patients ont été subdivisés en deux groupes selon que leur PWV était inférieur ou supérieur à 12 m/s a

montré que les taux de calcium sont plus élevés dans le groupe où le PWV est supérieur 12 m/s [338]. Une autre étude a montré que la densité de calcification est augmentée avec l'âge, la durée de l'hémodialyse ainsi qu'avec les doses de carbonate de calcium prescrites ( $\text{CaCO}_3$ ) et que cette calcification (aorte et carotides) est associée à une augmentation de la rigidité artérielle [339]. En plus des patients en insuffisance rénale, une étude a montré récemment que la calcification de l'aorte est associée à la rigidité artérielle et à l'HSI chez des sujets en santé. Leurs résultats suggèrent que la calcification est importante dans les processus de rigidité aortique et le développement de l'HSI chez l'homme [340].

*b. Accumulation de macromolécules de la matrice extracellulaire*

Dû au vieillissement, en plus de la fragmentation et la calcification de l'élastine, la paroi vasculaire s'épaissit suite à la migration des CMLVs, à leur hypertrophie ainsi qu'à la synthèse de macromolécules par celles-ci. Chez l'homme, l'épaisseur de la paroi de l'aorte augmente de deux à trois fois entre l'âge de 20 ans et 90 ans [341]. Dans les processus de vieillissement, la principale macromolécule qui s'accumule est le collagène. Certaines études montrent une augmentation du collagène sans changement des taux d'élastine [342] alors que d'autres observent également une diminution des taux d'élastine avec l'âge [343]. Cette surproduction de collagène par rapport à l'élastine provoque un déséquilibre. Ce déséquilibre en faveur du collagène entraîne une augmentation de la rigidité, car le collagène est de 100 à 1000 fois plus rigide que l'élastine [344]. Normalement, de par ses propriétés élastiques, donc de compliance, l'élastine est responsable de l'étirement de la paroi vasculaire suite aux battements cardiaques (tension à pression plus faible). Le collagène, quant à lui, maintient l'intégrité du vaisseau et évite un étirement trop important de la paroi. Il est très sollicité dans les cas de haute pression. Ainsi, une dégradation plus importante de l'élastine accompagnée d'une accumulation accrue du collagène entraîne une perte de capacité de l'aorte à s'étirer favorisant conséquemment la rigidité artérielle. Physiologiquement, les fibres de collagène d'une part et les fibres d'élastine d'autre part, sont liées entre elles sous l'effet de la lysyl-oxydase (LOX) [345]. Ces liaisons



intermoléculaires donnent au collagène sa propriété de résister à l'étirement et à l'élastine sa capacité de s'étirer sous l'effet de la pression, mais elles les rendent également insolubles et résistants à la dégradation enzymatique [302]. Avec l'âge, le collagène et l'élastine subissent d'autres liaisons intermoléculaires. Il s'agit de glycations non enzymatiques entre les fonctions aminées libres (lysine et arginine) et un sucre, principalement le glucose, qui formeront des produits d'Amadori. D'autres oxydations peuvent se produire et les produits d'Amadori pourront former ultérieurement des produits avancés de glycation (AGE, *Advanced-glycation end products*) [346]. En plus d'augmenter la rigidité artérielle par l'augmentation de la résistance à l'étirement du collagène et la diminution de l'élasticité de l'élastine, la glycation rend le collagène moins susceptible à l'hydrolyse (dégradation) [347]. En plus du collagène, d'autres protéines de la MEC s'accumulent. En effet, la chondroïtine sulfate, l'héparane sulfate, les protéoglycanes et la fibronectine contribuent à la rigidité et à l'épaississement de la paroi vasculaire [259, 300]. De plus, la fragmentation de l'élastine libère certaines molécules comme le TGF- $\beta$  qui stimule la synthèse de collagène et de fibronectine par les CMLVs [348, 349]. L'expression de la fibronectine est régulée par l'AngII et avec l'âge, l'expression de la ACE est augmentée au niveau de l'aorte suggérant une implication du système rénine-angiotensine [350] dans le développement de la rigidité artérielle en augmentant l'épaisseur de la paroi [351]. Des études montrent même le lien entre certains polymorphismes pour la ACE, le récepteur AT<sub>1</sub> de l'AngII et la rigidité artérielle [352, 353].

#### **3.4.1.2. Changements cellulaires**

En plus des changements impliquant les différentes composantes de la MEC, le vieillissement vasculaire provoquent également des modifications au niveau des cellules qui composent la paroi vasculaire, notamment les cellules endothéliales qui sécrètent moins de NO provoquant une dysfonction endothéliale et les CMLVs qui synthétisent maintenant des protéines osseuses.

### *a. Dysfonction endothéliale*

Le vieillissement vasculaire provoque, au niveau des cellules endothéliales, une sénescence qui entraîne une diminution progressive de la vasodilatation dépendante de l'endothélium [354, 355]. Ce phénomène se produit aussi bien dans les artères de conductance que dans les artères de résistance [356, 357]. La perte de la fonction endothéliale affecte principalement le NO, mais également la prostacycline et l'EDHF [358]. En plus de la réduction des effets vasorelaxants, une des conséquences de la dysfonction endothéliale est l'augmentation de la réactivité aux vasoconstricteurs comme l'AngII [359], l'ET-1[360] ainsi que les prostanoides comme la PGH<sub>2</sub> et le TXA<sub>2</sub> [361, 362]. Des études ont montré que l'utilisation d'iECA, d'antagonistes des récepteurs de l'AngII (ARA) ainsi que des antagonistes des récepteurs de l'ET-1 est efficace pour améliorer la fonction endothéliale [363-365]. La biodisponibilité du NO dépend de l'équilibre entre sa production et sa dégradation. Avec l'âge, l'équilibre est rompu et la biodisponibilité du NO est réduite d'une part, par la diminution de l'expression et de l'activité de la machinerie qui le produit et d'autre part, par l'augmentation d'expression de molécules qui le séquestrent. En effet, plusieurs études ont montré qu'en vieillissant, l'expression de la eNOS est réduite [366, 367]. Sa modulation par phosphorylation est également affectée puisque l'activité de la kinase Akt est diminuée [368]. L'activité de la eNOS peut également être diminuée par l'augmentation de son inhibiteur endogène, l'ADMA. Elle serait augmentée suite à l'inhibition de sa dégradation par le stress oxydatif [369]. L'enzyme responsable de sa dégradation, la diméthylarginine diméthylaminohydrolase (DDAH), serait inhibée par l'anion superoxyde [370]. Ce dernier est augmenté avec l'âge suite à l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase [367, 371]. L'accumulation des AGEs avec l'âge augmente également la production d'anion superoxyde par une hausse de l'activité de la NADPH oxydase [372]. En plus d'augmenter l'ADMA, l'anion superoxyde entraîne une diminution de la biodisponibilité du NO par la formation de peroxynitrite et le découplage de la eNOS [367, 373]. De plus, pendant que l'expression de la eNOS est diminuée, la

iNOS est, quant à elle, augmentée [374]. Les grandes quantités de NO formés par la iNOS provoquent une formation accrue de peroxy-nitrite et entraînent, par conséquent, l'altération des protéines vasculaires par nitrosylation [367]. Tous ces changements provoquent une diminution de la vasodilatation qui dépend principalement du NO.

Tel que décrit précédemment, la dysfonction endothéliale est classiquement le résultat d'une diminution des facteurs vasorelaxants, principalement le NO et d'une augmentation des facteurs vasoconstricteurs comme l'AngII et l'ET. Cependant, de plus en plus d'études montrent maintenant que la réduction du NO pourrait être secondaire à une augmentation de l'ET [375, 376]. Plusieurs mécanismes impliquant l'ET dans la dysfonction endothéliales ont récemment été mis en évidence. En effet, l'ET peut diminuer la biodisponibilité du NO en diminuant sa production par une inhibition de l'activité de la eNOS suite à une augmentation de la cavéoline-1 [377, 378] ou augmenter sa dégradation par une formation accrue des ROS [376, 379]. De plus, l'ET serait impliquée dans la dysfonction endothéliale de plusieurs pathologies telles que l'athérosclérose [380] et le diabète [381].

Comme vu dans la section 2,1,4 traitant des facteurs endothéliaux influençant la rigidité artérielle, le NO ainsi que plusieurs autres facteurs influencent la rigidité artérielle [382, 383]. Il est à noter qu'en plus de leur effet sur la rigidité artérielle, le NO et l'ET-1 sont impliqués dans la calcification vasculaire. Une première étude montre que suite à l'administration de L-NAME, il y a une augmentation de l'expression de l'ostéopontine (OPN) et de la *Bone sialoprotein* (BSP), protéines normalement exprimées dans les os [384]. Une seconde étude montre que l'inhibition de l'ET par l'administration de darusentan permet de régresser la calcification vasculaire induite chez des rats [385]. Le vieillissement vasculaire entraîne une diminution d'expression de molécules qui dilatent les vaisseaux mais une augmentation d'expression de protéines osseuses.

### b. *Changements phénotypiques*

La calcification vasculaire a longtemps été considérée comme un phénomène passif et non régulé en réponse à un dommage tissulaire ou à une nécrose. Les recherches ont permis de découvrir que non seulement l'élastocalcinoïse est un processus actif et hautement régulé mais qu'elle partage beaucoup de similarités avec la biominéralisation osseuse [386]. Dans l'organisme, les concentrations de calcium et de phosphate contenues dans les liquides biologiques sont à la limite de la précipitation sous forme de sel. Afin de prévenir la calcification des tissus mous en conditions physiologiques, il existe des molécules qui chélatent ces ions et limitent leur précipitation. L'utilisation de modèles génétiques a révélé l'existence d'une grande variété d'inhibiteurs de la calcification notamment la *Matrix Gla protein* (MGP), l'OPN, l'ostéoprotégérine (OPG), la fétuïne-A et l'anhydrase carbonique II [387].

La MGP est une protéine anti-calcifiante exprimée physiologiquement au niveau des CMLVs et son activité est diminuée chez des rats âgés ayant une calcification [388]. Cette protéine possède des propriétés anti-calcifiantes majeures puisque des souris déficientes pour la MGP ont une calcification importante et meurent dans les quelques semaines suivant leur naissance suite à une rupture de l'aorte [389]. Une étude chez l'homme a montré une diminution de l'expression de la MGP dans des artères de patients souffrant d'une sclérose de Mönckeberg (calcification artérielle médiale) comparativement à des artères saines [390]. Elle inhibe également les effets de la *bone morphogenic protein 2* (BMP-2) et empêche ainsi la différenciation ostéoblastique induite par cette protéine [391]. L'OPN est une autre protéine anti-calcifiante qui se retrouve de façon physiologique dans les tissus calcifiés comme les os et les dents mais pas dans les vaisseaux sains [390]. Contrairement à la MGP, son inhibition ou l'inactivation de son gène n'entraîne pas de calcification [392]. Il est toutefois possible de la retrouver au niveau des sites de calcification [393]. Elle agirait comme inhibiteur de la croissance des dépôts d'hydroxyapatite [394], mais son activité dépend de la phosphorylation. La phosphatase

alcaline peut inhiber l'activité anti-calcifiante de l'OPN en la déphosphorylant [395]. Beaucoup d'autres études ont montré l'expression pathologique de protéines osseuses au niveau vasculaire [393, 396]. Par exemple, il a été montré tant *in vitro* qu'*in vivo* qu'en présence d'une calcification vasculaire, il y a une diminution de l'expression de l' $\alpha$ -actine, marqueur spécifique des CMLVs, mais une expression du *Core binding factor  $\alpha$ -1* (Cbfa-1), facteur de transcription normalement exprimé au niveau des os [397]. Il est maintenant bien accepté que l'expression de ces protéines est le résultats de changements phénotypiques des CMLVs en un phénotype mimant celui des ostéoblastes [398]. Outre l'OPN et le Cbfa-1, qui induit un changement phénotypique au niveau des CMLVs, la BSP, la phosphatase alcaline (ALP) et l'ostéocalcine (OCN) sont également exprimées au niveau vasculaire en réponse aux changements phénotypiques. En effet, l'étude sur les patients souffrants d'une sclérose de Mönckeberg montre une augmentation significative de ces protéines [390]. La BSP est impliquée dans la formation osseuse en induisant la nucléation de l'hydroxyapatite [399]. L'ALP est retrouvée dans plusieurs tissus, mais elle est fortement exprimée dans les ostéoblastes. Elle catalyse l'hydrolyse de monophosphates d'ester comme le phosphoéthanolamine. Les phosphates ainsi libérés servent à la formation de l'hydroxyapatite [400]. Finalement, l'ostéocalcine est une protéine matricielle exprimée par les ostéoblastes qui serait impliquée dans le remodelage osseux. Tout comme la MGP, elle contient des résidus d'acide  $\gamma$ -carboxyglutamique (Gla) dans sa structure. Elle pourrait donc fixer l'hydroxyapatite et ainsi inhiber la calcification dans les vaisseaux [401]. Globalement, la calcification vasculaire dépend d'un équilibre entre les facteurs anti et pro-calcifiants. Si cet équilibre est rompu, comme c'est le cas dans le vieillissement, la calcification peut prendre le dessus entraînant le développement de pathologies telles que l'hypertension systolique isolée.

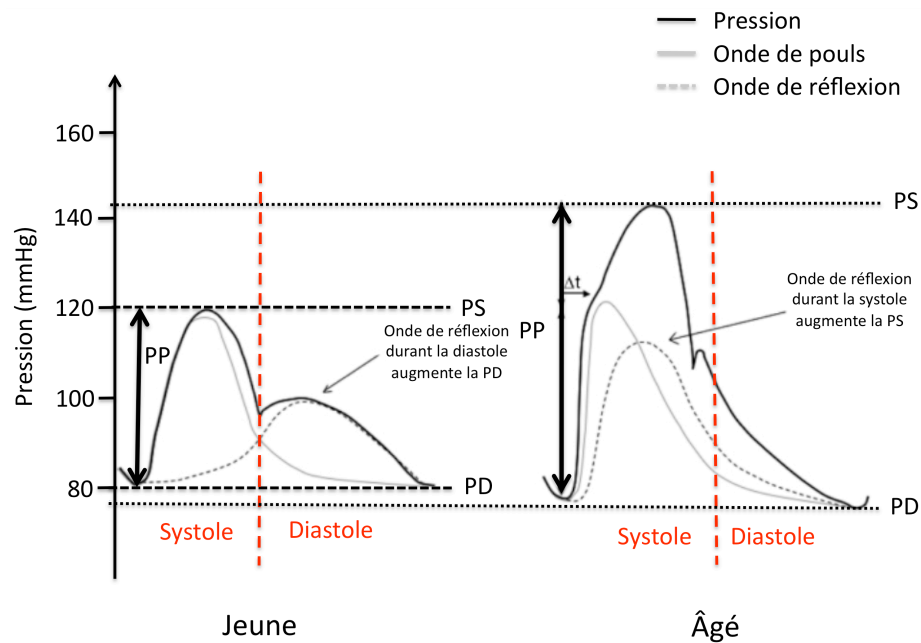
### **3.4.2. Rigidité artérielle et hypertension systolique isolée**

Tous les changements associés au vieillissement vasculaire décrits précédemment ont pour conséquence d'augmenter la rigidité artérielle. La perte d'efficacité de l'élastine

par sa dégradation et sa calcification ainsi que l'augmentation des taux de collagène entraînent un transfert mécanique des fibres élastiques vers les fibres de collagène. L'élasticité des artères repose maintenant sur une composante de la paroi vasculaire qui est beaucoup plus rigide. Le collagène est, en effet, de 100 à 1000 fois plus rigide que l'élastine [344]. Des artères saines et compliantes ont la capacité de convertir les pulsations cardiaques en un flux continu. En s'étirant, elles emmagasinent temporairement de l'énergie mécanique lors de la systole et deviennent un réservoir de pression (effet tampon). Elles reprennent ensuite leur forme initiale et convertissent l'énergie emmagasinée en énergie cinétique permettant au sang de s'écouler dans les artères durant la diastole [1]. Par contre, en vieillissant, les artères deviennent plus épaisses et plus rigides entraînant la disparition de l'effet tampon. La perte de l'effet tampon a pour conséquence d'augmenter la PP et le PWV. Le PWV dépend de la rigidité artérielle, du rayon du vaisseau, de l'épaisseur de la paroi, de la viscosité du sang [255]. La PP est, quant à elle, influencée par la rigidité artérielle, l'éjection ventriculaire et la réflexion de l'onde pulsatile [256]. L'influence de la rigidité artérielle sur la PP est incorporée dans le concept d'impédance. C'est une mesure de tous les facteurs qui limitent l'écoulement du sang [257]. Physiologiquement, l'impédance augmente graduellement le long de l'arbre artérielle en raison de la hausse du rapport collagène/élastine et de la diminution du diamètre des vaisseaux à mesure que le sang s'éloigne du cœur [258].

L'onde pulsatile ou l'onde de pouls peut être divisée en deux parties: l'onde incidente et l'onde de réflexion. Lorsque l'onde de pouls produite par le cœur rencontre une résistance, elle produit une onde en sens inverse (onde de réflexion). La réflexion de l'onde de pouls survient physiologiquement le long de l'arbre vasculaire. Chez les personnes jeunes et en santé, l'onde de réflexion coïncide avec la diastole, car l'onde de pouls voyage lentement due à la compliance de l'aorte, ce qui augmente la PD et permet une perfusion adéquate des organes et en particulier le cœur via les coronaires. Par contre, chez une personne âgée où les artères ont subi beaucoup de modifications délétères, l'onde de pouls (incidente) arrive plus rapidement en périphérie et par conséquent, l'onde de

réflexion revient vers le cœur plus rapidement. Ainsi, au lieu d'atteindre le cœur pendant la diastole, l'onde de réflexion atteint le cœur en fin de systole ce qui a pour conséquence d'augmenter la PS et de diminuer la PD et conséquemment d'accroître la PP. De plus, comme les artères sont plus rigides, il y a un accroissement de l'impédance au niveau de l'aorte provoquant, au moment de l'éjection ventriculaire, une augmentation de la PS. Tous ces changements de paramètres hémodynamiques suite à l'augmentation de la rigidité artérielle mènent au développement de l'HSI [258, 402] (figure 10).



**Figure 10: Impact de la rigidité artérielle sur les différents paramètres hémodynamiques, comparaison avec un sujet jeune.**  
D'après [282].

### 3.5. Risques associés à l'hypertension systolique isolée

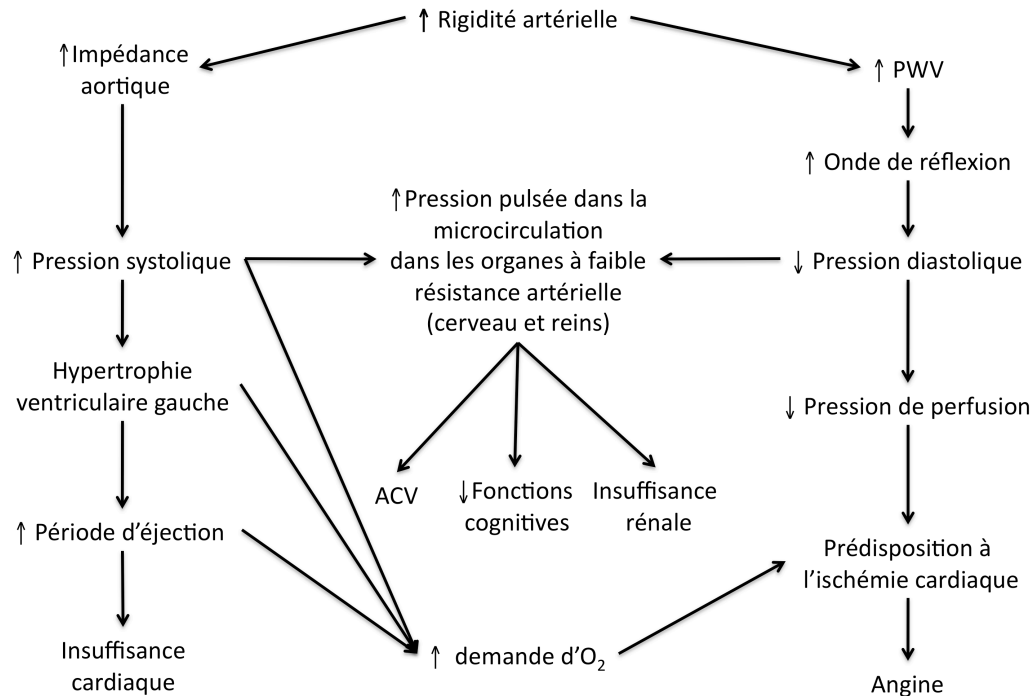
La figure précédente montre l'impact de la rigidité artérielle sur les paramètres hémodynamiques. En effet, l'élévation de la PP, de la PS, du PWV ainsi que la diminution de la PD ont des répercussions sur les organes comme le cœur, les reins et le cerveau.

Des données épidémiologiques montrent que la PP et la PS sont de puissants et robustes indices (*predictors*) pour prédire les risques cardiovasculaires et les dommages aux organes cibles [403, 404]. Contrairement aux personnes plus jeunes où la PD est un bon indice de mortalité et de morbidité, chez les personnes âgées de plus de 60 ans souffrant d'HSI, la PS est un indice beaucoup plus puissant et précis [405]. Ces deux paramètres peuvent même prédire le développement de certaines pathologies telles que l'hypertrophie ventriculaire gauche, l'infarctus du myocarde, la dysfonction du ventricule gauche et l'insuffisance cardiaque congestive [406, 407]. En effet, avec l'âge, la rigidité artérielle provoque une hausse de la PS qui a des répercussions sur le cœur. L'augmentation de la PS accroît le travail du ventricule gauche qui, par conséquent, mène à son hypertrophie et une demande plus importante en oxygène [408]. Un cœur hypertrophié a des cycles de contraction/relaxation plus lents provoquant une augmentation de la durée de la systole et une diminution de la diastole. Une systole plus longue entraîne davantage d'augmentation de la pression systolique puisque les ondes de réflexion reviennent toutes durant la systole [409, 410]. De plus, comme la perfusion des artères coronaires se fait durant la diastole et que celle-ci est diminuée, elles sont beaucoup moins bien alimentées par le sang. Tel que mentionné un peu plus haut, un cœur hypertrophié nécessite plus d'O<sub>2</sub>, donc la combinaison entre une demande énergétique plus importante mais une perfusion inadéquate prédispose à l'ischémie puis à l'angine [411, 412]. L'hypertrophie ventriculaire est une réaction compensatoire en réaction à une surcharge de travail. Cependant, ce mécanisme a des limites et à un certain moment, le cœur n'est plus en mesure de compenser davantage toutes ces modifications délétères entraînant, par conséquent, le développement de l'insuffisance cardiaque [413].

En plus du cœur, le cerveau et les reins sont particulièrement affectés par l'augmentation de la rigidité artérielle qui se manifeste par une hausse de la pression pulsée. L'augmentation de la pression pulsée a peu d'effet sur la plupart des organes, car les cellules et les capillaires sont protégés par la vasoconstriction des artères de résistance et



des artérioles en amont. Par contre, comme le cerveau et les reins doivent être bien perfusés en permanence, ils nécessitent de hauts débits afin de fournir les nutriments nécessaires au bon fonctionnement du cerveau et d'assurer une bonne filtration du sang au niveau des glomérules rénaux. Ainsi, les artères de résistance en amont n'offrent que peu de résistance afin d'accroître les débits sanguins au besoin. Cette faible résistance rend toutefois les capillaires de ces organes très vulnérables aux variations de pression et les expose à une pulsativité qui peut être très dommageable s'il y a une augmentation de la rigidité artérielle [414]. Les capillaires des glomérules sont particulièrement sensibles à l'augmentation de la pression pulsée puisqu'ils sont positionnés entre l'artériole afférente (proximale) et l'artériole efférentes (distale) et comme l'artériole afférente ne protègent pas le glomérules en augmentant la résistance, la pression pulsée et moyenne au niveau des glomérules se retrouve donc aussi élevée qu'au niveau des grosses artères [415]. De cette façon, la PP est associée à une réduction et à une accélération de la détérioration de la fonction rénale [416, 417]. L'albuminurie, signe précoce des dommages rénaux, est associée à plusieurs facteurs de risques cardiovasculaires dont la rigidité artérielle [418-420]. Dans ces études, la rigidité artérielle a été mesurée par le PWV qui est de plus en plus utilisé comme indice pour prédire la mortalité. En plus d'être le marqueur de choix pour la mesure de la rigidité artérielle, le PWV est une valeur prédictive indépendante pour la mortalité cardiovasculaire dans la population en générale, chez les gens hypertendus et les personnes âgées de plus 70 ans, mais aussi chez des gens souffrant d'insuffisance rénale et de diabète [276]. Le cerveau souffre également de l'augmentation de rigidité artérielle. En effet, la diminution des fonctions cognitives est associée à une augmentation de la rigidité artérielle mesurée par le PWV [421-423]. La rigidité artérielle est également un bon indice prédictif pour les AVC [424]. La figure suivante résume les conséquences de l'augmentation de la rigidité artérielle sur les différents organes [409].



**Figure 11: Conséquences de l'augmentation de la rigidité artérielle.**

Adapté de [409].

### 3.6. Traitement de l'hypertension systolique isolée

Depuis une trentaine d'années, l'approche thérapeutique chez les personnes âgées a beaucoup changé. Dans les années 70, on se questionnait à savoir s'il fallait traiter les patients hypertendus âgés de plus de 65 ans, mais maintenant les études ont démontré les effets bénéfiques du contrôle de la PS. En 1991, l'étude SHEP (*Systolic hypertension in the Elderly Program*) a été la première à montrer l'efficacité de traiter les patients âgés souffrant d'HSI. Les études Syst-Eur (*Systolic Hypertension in Europe*) et Syst-China (*Systolic Hypertension in China*) ont corroboré ces résultats. Le regroupement de trois études dans une méta-analyse de près de 12 000 patients âgés de plus de 60 ans a permis de montrer que le traitement antihypertenseur chez ces personnes est efficace. En effet, selon cette méta-

analyse, le traitement a permis de réduire significativement les événements coronariens de 25%, les AVC de 32%, la mortalité cardiovasculaire de 25% et la mortalité totale de 17%. Ces études ont permis de réaliser que l'élévation de la pression artérielle avec l'âge n'est pas sans conséquence et qu'une réduction de la PS est bénéfique même chez les patients ayant une PD normale. Même le traitement des personnes très âgées (plus de 80 ans) est efficace pour réduire les AVC, l'insuffisance cardiaque et les événements cardiovasculaires en général [425]. Un traitement efficace de l'hypertension permet de diminuer la pression artérielle en réduisant la résistance périphérique. Les différents organismes nationaux et internationaux ont harmonisé leurs recommandations sur les valeurs de pression artérielle à atteindre. Ainsi, pour les patients à faibles risques souffrant d'HSI (pas de diabète, pas d'insuffisance rénale et cardiaque), il serait souhaitable d'avoir une pression systolique inférieure à 140 mmHg. Chez les patients à hauts risques, il est recommandé d'avoir une pression inférieure à 130/80 mmHg [285, 425].

L'arsenal thérapeutique dans le traitement de l'HSI comprend les classes d'antihypertenseurs classiques tels que les diurétiques, les iECA, les ARA et les BCC. Trois d'entre elles ont montré une réduction de la mortalité et de la morbidité, soient les diurétiques dans l'étude SHEP (Chlortalidone vs placebo), les ARA dans les études LIFE (*Losartan Intervention for Endpoint reduction*; losartan vs atenolol), VALUE (*Valsartan Antihypertensive Long-term Use Evaluation*; valsartan vs amlodipine) et SCOPE (*Study on Cognition and Prognosis in the Elderly*; candésartan vs placebo) ainsi que les BCC dans l'étude Syst-Eur (Nitrendipine vs placebo) [426]. Un nombre grandissant d'études montre qu'en plus de réduire la pression artérielle, certains antihypertenseurs auraient des propriétés supplémentaires intéressantes pour le traitement de l'HSI. En effet, les iECA et les BBC ont des propriétés vasodilatatrices qui ont des effets bénéfiques sur la distensibilité de l'aorte [427]. Les diurétiques qui bloquent l'aldostérone, peuvent prévenir l'augmentation de la rigidité artérielle et de la fibrose chez des rats âgés normotendus [428]. Cet effet bénéfique passe par la modification de la densité de collagène et d'élastine au niveau de la paroi vasculaire. Les antagonistes de l'aldostérone ont également des effets

protecteurs chez l'homme [429]. De plus, il a été démontré que le système rénine angiotensine (SRA) contribue au développement de la rigidité artérielle [430]. Ainsi, plusieurs études ont montré l'efficacité des ARA et des iECA à réduire l'hypertrophie artérielle et la fibrose [431-433] en plus d'augmenter la compliance artérielle [434]. Dans un modèle expérimental d'HSI associé à une élastocalcinose, les auteurs ont montré que l'administration d'un antagoniste des récepteurs de l'ET (darusentan), d'un ARA (irbésartan) ou d'un diurétique (hydrochlorothiazide) a permis de prévenir la calcification artérielle médiale et l'augmentation du rapport collagène/élastine [435]. Dans une autre étude, le traitement avec du darusentan a également permis de régresser la calcification vasculaire [385]. Les BCC ont également des effets sur l'élastocalcinose [436]. En plus des antihypertenseurs, d'autres molécules ont des effets bénéfiques dans le traitement de l'HSI. De par ses effets sur la modulation du tonus vasculaire, le NO peut diminuer la rigidité artérielle et la pression pulsée [265, 383, 437, 438]. Finalement, l'ostéoporose est une maladie associée au vieillissement qui implique une perte de masse osseuse. Elle est traitée à l'aide de médicaments qui inhibent la résorption osseuse, les biphosphonates. Des études ont montré que ces médicaments seraient également efficaces pour diminuer la calcification vasculaire [439, 440].

### **3.7. Modèles animaux d'hypertension systolique isolée**

Il existe plusieurs modèles animaux pour étudier l'hypertension systolique isolée et tous les mécanismes qui lui sont associées. Que ce soit des modèles de vieillissement, des modèles génétiques ou d'induction chimique, chacun a ses avantages et ses inconvénients.

#### **3.7.1. Vieillissement**

Le modèle qui ressemble le plus aux différentes modifications se produisant chez l'homme est le modèle de vieillissement. Une étude a montré que tout comme chez l'homme, les parois vasculaires des rats se calcifient avec l'âge. En étudiant différentes

souches de rats telles que les Wistar, les Fischer 344, les Wistar Kyoto et les rats spontanément hypertendus (SHR), Kieffer et son équipe a montré qu'il y a une calcification graduelle de l'aorte et des carotides avec l'âge (6 à 24 mois), mais très peu dans les tissus mous (reins, foie, cœur). Malgré que les SHR soient des rats qui développent une hypertension, ils ne présentaient pas une calcification plus importante que les autres souches de rats [441].

### **3.7.2. Modèles génétiques**

#### **3.7.2.1. Modèle de souris déficiente pour le gène de la MGP**

La MGP est une protéine anti-calcifiante qui fixe l'hydroxyapatite et l'empêche de se fixer au niveau de la paroi vasculaire. Elle peut également fixer la BMP-2 et l'élastine, ce qui pourrait bloquer la différenciation ostéoblastique et ainsi prévenir la calcification de l'élastine [391, 442]. Dans les deux premières semaines de vie, les souris MGP<sup>-/-</sup> ne sont pas différentes des souris sauvages, mais à partir de la 3<sup>e</sup> semaine, elles développent une très forte calcification de l'aorte et ses différentes ramifications. La calcification médiale se développe dans toutes des artères élastiques et musculaires, en plus d'une déformation de leur structure. Il n'y a toutefois pas de calcification au niveau des artérioles, des capillaires ou des veines. Ces souris meurent en moyenne après seulement deux mois de vie à cause d'une hémorragie suite à la rupture de l'aorte qui est devenue pratiquement un os [389].

#### **3.7.2.2. Modèle de souris déficiente pour le gène de la MGP et de l'OPN**

L'OPN est une protéine anti-calcifiante qui est capable de fixer les cristaux d'hydroxyapatite et d'inhiber leur croissance. Elle est localisée dans les sites de calcification au niveau de la média [393] et son expression est augmentée dans le modèle de souris MGP<sup>-/-</sup>. Contrairement à ces souris, l'inactivation de son gène n'entraîne pas de calcification vasculaire [392]. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'OPN n'est pas exprimée dans des vaisseaux sains [390]. Par contre, la double inactivation du gène de la

MGP et de l'OPN provoque une calcification vasculaire médiale encore plus importante que dans les souris MGP<sup>-/-</sup>. Ces souris ont de deux à trois fois plus de calcium que les souris déficientes en MGP. Elles meurent également d'hémorragies suite à des ruptures vasculaires mais à des temps plus précoces [443].

### **3.7.3. Modèles d'induction chimique**

#### **3.7.3.1. Chlorure de calcium**

Sous anesthésie générale, le chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) est appliqué directement sur l'aorte des rats pendant 15 minutes à l'aide de coton tiges ou de gazes à une concentration 0,2 mol/L. Les concentrations peuvent toutefois différer et la calcification qui en résulte est dépendante de la concentration de chlorure de calcium appliquée et de la méthode d'application utilisée. Ce traitement provoque une augmentation de la calcification de 20 à 40 fois par rapport à des aortes traitées avec du chlorure de sodium (NaCl). La calcification obtenue est médiale, plus précisément au niveau des lamelles élastique et se développe à l'intérieur d'une semaine. Cette calcification est de plus associée à une désorganisation de la matrice extracellulaire et à une dégradation des fibres élastiques [331].

#### **3.7.3.2. Modèle vitamine D et nicotine**

Le modèle actuel de calcification vasculaire médiale induit par la vitamine D et la nicotine (VDN) est une adaptation du modèle développé par Fleckenstein [444] qui a été repris quelques années plus tard par l'équipe du Dr Atkinson. Depuis, le modèle s'est modifié quelque peu afin d'avoir un plus faible taux de mortalité [333, 445, 446]. Ce modèle consiste en une injection intramusculaire de vitamine D<sub>3</sub> (300 000 UI / kg) et de deux administrations orales de nicotine (25mg/kg) à intervalle de 9 heures. Ce traitement produit une augmentation de la calcification de 15 et 40 fois par rapport aux rats témoins [311, 333]. Le calcium se dépose surtout au niveau des lamelles élastiques de la média des

artères [311], et dans une moindre mesure au niveau des organes [441]. L'augmentation de calcium s'accompagne d'un accroissement de la pression systolique et de la rigidité artérielle ainsi que d'une fragmentation des lamelles élastiques [333]. La nicotine serait responsable de cette augmentation de calcium. Elle aurait la capacité d'induire une augmentation du calcium intracellulaire et de produire des catécholamines. Des études chez le lapin ont montré que l'adrénaline induit une calcification aortique [447].

### 3.7.3.3. Modèle warfarine vitamine K

Ce modèle est basé sur la capacité de la protéine anti-calcifiante de fixer l'hydroxyapatite et de l'éliminer via la circulation. En fait, l'induction de la calcification se produit lorsque la MGP est inactive. Pour être active et fixer l'hydroxyapatite, la MGP doit être carboxylée sur ses cinq résidus d'acide glutamique qu'elle possède dans sa structure. Ces résidus sont carboxylés par la  $\gamma$ -glutamate carboxylase. Cette enzyme transforme les résidus d'acide glutamique (Glu) de la MGP en acide carboxyglutamique (Gla). La  $\gamma$ -glutamate carboxylase est dépendante de la vitamine K. Cette dernière est essentielle à l'activité de la carboxylase, mais elle est également dépendante de deux enzymes qui assurent son recyclage, la vitamine K époxyde réductase (KO réductase) et la vitamine K réductase (K réductase). Ces deux enzymes sont toutefois sensibles à l'inhibition par la warfarine. Ainsi, l'administration de warfarine bloque le recyclage de la vitamine K et par conséquent inhibe la  $\gamma$ -glutamate carboxylase. De cette façon, la MGP demeure sous sa forme inactive et ne peut plus assurer ses fonctions anti-calcifiantes, provoquant la déposition de calcium au niveau des parois vasculaires. Comme la warfarine (Coumadin) est un anticoagulant, il est nécessaire d'administrer de la vitamine K quinone (phytonadione) qui pourra être utilisée par le foie afin de continuer à produire des facteurs de coagulation et ainsi empêcher les rats de mourir par hémorragie. L'administration de vitamine K n'empêche pas la déposition de calcium au niveau vasculaire puisque la phytonadione peut être transformée en vitamine K hydroquinone par la DT-diaphorase qui





s'approche de la pathophysiologie de l'HSI [450]. De plus, Shanahan et al. ont montré que l'expression de la MGP est diminuée au niveau de la média de vaisseaux de patients diabétiques souffrant d'une sclérose de Mönckeberg comparativement à des vaisseaux de sujets sains. Cette étude suggère que de faibles concentrations de MGP prédisposent à la calcification [390]. D'autres ont cependant montré, par des expériences d'immunohistochimie, de fortes concentrations de MGP au niveau d'artères calcifiées [451, 452]. À l'aide d'anticorps de conformation spécifique, des équipes ont montré que c'est la forme non carboxylée de la MGP qui s'accumule au niveau des artères calcifiées [388, 452]. Cette forme est inactive et ne peut pas fixer l'hydroxyapatite. Ces études montrent bien qu'un mauvais fonctionnement de la MGP, dû à son inactivation, est associé à l'élastocalcinose chez l'homme.

Tous les modèles présentés précédemment ont été développés pour étudier le vieillissement et la calcification vasculaire médiale. Tous ont des avantages, mais également des inconvénients. Voici un tableau qui résume tous les modèles décrits.

**Tableau 5: Avantages et inconvénients des différents modèles animaux de calcification vasculaire médiale et de vieillissement.**

Modèle	Avantages	Inconvénients
Vieillessement	Physiologique	- Long, - Coûteux - Peu flexible
MGP-/-	Mécanisme spécifique	Calcification trop importante
MGP-/- et OPN-/-	Mécanisme spécifique	Calcification trop importante
CaCl <sub>2</sub>	Rapide	Peu de lien avec la pathologie humaine (Non physiologique)
VDN	Flexible	Peu de lien avec la pathologie humaine
WVK	- Flexible - Lien avec la pathologie - Mécanisme endogène	Métabolisme de la warfarine par le CYP2C9, cytochrome utilisé par de nombreuses molécules (Nombreuses interactions possibles)

En plus des modèles animaux, il est possible d'étudier la calcification vasculaire médiale en utilisant des modèles de calcification *in vitro* où les CMLVs sont mis en culture et la calcification est induite par une augmentation des concentrations de phosphate [395]. Ces modèles sont rapides et intéressants pour étudier les voies de signalisation impliquées sans avoir toutes les interactions retrouvées dans un organisme entier. Cependant, l'absence d'interactions avec les autres composantes de la paroi et l'influence des paramètres hémodynamiques rendent ces modèles incomplets.

## 4. Hypothèse et objectifs

En vieillissant, la PS se dissocie de la PD provoquant une augmentation de la PP et éventuellement le développement de l'HSI. Ce phénomène est attribuable à l'augmentation graduelle de la rigidité artérielle des grosses artères qui peut être mesurée par le PWV. La rigidité artérielle est associée à plusieurs modifications de la paroi artérielle dont notamment la fragmentation de l'élastine et l'augmentation du collagène. Ainsi, avec l'âge, la paroi des vaisseaux s'épaissit et perd de son élasticité. De plus, l'élastocalcinose qui se caractérise par une déposition de calcium sur les lamelles élastiques de la média des artères contribue également à la rigidité artérielle.

En plus des composés de la matrice extracellulaire, les CMLVs pourraient participer à la rigidité artérielle. Bien que leur implication soit encore controversée, une augmentation du tonus vasculaire pourrait être impliquée dans la rigidité des vaisseaux. Le NO est impliqué dans une multitude de processus régulateurs au niveau du système cardiovasculaire. Sa contribution au contrôle du tonus vasculaire de base est plus importante au niveau des grosses artères que des petites. Il est également un facteur important dans le contrôle de la rigidité artérielle. En effet, l'administration de L-NMMA augmente le PWV et réduit la compliance. À l'inverse, l'administration d'Ach et de donneurs de NO améliore la distensibilité. La production basale de NO pourrait donc influencer la rigidité des grosses artères par la réduction du tonus vasculaire (effet aigu). De plus, dans notre laboratoire, il a été montré qu'un antagoniste des récepteurs à l'ET régressait l'élastocalcinose et réduisait la PP dans le modèle WVK d'HSI. Le NO est également connu pour bloquer la production d'ET par un mécanisme qui est dépendant du GMPc. Comme il y a une interaction entre le NO et l'ET, le NO pourrait être impliqué dans la modulation de l'élastocalcinose et la rigidité artérielle par l'inhibition de l'ET et la modification de la composition de la paroi vasculaire (effet structurel).

Ainsi, l'hypothèse générale de mon doctorat est que la modulation des niveaux de NO pourrait influencer la rigidité artérielle non seulement par une modification aiguë du tonus vasculaire, mais également par son influence dans le développement de l'élastocalcinose au niveau de l'aorte. Pour tester cette hypothèse, mes différentes études ont été construites autour des objectifs suivants :

- Déterminer l'implication aiguë et chronique du NO endogène dans l'initiation ainsi que la progression de l'élastocalcinose et la rigidité artérielle.
- Établir les mécanismes par lesquels le NO endogène limite l'élastocalcinose et la rigidité artérielle.
  - Déterminer l'implication de l'ET.
- Déterminer l'efficacité du NO exogène et de l'augmentation de ses effets endogènes à moduler la rigidité artérielle et à régresser l'élastocalcinose.
  - Déterminer si l'efficacité du NO exogène et de l'augmentation de ses effets endogènes à moduler la rigidité artérielle est reliée à une réduction du tonus vasculaire ou à des modifications de la composition de la paroi artérielle.

## 5. Matériel et méthodes

### 5.1. Design expérimental et traitement des animaux

#### 5.1.1. Traitement chronique (L-NAME, sinitrodil et tadalafil)

Toutes les études animales ont été réalisées en utilisant le modèle WVK de base. Pour réaliser ce modèle, des rats Wistar mâles témoins ont été comparés (175-200g, Charles-River Canada, St-Constant, Québec) à des rats recevant une combinaison de wafarine sodique (20mg/kg/jour dans l'eau de boisson) et de la vitamine K<sub>1</sub> (phylloquinone ou phytonadione, 85 mg/kg/jour en injection sous-cutanée) pendant 4 semaines. Seuls les molécules administrées et les temps de traitement ont été modifiés selon les études. Ainsi, tout au long de mon doctorat, que ce soit pour l'implication physiologique ou thérapeutique du NO, la plupart études ont comporté deux volets :

- Initiation de la calcification : les médicaments sont administrés, sous forme de poudre homogénéisée dans la nourriture, en même temps que débutent l'administration de warfarine et de vitamine K. Le temps de traitement maximal est de 4 semaines.
- Progression de la calcification : la calcification est induite pendant 4 semaines et à partir de la 5<sup>e</sup> semaine, l'administration de médicaments est commencée et ce pour un maximum de 4 semaines.

Afin de vérifier leur état de santé et d'ajuster les doses de médicaments, les rats ont été pesés à toutes les semaines. Ainsi, en plus de l'ajustement par rapport au poids des rats, les dosages de la warfarine et des médicaments utilisés dans les différentes études ont été ajustés 3 fois par semaine en fonction du volume d'eau (warfarine) bu et de la quantité de nourriture (médicaments) consommée. Il est à noter qu'afin d'éviter les saignements, la vitamine K a été commencée 1 semaines avant l'administration de warfarine. De plus, certains médicaments (L-NAME, sinitrodil et tadalafil) ont été arrêtés de 3 jours avant les

sacrifices afin de mesurer leurs effets chroniques sur les paramètres hémodynamiques et non leurs effets aigus. Une des études a été réalisée en continuant l'administration de L-NAME jusqu'au moment des sacrifices afin de pouvoir observer ses effets aigus sur les paramètres hémodynamiques, mais surtout sur l'expression protéique. Dans le volet initiation de la calcification de l'étude utilisant le tadalafil, ce dernier a également été poursuivi jusqu'au moment des sacrifices.

### **5.1.2. Traitement aigu (sinitrodil)**

Des rats mâles Wistar (175-200g) ont été soumis au traitement WVK standard pendant 8 semaines. À la fin des traitements, ils ont reçu un bolus intraveineux (i.v.) de salin ou de sinitrodil (1 mg/kg). Les rats témoins ont également reçu un bolus i.v. de salin ou de sinitrodil. Le comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux (CDEA) de l'université de Montréal a approuvé ces protocoles qui ont également été soumis à l'approbation de *Use of Laboratory Animals* publié par *the US National Institutes of Health* (NIH Publication No. 85-23).

## **5.2. Mesure des paramètres hémodynamiques**

### **5.2.1. Traitement chronique**

À la fin des traitements, les rats ont été anesthésiés (pentobarbital 65 mg/kg de façon intra-péritonéale, i.p.) et un cathéter PE-50 a été inséré dans l'artère fémorale gauche et la carotide gauche. Ces cathéters ont été connectés à un transducteur de pression et les signaux ont été enregistrés à 1000 Hertz (Hz) afin de mesurer la PS, la PD et la fréquence cardiaque. La PAM et la PP ont été calculées à partir de ces valeurs. À la fin des enregistrements, les rats ont été sacrifiés et leur cage thoracique ouverte afin d'exposer l'aorte. La distance entre le cathéter dans la carotide et celui dans la fémorale (deux extrémités de l'aorte) a été mesurée (l) et la technique manuelle de *foot-to-foot* a été utilisée

pour déterminer le temps de propagation (t) entre les deux cathéters. Le PWV a été calculé en divisant la distance de propagation "l" par le temps de propagation "t". Les valeurs de PWV sont exprimées en centimètres par seconde (cm/s). Au moins dix ondes normales consécutives ont été analysées et la moyenne de ces ondes a été calculée. Si une onde anormale (irrégulière ou incomplète) est détectée à l'intérieur de dix cycles cardiaques, celle-ci est rejetée et l'onde suivante est mesurée [312, 453]. Après ces mesures, l'aorte (crosse aortique, aorte thoracique, aorte abdominale) ainsi que quelques millilitres (mL) de sang ont été prélevés.

### **5.2.2. Traitement aigu**

La pression a été enregistrée 15 minutes avant l'injection de salin ou de sinitrodil par un cathéter i.v. inséré dans la veine fémorale et l'enregistrement des paramètres a été continué 30 minutes après l'injection. Le PWV a été calculé après 2, 5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes suivant l'administration de salin ou de sinitrodil. Les résultats sont présentés en tant que différence par rapport aux valeurs initiales de PWV.

## **5.3. Segmentation de l'aorte**

Une fois prélevée, l'aorte a été coupée en quatre segments afin de réaliser le plus de mesures différentes possibles. En partant du cœur, voici les sections :

1. Crosse aortique : différents dosages comme l'ET, le GMPc, les nitrates.
2. 2<sup>e</sup> section : mesurant environ 5 millimètres (mm) et servant à la quantification du calcium.
3. 3<sup>e</sup> section : mesurant environ 1 cm, fixée dans une solution tampon de cacodylate/paraformaldéhyde 4% (PFA) et enrobée de paraffine pour faire de l'immunohistochimie.

4. Dernière section : mesurant quelques cm et utilisée pour effectuer différentes mesures biochimiques (immunobuvardage, immunoprécipitation).

## **5.4. Évaluation de la composition des artères**

### **5.4.1. Quantification du calcium dans la paroi artérielle**

La 2<sup>e</sup> section de l'aorte a été séchée à 55°C puis pesée. Le calcium contenu dans l'aorte a été dissout à l'aide d'un volume d'acide formique 10% (30µL/mg de tissu sec) pendant toute une nuit à 4°C (18 heures). Le lendemain, les tubes contenant les bouts d'aortes et l'acide formique ont été vortexés, centrifugés puis, un volume d'acide formique a été prélevé pour le dosage. Les taux de calcium contenus dans l'acide formique ont été mesurés par une méthode colorimétrique basée sur la formation d'un complexe violet à partir du calcium et de l'o-crésolphtaléine complexone selon les spécifications du manufacturier (TECO Diagnostics, Californie, USA). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de calcium. En utilisant une courbe de calibration, les résultats obtenus ont été exprimés en µg/mg de tissu sec.

### **5.4.2. Localisation du calcium dans la paroi artérielle**

Il est également possible de détecter la présence de cristaux d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) sur des coupes histologiques. La 3<sup>e</sup> section de l'aorte a été mise dans la paraffine et des coupes de 7 µm d'épaisseur ont été effectuées puis colorées au Von Kossa. Cette coloration au nitrate d'argent ( $\text{AgNO}_3$ ) révèle les dépôts de sel de calcium. Le  $\text{Ca}^{2+}$  est remplacé par l' $\text{Ag}^+$  qui, une fois réduit par une exposition à une lumière intense, forme un dépôt noir, visible au microscope.

### **5.4.3. Immunohistochimie**

La 3<sup>e</sup> section de l'aorte a été fixée dans une solution de cacodylate/PFA 4% et enrobée dans la paraffine. Des coupes de 7 µm d'épaisseur ont été montées sur des lames



et débarrassées de la paraffine avec du xylène suivit d'une hydratation progressive dans des bains d'éthanol (100% à 50%). Chaque coupe a été incubée toute une nuit à la température de la pièce avec un anticorps primaire contre l'ET-1 (1:200; Chemicon) et la iNOS (1:100; Abcam). Les dilutions ont été faites dans un tampon tris salin contenant du tween-20 (TBS-t), 0,2 % d'albumine de sérum bovin (BSA) et 0,5 % de sérum normal (chèvre). Après les lavages avec du TBS-t / 2,5% NaCl puis du TBS-t seul, les lames ont été hybridées avec l'anticorps secondaire approprié conjugué à la biotine. La biotine a été détectée en utilisant le Vectastain ABC-AP kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, U.S.A.) et la couleur a été développée en utilisant un tampon Tris pH 9,4 auquel du naphthol AS-MX phosphate (Sigma-Aldrich), du levamisole (Sigma-Aldrich) et du Fast Red TR (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés. Une fois la révélation terminée et les derniers lavages effectués, des lamelles sont fixées sur les coupes d'aorte en utilisant une gelée composée de gélatine, de glycérol et de phénol (*Kayser's G Jelly mounting medium*). Le contrôle positif pour la iNOS est une coupe de rate induite avec des lipopolysaccharides (LPS).

#### **5.4.4. Immunobuvardage**

L'expression aortique de la eNOS, de la phospho-eNOS (p-eNOS; sérine 1177), de la iNOS et de la GCs (n=4 à 9 par groupe) a été quantifiée par immunobuvardage de type Western en utilisant une solution d'extraction contenant 0,6% de dodécyl sulfate de sodium (SDS), 5% de Triton X-100, 0,2% d'aprotinine, 0,25% de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), 0,1% de leupeptine, 0,1% de pepstatine A dans un tampon de phosphate salin (PBS; pH 7.4). Une quantité égale de protéines a été déposée dans chaque puits (40µg) et a été séparée sur des gels contenant 7,5% de (SDS)-polyacrylamide. Les protéines ont été hybridées avec les anticorps pour la eNOS (1:2500 BD Transduction Laboratories), la p-eNOS (1:1000; Cell Signaling), la iNOS (1:1000; BD Transduction Laboratories) et la GCs (1:200; USBiological).

## **5.4.5. Dosage de l'endothéline tissulaire**

### **5.4.5.1. Extraction tissulaire de l'endothéline**

La crosse aortique a été prélevée et congelée à -80°C. Elle a été ensuite pesée puis homogénéisée pendant 15 à 30 secondes à l'aide d'un polytron dans une solution d'extraction à 4°C contenant 1N d'acide chlorhydrique (HCl), 1% d'acide formique, 1% d'acide trifluoroacétique (TFA) et 1% NaCl. L'homogénat a été ensuite centrifugé à 3000g à une température de 4°C pendant 30 minutes. Le surnageant a été récupéré pour l'extraction sur colonnes C18 Sep-Pak.

### **5.4.5.2. Préparation des échantillons et extraction sur colonne**

Le surnageant a été récupéré puis 100 µL d'ET marquée (1000 cpm d'<sup>125</sup>I-ET) et 2 ml de TFA 0,2% y ont été ajoutés. Avant de verser les échantillons sur les colonnes, celles-ci ont été lavées avec 10 mL d'acétonitrile, activées avec 4 mL (4x1mL) de solution d'acétonitrile 60% et de TFA 0,1% puis ont été rincées avec 20 mL (4x5mL) de solution de TFA 0,1%. Une fois versé sur les colonnes, chaque échantillon a été élué avec 3 mL (3x1mL) d'une solution d'acétonitrile 60% et de TFA 0,1%. L'éluant a été récupéré et évaporé au Speed Vac pendant toute la nuit puis les taux d'ET tissulaire ont été déterminés par une méthode radioimmunologique. Les valeurs ont été exprimées en picogramme/milligramme de tissu (pg/mg) [454].

## **5.5. Mesure des nitrates plasmatiques**

Le sang a été prélevé sur les rats anesthésiés dans des tubes contenant de l'EDTA puis centrifugés pendant 15 minutes à 10 000 rpm. Le plasma recueilli est filtré à l'aide de filtres d'ultrafiltration de 10 kDa (Millipore) et les concentrations totales de nitrates ont été

mesurées par une méthode colorimétrique selon les procédures du fabricant (Cayman Chemicals).

## **5.6. Modèle *ex vivo* de calcification artérielle médiale sur des aortes en culture**

Ce modèle a été créé pour palier à certaines difficultés rencontrées avec le modèle animal. En effet, avec ce modèle, il est possible de tester certaines molécules qui normalement seraient toxiques pour l'animal ou un traitement pendant plusieurs semaines chez l'animal serait trop coûteux. De plus, contrairement à la culture de CMLVs, la culture d'aortes permet de conserver les interactions entre les différentes composantes des vaisseaux.

Les aortes de rats Wistar témoins (350-375g) ont été prélevées puis dégraissées sous binoculaire. Elles ont ensuite été coupées en trois sections et placées dans un milieu de culture sans sérum (éviter l'angiogénèse) contenant des concentrations déterminées de calcium (1,8 mmol/L) et de phosphate (0,9 mmol/L). Afin d'induire une calcification médiale, 10 µmol/L de warfarine a été ajoutée au milieu deux jours avant d'augmenter la concentration de phosphate à 3,9 mmol/L. Tout comme le modèle animale, le modèle de culture d'aortes peut être fait selon un protocole d'initiation ou de progression de la calcification :

- Initiation de la calcification : les artères sont cultivées pendant 4 jours en présence de warfarine et d'une concentration accrue en phosphate par rapport au milieu de culture de base. Les inhibiteurs, activateurs, antagonistes sont ajoutés en même temps que le phosphate.
- Progression de la calcification : la calcification se développe pendant 4 jours suite à l'administration de warfarine et de phosphate. Les différents inhibiteurs, activateurs peuvent être ajoutés tout en continuant à ajouter de la warfarine et du phosphate dans le milieu de culture.

À la fin du traitement, les aortes ont été rincées avec du PBS et un segment a été mis à sécher pour doser le calcium. Le reste a été conservé au congélateur pour faire des immunobuvardages et/ou fixé dans du PFA pour faire de l'immunohistochimie.

## 5.7. Médicaments

Dans les études utilisant le modèle animal WVK, le sinitrodil a été gentiment donné par la compagnie Italfarmaco, la warfarine et le L-NAME ont été achetés chez Sigma-Aldrich Co, la vitamine K provient de chez Spectrum Chemical et les comprimés de Cialis ont été achetés dans une pharmacie.

Dans les études utilisant le modèle *ex vivo* de culture d'aorte, le phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) provient de chez Fisher Scientific; la warfarine et le T-1032 ont été achetés chez Sigma-Aldrich Co tandis que le DETA/NO provient de chez Cayman Chemical.

## 5.8. Statistiques

Les valeurs présentées ont été exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (*standard error of the mean*) dans chaque groupe de traitement. Les analyses statistiques ont été réalisées par ANOVA et quand celles-ci étaient significatives ( $P < 0,05$ ), un test post-hoc de type Bonferroni a été fait. Si les valeurs analysées n'étaient pas paramétriques suite aux résultats significatifs du test Bartlett, le test post-hoc Dunn pour des comparaisons multiples mais non-paramétriques a été effectué. Des valeurs significatives étaient obtenues quand  $P < 0,05/\text{nombre de comparaisons}$ , (par exemple, pour 5 comparaisons, la valeur de  $P$  pour chaque comparaison doit être de  $< 0,01$ ). Pour tous les tests, les comparaisons faites étaient : Témoin vs WVK et WVK + médicament vs WVK. Dans les études de cinétiques des parties initiation et progression de la calcification, les analyses statistiques des groupes WVK ont été réalisées par ANOVA (paramétrique ou non paramétriques selon le résultat du test Bartlett) suivi d'un test de comparaisons multiples (Bonferroni ou Dunn; Témoin vs

WVK). Pour les groupes +L-NAME, un test de t de Student a été réalisé à chaque temps de traitement si le test d'homogénéité de variance Bartlett était non-significatif. Si le test Bartlett était significatif, un test Mann-Whitney a été réalisé pour chaque temps de traitement. Un résultat significatif avait un  $P < 0,05$  (WVK vs L-NAME).

## 5.9. Études

Afin de mieux comprendre la structure des résultats, voici un résumé des études qui ont été effectuées au cours de mon doctorat, les différentes abréviations utilisées dans les tableaux et les graphiques ainsi que leur signification.

### - Rôle physiologique du NO

- *Bloquer la production de NO par l'administration de L-NAME*
  - Initiation de calcification (traitement de 4 semaines)
    - » Arrêt précoce du traitement L-NAME
      - a. Semaine 1, 2, 3 et 4: respectivement 1, 2, 3 et 4 semaines de traitement WVK seul (WVK) ou de traitement WVK avec du L-NAME (20 mg/kg/jour).
    - » Poursuite du traitement L-NAME
      - a. WVK4 : 4 semaines de traitement WVK;
      - b. +L-NAME4 : 4 semaines de traitement WVK avec du L-NAME (20 mg/kg/jour).
  - Progression de la calcification (traitement 8 semaines)
    - » Arrêt précoce du traitement L-NAME
      - a. Semaine 5, 6, 7 et 8: respectivement 5, 6, 7, 8 semaines de traitement WVK ou 4 semaines de traitement WVK seul suivi du traitement WVK avec du L-NAME (20 mg/kg/jour) pendant 1 (semaine 5), 2 (semaine 6), 3 (semaine 7) et 4 semaine (semaine 8).
    - » Poursuite du traitement L-NAME
      - a. WVK : 8 semaines de traitement WVK;
      - b. +L-NAME : 4 semaines de WVK et L-NAME précédées de 4 semaines de traitement WVK seul.

- **Rôle thérapeutique du NO**

- *Administration exogène de NO*
  - Effets aigus du sinitrodil
    - a. Tem : témoins qui ont reçu une injection de salin;
    - b. Tem+Sin : témoins qui ont reçu une injection de sinitrodil (1 mg/kg);
    - c. WVK : rats WVK 8 semaines qui ont une injection de salin;
    - d. WVK+Sin : rats WVK 8 semaines qui ont une injection de sinitrodil (1 mg/kg).
  
  - Effets chroniques du sinitrodil
    - a. WVK : 8 semaines de traitement WVK;
    - b. +Sin12, +Sin100 : 4 semaines de traitement WVK avec du sinitrodil à des doses 12 et de 100 mg/kg/jour après 4 semaines de traitement WVK seul;
  
- *Augmentation des effets du NO endogène*
  - Effet du tadalafil dans l'initiation de la calcification
    - a. WVK4 : 4 semaines de traitement WVK;
    - b. +Tad4 : 4 semaines de traitement WVK avec du tadalafil (2 mg/kg/jour).
  
  - Effets du tadalafil dans la progression de la calcification
    - a. WVK8 : 8 semaines de traitement WVK;
    - b. +Tad8 : 4 semaines de traitement WVK avec du tadalafil (2 mg/kg/jour) après 4 semaines de traitement WVK seul.

## **6. Résultats**

### **6.1. Rôle physiologique du NO**

#### **6.1.1. Bloquer la production de NO par l'administration de L-NAME**

Afin d'étudier l'implication du NO dans la calcification vasculaire et la rigidité artérielle, la production de NO a été inhibée par l'administration d'un analogue de la L-arginine, le L-NAME. Cette étude a été divisée en deux volets : initiation de la calcification et progression de la calcification.

##### **6.1.1.1. Initiation de la calcification (traitement 4 semaines)**

Dans la partie initiation de la calcification, les traitements WVK ainsi que WVK et L-NAME font partie d'une étude de 4 semaines où le L-NAME (20 mg/kg/jour) a été administré en même temps que débute l'administration de la warfarine et de la vitamine K (WVK). La partie initiation de la calcification a été subdivisée en deux sections : arrêt précoce du traitement et poursuite du traitement. Dans ces deux sections, le protocole de traitement est le même sauf que dans la section arrêt précoce du traitement, le L-NAME a été arrêté 3 jours avant les sacrifices tandis que dans l'autre, l'administration du L-NAME a été poursuivi jusqu'au moment des sacrifices. Il est à noter que les échelles des graphiques ont été harmonisées afin de faciliter la comparaison. Il a été toutefois plus difficile d'uniformiser les graphiques représentant le calcium étant donné la variation plus importante de ce paramètre d'une étude à l'autre. Ainsi, dans cette partie, les graphiques du calcium ont une échelle allant jusqu'à 10 µg/mg de tissu.

*a. Arrêt précoce du traitement L-NAME*

La section arrêt précoce du traitement de la partie initiation de la calcification consiste en une cinétique sur 4 semaines de traitement où des mesures hémodynamiques, des mesures de calcium et d'ET ainsi que l'expression protéique ont été effectuées à 1, 2, 3 et 4 semaines de traitement. Ainsi, dans les graphiques, les cercles noirs correspondent au traitement WVK seul (WVK) tandis que les cercles blancs correspondent au traitement WVK et L-NAME (+L-NAME). Dans les tableaux, les colonnes semaine 1, 2, 3 et 4 correspondent respectivement à 1, 2, 3 et 4 semaines de traitement WVK seul (WVK) ou de traitement WVK et L-NAME (+L-NAME). Le groupe témoin est composé de rats du même âge que les rats traités, mais qui n'ont pas été manipulés ou traités. Dans cette section, les rats témoins ont le même âge que les rats traités pendant 4 semaines.

Dans cette section, le traitement WVK a modifié significativement la fréquence cardiaque, la PS, la PD et la PP. En effet, la fréquence cardiaque est, quant à elle, significativement diminuée à 4 semaines de traitement WVK tandis que la PS a été augmentée à la semaine 3, la PD à la semaine 1 et la PP aux semaines 2, 3 et 4. Le traitement WVK+L-NAME a, quant à lui, augmenté significativement la PD et conséquemment la PAM à la semaine 3. La PAM est également plus élevée à la 1<sup>re</sup> semaine de traitement WVK+L-NAME. La fréquence cardiaque a par contre été diminuée par le traitement L-NAME. Elle est significativement plus basse que dans le groupe WVK. De plus, à l'exception de la semaine 2, tous les rats +L-NAME ont un poids plus faible que les rats WVK. Cette moindre prise de poids peut être attribuable au fait que les groupes L-NAME ont reçu de la nourriture en poudre au lieu des granules. Cette forme de nourriture est moins intéressante à manger pour des rongeurs. Il faut rappeler que le traitement L-NAME a été arrêté 3 jours avant les sacrifices afin d'évaluer les effets chroniques du L-NAME. C'est pour cette raison que les paramètres hémodynamiques ont été peu modifiés dans les groupes WVK+L-NAME. Le tableau 6 rassemble l'évolution des paramètres hémodynamiques au cours de l'initiation de la calcification.



**Tableau 6 : Évolution des paramètres hémodynamiques lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et du L-NAME selon un protocole d'initiation de la calcification.**

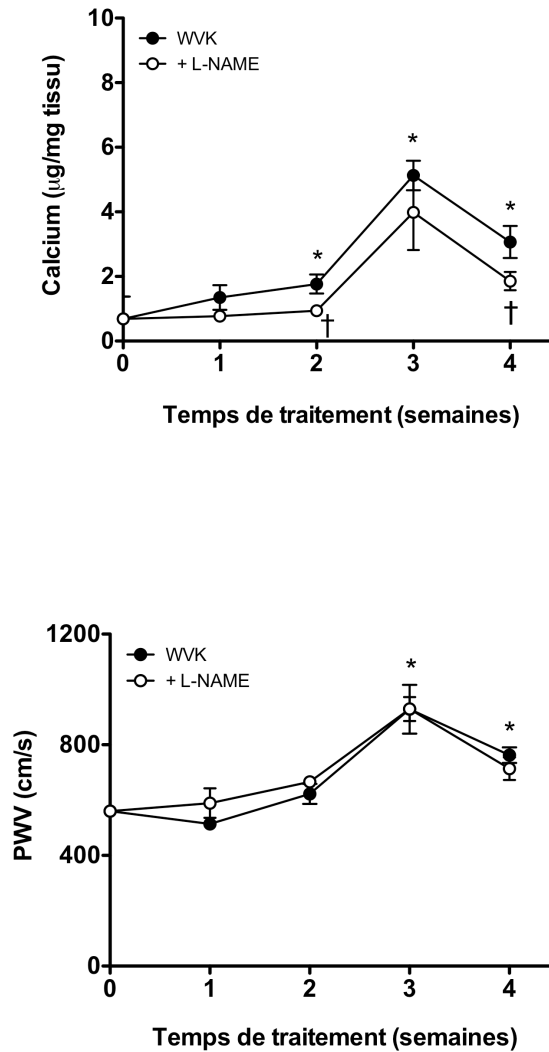
Paramètres	Groupes	Témoin	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 4
n	WVK	14	6	7	5	17
	+L-NAME		5	6	6	18
Poids (g)	WVK	359,9 ± 19,1	294,7 ± 3,2	330,7 ± 12,6	363,2 ± 5,7	394,6 ± 5,6
	+L-NAME		273,7 ± 18,0 †	323,8 ± 2,7	335,3 ± 8,3 †	374,3 ± 5,4 †
Fréquence cardiaque (bpm)	WVK	407,8 ± 10,0	362,2 ± 23,0	401,0 ± 18,1	393,4 ± 24,0	344,1 ± 12,0 *
	+L-NAME		391,3 ± 19,6	345,8 ± 15,1	422,5 ± 8,2	379,1 ± 10,1
PS (mmHg)	WVK	146,6 ± 2,5	134,4 ± 2,2	154,8 ± 6,6	175,0 ± 10,7 *	152,7 ± 5,3
	+L-NAME		149,3 ± 11,9	142,5 ± 7,5	196,5 ± 6,4	166,9 ± 6,2
PD (mmHg)	WVK	111,1 ± 2,8	92,4 ± 2,9 *	105,4 ± 6,3	115,8 ± 6,5	106,7 ± 3,0
	+L-NAME		111,0 ± 7,5	97,2 ± 7,1	140,1 ± 4,1 †	112,1 ± 3,2
PAM (mmHg)	WVK	122,9 ± 2,6	106,4 ± 2,6	121,9 ± 6,3	135,6 ± 7,8	122,9 ± 3,4
	+L-NAME		126,8 ± 8,1 †	112,3 ± 7,2	163,3 ± 1,7 †	130,4 ± 3,8
PP (mmHg)	WVK	35,4 ± 1,2	42,1 ± 1,6	49,4 ± 1,6 *	59,2 ± 4,8 *	48,8 ± 2,7 *
	+L-NAME		47,5 ± 2,2	45,3 ± 2,1	56,3 ± 3,9	54,8 ± 4,9

Semaine 1, 2, 3 et 4: respectivement 1, 2, 3 et 4 semaines de traitement WVK seul (WVK) ou de traitement WVK avec du L-NAME (20 mg/kg/jour). Les valeurs de PS, PD, PAM et de PP ont été mesurées dans la carotide. \*  $P < 0,0125$  vs Témoins; †  $P < 0,05$  vs WVK Voir la section Matériel et méthode pour plus de détails sur les analyses statistiques. Les traitements ont été arrêtés 3 jours avant les mesures.

À la fin des traitements, la mesure des paramètres hémodynamiques a permis de calculer un indice de rigidité artérielle, le PWV. Ainsi comme le montre la figure 13, le traitement WVK a augmenté la rigidité artérielle. L'augmentation du PWV est significative à partir de 3 semaines de traitement WVK, par contre, l'administration de L-NAME ne l'a pas modifié.

Lors des sacrifices, l'aorte a été prélevée et les taux de calcium au niveau de sa paroi ont été mesurés. Les concentrations de calcium aortique ont été significativement augmentées à partir de la 2<sup>e</sup> semaines de traitement WVK. Il est possible d'observer que la calcification dans les groupes recevant du L-NAME est plus faible à tous les temps de traitement comparativement au traitement WVK seul et même qu'à 2 et 4 semaines de traitement WVK+L-NAME, la déposition de calcium dans l'aorte est significativement plus basse.

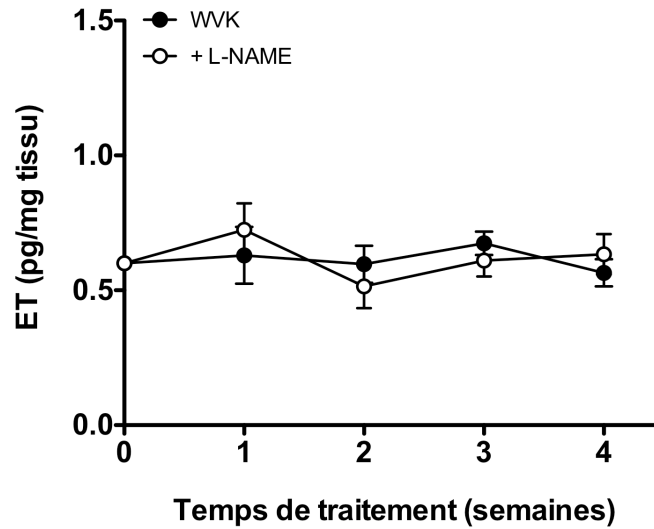
En comparant les graphiques du calcium et du PWV, il est possible d'observer leur forme similaire. En effet, le PWV et le calcium ont évolués de la même façon au cours des 4 semaines de traitement WVK. Les deux paramètres ont eu une augmentation à 3 semaines, suivie d'une baisse à 4 semaines montrant bien le lien étroit entre ces deux paramètres.



**Figure 13: Évolution des taux de calcium aortiques et du PWV lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK avec du L-NAME selon un protocole d'initiation de la calcification.**

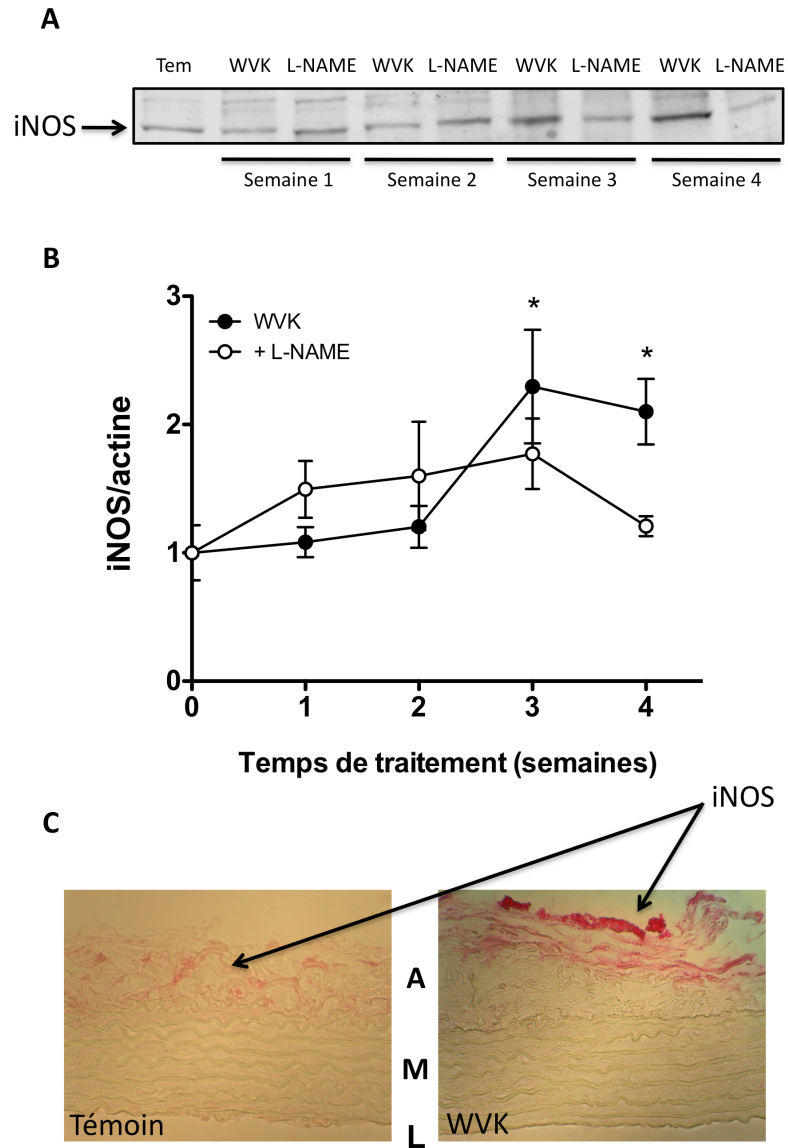
WVK : 4 semaines de traitement WVK; +L-NAME : 4 semaines de traitement WVK et L-NAME (20 mg/kg/jour). **A** : Calcium aortique et **B** : PWV; \*  $P < 0,0125$  vs Témoins, un ANOVA non-paramétrique Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples Dunn a été effectué pour A et un ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple Bonferroni a été effectué pour B; pour les groupes +L-NAME; †  $P < 0,05$  vs WVK, un test Mann-Whitney a été effectué pour A et un test de t de Student a été effectué pour B à chaque temps de traitement.

En plus du calcium et des paramètres hémodynamiques, l'ET aortique ainsi que plusieurs protéines ont également été mesurées. Contrairement à d'autres études qui ont été réalisées dans notre laboratoire, le traitement WVK n'a pas augmenté les concentrations d'ET. Le traitement WVK+L-NAME n'a également pas eu d'effet (figure 14). Le traitement WVK a, par contre, augmenté significativement l'expression de la iNOS à 3 et 4 semaines de traitement. Malgré une tendance, l'administration de L-NAME n'a pas diminuée l'expression de la iNOS qui est principalement exprimée au niveau de l'adventice. Il est également possible d'observer une expression de la iNOS au niveau de l'endothélium, mais de façon beaucoup moins importante (figure 15 B et C). D'autres protéines comme la eNOS, la p-eNOS et la GCs ont également été mesurées par immunobuvardage de type western. Le tableau 7 rassemble les mesures d'expression de ces protéines. Parmi celles-ci, il est possible de remarquer l'augmentation d'expression de la eNOS de 53% à 4 semaines de traitements, ce qui est considérable malgré que cette augmentation ne soit pas significative.



**Figure 14:** Évolution des taux d'endothéline aortique lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et du L-NAME selon un protocole d'initiation de la calcification.

WVK : 4 semaines de traitement WVK; +L-NAME : 4 semaines de traitement WVK et L-NAME (20 mg/kg/jour). Pour les comparaisons Témoins vs WVK, un ANOVA non-paramétrique Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples Dunn a été effectué; pour les comparaisons WVK vs +L-NAME, un test Mann-Whitney a été effectué à chaque temps de traitement.



**Figure 15: Évolution de l'expression de la iNOS lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et L-NAME ainsi que sa localisation dans la paroi vasculaire selon un protocole d'initiation de la calcification.**

WVK : 4 semaines de traitement WVK; +L-NAME : 4 semaines de traitement WVK et L-NAME (20 mg/kg/jour). **A** : Image représentative d'un immunobuvardage de type Western. **B** : Représentation graphique de l'expression de la iNOS; \*  $P < 0,0125$  vs Témoins, un ANOVA non-paramétrique Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples Dunn a été effectué; pour les comparaisons WVK vs +L-NAME, un test Mann-Whitney a été effectué à chaque temps de traitement. **C** : Coupe transversale d'aorte montrant la localisation d'iNOS; A = adventice, M = média, L = lumière.

**Tableau 7 : Évolution de l'expression de la eNOS, la p-eNOS, la iNOS et la GCs lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et du L-NAME selon un protocole d'initiation de la calcification.**

Paramètres	Groupes	Témoin	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 4
Expression eNOS (ratio eNOS/actine)	WVK	1,00 ± 0,10	1,28 ± 0,12	1,07 ± 0,15	1,33 ± 0,16	1,53 ± 0,34
	+L-NAME		1,10 ± 0,10	1,23 ± 0,21	1,12 ± 0,19	1,11 ± 0,18
Expression p-eNOS (ratio p-eNOS/actine)	WVK	1,00 ± 0,08	1,19 ± 0,10	0,93 ± 0,13	1,18 ± 0,13	1,26 ± 0,23
	+L-NAME		1,00 ± 0,06	1,07 ± 0,17	0,93 ± 0,09	1,00 ± 0,13
Expression iNOS (ratio iNOS/actine)	WVK	1,00 ± 0,21	1,08 ± 0,12	1,2 ± 0,16	2,3 ± 0,44 *	2,1 ± 0,26 *
	+L-NAME		1,50 ± 0,22	1,6 ± 0,42	1,77 ± 0,27	1,21 ± 0,08
Expression GCs (ratio sGC/actine)	WVK	1,00 ± 0,23	0,99 ± 0,26	1,11 ± 0,23	1,25 ± 0,32	2,54 ± 1,11
	+L-NAME		0,81 ± 0,17	1,06 ± 0,32	0,70 ± 0,16	1,45 ± 0,51

Semaine 1, 2, 3 et 4: respectivement 1, 2, 3, 4 semaines de traitement WVK seul (WVK) ou de traitement WVK avec du L-NAME (20 mg/kg/jour); Les comparaisons sont \*  $P < 0,0125$  vs Témoins et WVK vs +L-NAME. Voir la section Matériel et méthode pour plus de détails sur les analyses statistiques. Les traitements ont été arrêtés 3 jours avant les mesures.

Comme le L-NAME possède des effets aigus sur la pression artérielle, son administration a été arrêtée 3 jours avant la mesure des paramètres hémodynamiques. Les résultats précédents représentent donc les effets chroniques du L-NAME. Cependant, certains paramètres sont modulés de façon aiguë. En effet, l'expression protéique ainsi que leur phosphorylation sont souvent modulées rapidement. L'arrêt du traitement, qui est ici de 3 jours, entraîne un retour à des valeurs basales, empêchant l'évaluation de l'influence réelle des paramètres mesurés. Afin de palier à ce problème, une étude a été réalisée sans l'arrêt du L-NAME.

*b. Poursuite du traitement de L-NAME*

La section poursuite du traitement de la partie initiation de la calcification consiste en un traitement de 4 semaines WVK et WVK et L-NAME où des mesures hémodynamiques, des mesures de calcium et d'expression protéique ont été effectuées à 4 semaines de traitement. Dans cette section, le L-NAME a été administré jusqu'au moment des sacrifices. Ainsi, dans les graphiques et tableaux, le groupe WVK4 correspond au traitement WVK seul de 4 semaines tandis que le groupe +L-NAME4 correspond au traitement WVK et L-NAME de 4 semaines. Le groupe témoin est composé de rats du même âge que les rats traités, mais qui n'ont pas été manipulés ou traités. Dans cette section, les rats témoins ont le même âge que les rats traités pendant 4 semaines.

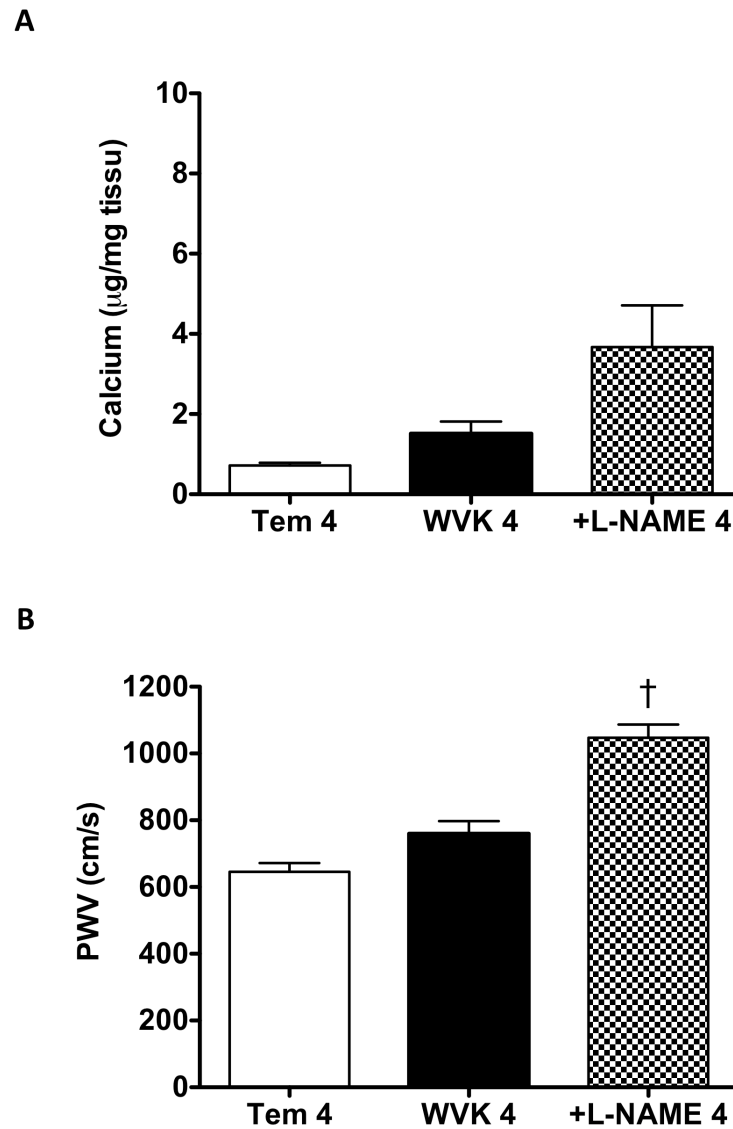
Étant donné que le L-NAME inhibe la production de NO, la PS, la PD et la PAM ont été significativement augmentées comparativement au traitement WVK seul (tableau 8). Le traitement WVK a significativement augmenté la PP, une des caractéristiques du modèle WVK. Normalement, le traitement WVK est caractérisé par une PS, une PP, une déposition de calcium et un PWV augmentés. Toutefois, dans la présente étude et pour une raison inconnue, ni la PS, ni le calcium, ni le PWV ont été significativement augmentés. Autrement dit, les résultats se tiennent, mais la faible calcification est inexplicable, sauf par le fait qu'elle pourrait survenir plus tardivement qu'à 4 semaines. L'administration de L-NAME a augmenté significativement la fréquence cardiaque, la PS, la PD et la PAM sans toutefois influencer davantage la PP par rapport au groupe WVK. De plus, le L-NAME a augmenté la déposition de calcium dans l'aorte ainsi que le PWV. Toutefois, seul le PWV a été modifié de manière significative (tableau 8 et figure 16). Ces résultats étaient attendus puisque le L-NAME a été continué jusqu'au moment des sacrifices. En effet, les valeurs des paramètres hémodynamiques dans le groupe +L-NAME4 reflètent les effets aigus que possède le L-NAME.



**Tableau 8 : Effet de l'administration chronique du traitement WVK et du L-NAME sur les paramètres hémodynamiques. (poursuite du L-NAME)**

Paramètres/Groupes	Témoins	WVK4	+L-NAME4
<b>n</b>	6	10	10
<b>Poids (g)</b>	447,0 ± 8,1	417,5 ± 8,9	386,9 ± 8,8 †
<b>Fréquence cardiaque (bpm)</b>	349,0 ± 9,3	347,9 ± 10,3	394,0 ± 12,8 †
<b>PS (mmHg)</b>	147,7 ± 5,2	147,5 ± 4,3	191,7 ± 4,7 †
<b>PD (mmHg)</b>	110,2 ± 4,6	95,6 ± 2,8 *	131,3 ± 4,3 †
<b>PAM (mmHg)</b>	122,7 ± 4,7	112,9 ± 3,0	151,4 ± 4,3 †
<b>PP (mmHg)</b>	37,5 ± 2,6	51,9 ± 3,3 *	60,5 ± 2,5

WVK4 : 4 semaines de traitement WVK; +L-NAME4 : 4 semaines de traitement WVK avec du L-NAME (20 mg/kg/jour). Les valeurs de PS, PD, PAM et de PP ont été mesurées dans la carotide. \*  $P < 0,025$  vs Témoins; †  $P < 0,025$  vs WVK. Voir la section Matériel et méthode pour plus de détails sur les analyses statistiques. L'administration de L-NAME a été poursuivie jusqu'au moment des sacrifices.



**Figure 16: Effet du traitement WVK et du L-NAME sur les taux de calcium dans l'aorte selon un protocole d'initiation de la calcification (poursuite du L-NAME).**

WVK : 4 semaines de traitement WVK; +L-NAME : 4 semaines de traitement WVK et L-NAME (20 mg/kg/jour). L'administration de L-NAME a été poursuivie jusqu'au moment des sacrifices. **A** : Calcium aortique; un ANOVA non-paramétrique Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples Dunn a été effectué. **B** : PWV ; †  $P < 0,025$  vs WVK, un ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples Bonferroni a été effectué.

Les mêmes protéines ont été mesurées et dans la présente étude, c'est la eNOS qui a été significativement augmentée et non la iNOS. Même si ces modulations ne sont pas significatives, le traitement WVK a quand même augmenté la phosphorylation de la eNOS de 38% et légèrement diminué l'expression de la GCs. L'expression de cette dernière est davantage diminuée lors de l'administration de L-NAME. En fait, toutes les protéines ont une expression plus faible dans le groupe +L-NAME4 comparativement au traitement WVK seul (tableau 9).

**Tableau 9 : Expression de la eNOS, la phospho-eNOS, la iNOS et la GCs au cours des traitements WVK ainsi que WVK et L-NAME selon un protocole d'initiation de la calcification (poursuite du L-NAME).**

Paramètres/Groupes	Témoins	WVK4	+L-NAME4
Expression eNOS (ratio eNOS/actine)	1,00 ± 0,13	1,49 ± 0,10 *	1,23 ± 0,10
Expression p-eNOS (ratio p-eNOS/actine)	1,00 ± 0,12	1,38 ± 0,09	1,11 ± 0,11
Expression iNOS (ratio iNOS/actine)	1,00 ± 0,46	1,07 ± 0,13	0,82 ± 0,03
Expression GCs (ratio sGC/actine)	1,00 ± 0,52	0,87 ± 0,15	0,69 ± 0,10

WVK4 : 4 semaines de traitement WVK; +L-NAME4 : 4 semaines de traitement WVK avec du L-NAME (20 mg/kg/jour). \*  $P < 0,025$  vs Témoins. Voir la section Matériel et méthode pour plus de détails sur les analyses statistiques. L'administration de L-NAME a été poursuivi jusqu'au moment des sacrifices.

Cette étude comportait également le volet progression de la calcification où celle-ci a été induite pendant 4 semaines et à partir de la 5<sup>e</sup> semaine, en plus de l'administration de warfarine et de vitamine K, le L-NAME a également été ajouté au traitement.

### 6.1.1.2. Progression de la calcification (traitement 8 semaines)

Dans la partie progression de la calcification, les traitements WVK ainsi que WVK et L-NAME font partie d'une étude de 8 semaines où le L-NAME a été administré à partir de la 5<sup>e</sup> semaine de traitement WVK et ce pour 4 semaines. Le L-NAME a donc été commencé lorsque la calcification était bien établie. Tout comme dans la partie initiation de la calcification, cette partie de l'étude a été subdivisée en deux sections : arrêt précoce du traitement L-NAME et poursuite du traitement L-NAME. Dans les deux sections, le protocole de traitement est le même sauf que dans la section arrêt précoce du traitement, le L-NAME a été arrêté 3 jours avant les sacrifices tandis que dans l'autre, l'administration du L-NAME a été poursuivie jusqu'au moment des sacrifices. Il est également à noter que les échelles des graphiques ont été harmonisées afin de faciliter la comparaison. Dans cette partie, les graphiques du calcium ont une échelle allant jusqu'à 20 µg/mg de tissu.

#### *a. Arrêt précoce du traitement L-NAME*

La section arrêt précoce du traitement de la partie progression de la calcification consiste en une cinétique sur 8 semaines de traitement où des mesures hémodynamiques, des mesures de calcium et d'ET ainsi que l'expression de différentes protéines ont été effectuées à 5, 6, 7 et 8 semaines de traitement. Ainsi, dans les graphiques, les cercles noirs correspondent au traitement WVK seul (WVK) tandis que les cercles blancs correspondent au traitement WVK et L-NAME (+L-NAME). Dans les tableaux, les colonnes semaine 5, 6, 7 et 8 correspondent respectivement à 5, 6, 7 et 8 semaines de traitement WVK seul (WVK) et à 1, 2, 3, 4 semaines de traitement WVK et L-NAME (+L-NAME) commencé à la 5<sup>e</sup> semaine de traitement WVK. Le groupe témoin est composé de rats du même âge que les rats traités, mais qui n'ont pas été manipulés ou traités. Dans cette section, les rats témoins ont le même âge que les rats traités pendant 8 semaines et l'administration de L-NAME a été arrêtée 3 jours avant les sacrifices.

Le tableau 10 rassemble toutes les mesures hémodynamiques faites au cours de l'étude. Comparativement aux témoins, le traitement WVK a augmenté significativement la PP, autre indice de rigidité artérielle, à tous les temps de traitement. Le traitement WVK a également augmenté la PS, mais cette hausse n'est significative qu'à la semaine 3. Ses valeurs ont été davantage augmentées lors de l'administration de L-NAME (même si ce traitement a été cessé pendant 3 jours avant la prise des mesures). La PS est même significativement plus élevée que les groupes WVK seuls à 6, 7 et 8 semaines de traitement. L'administration de L-NAME a également eu des effets sur le poids des animaux, sur la PP ainsi que sur la PD. Cette hausse de la PD a eu pour conséquence d'augmenter significativement la PAM.

Comme le montre la figure 17, le traitement WVK augmente la calcification vasculaire. Dans cette étude, la déposition de calcium est significativement différente des témoins à partir de la 6<sup>e</sup> semaine de traitement WVK. Le L-NAME a, quant à lui, amplifié significativement les effets du traitement WVK sur la calcification dans l'aorte.

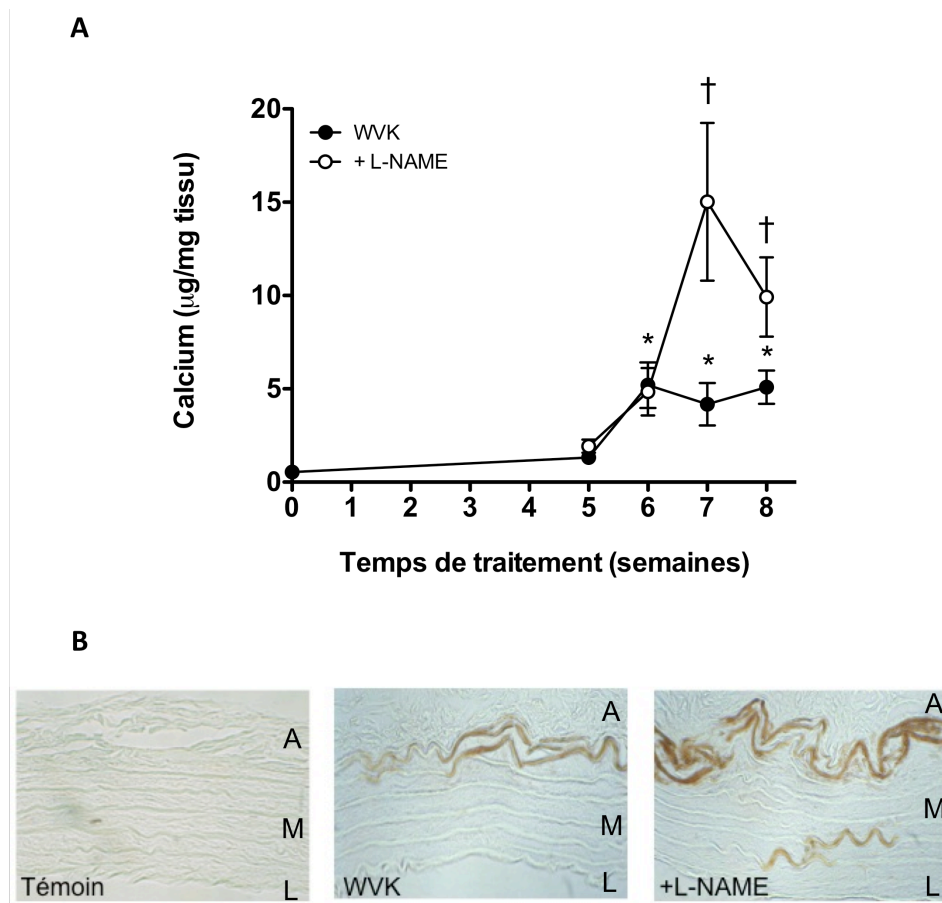
Les coupes transversales d'aorte colorées au Von Kossa ont permis d'observer la déposition de calcium sur les lamelles élastiques près de l'adventice dans les groupes WVK. Dans le groupe +L-NAME, en plus du calcium sur les lamelles élastiques près de l'adventice, le calcium s'est également déposé sur l'élastine plus près de l'intima. Ainsi, l'amplification de la calcification observée dans le groupe +L-NAME se traduirait par une déposition de calcium qui ne se limiterait pas aux lamelles élastiques externes, mais également à celles plus internes (figure 17B).

**Tableau 10 : Évolution des paramètres hémodynamiques lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et du L-NAME selon un protocole de progression de la calcification.**

Paramètres	Groupes	Témoin	Semaine 5	Semaine 6	Semaine 7	Semaine 8
n	WVK	13	7	8	7	18
	+L-NAME		6	8	4	14
Poids (g)	WVK	522,3 ± 12,4	432,9 ± 8,6	426,4 ± 6,2	447,6 ± 15,7	473,1 ± 6,8 *
	+L-NAME		366,7 ± 14,2 †	422,5 ± 4,7	447,6 ± 12,7	444,9 ± 9,6 †
Fréquence cardiaque (bpm)	WVK	349,8 ± 12,4	363,1 ± 9,0	390,6 ± 4,5	384,0 ± 10,3	354,7 ± 14,7
	+L-NAME		363,9 ± 26,2	388,3 ± 14,5	342,8 ± 19,4	331,6 ± 12,8
PS (mmHg)	WVK	149,8 ± 5,5	169,7 ± 4,3	175,9 ± 6,4 *	170,7 ± 4,9	158,8 ± 6,6
	+L-NAME		189,1 ± 12,6	218,3 ± 6,4 †	225,8 ± 6,3 †	188,0 ± 12,6 †
PD (mmHg)	WVK	114,9 ± 3,7	115,0 ± 4,0	113,6 ± 3,2	121,3 ± 2,8	110,7 ± 5,3
	+L-NAME		150,3 ± 3,5 †	150,0 ± 4,2 †	148,3 ± 0,85 †	130,4 ± 9,1
PAM (mmHg)	WVK	126,5 ± 4,2	133,2 ± 3,4	134,4 ± 4,0	137,8 ± 3,3	126,8 ± 5,7
	+L-NAME		166,9 ± 4,5 †	172,7 ± 4,8 †	174,2 ± 3,0 †	149,6 ± 10,0 †
PP (mmHg)	WVK	34,9 ± 2,4	54,7 ± 4,7 *	62,3 ± 4,2 *	49,5 ± 3,0 *	48,1 ± 2,5 *
	+L-NAME		49,8 ± 5,6	68,3 ± 3,0	77,7 ± 7,8 †	57,6 ± 4,4

Semaine 5, 6, 7 et 8: respectivement 5, 6, 7, 8 semaines de traitement WVK ou 4 semaines de traitement WVK seul suivi du traitement WVK avec du L-NAME (20 mg/kg/jour) pendant 1 (semaine 5), 2 (semaine 6), 3 (semaine 7) et 4 semaine (semaine 8). Les valeurs de PS, PD, PAM et de PP ont été mesurées dans la carotide. \*  $P < 0,0125$  vs Témoins; †  $P$

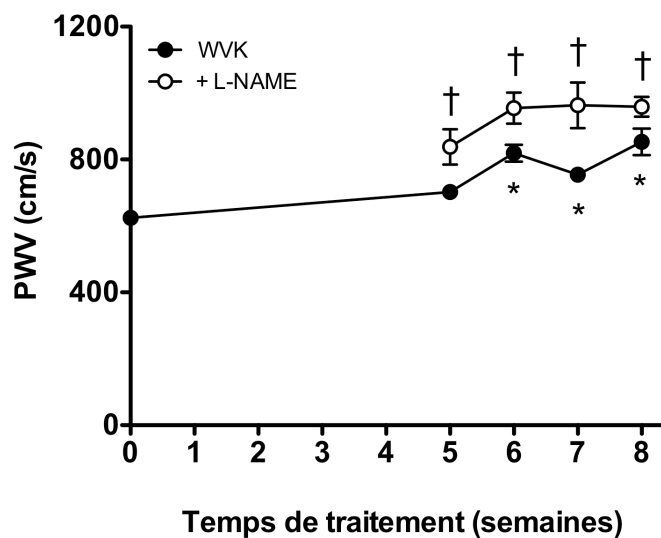
< 0,05 vs WVK. Voir la section Matériel et méthode pour plus de détails sur les analyses statistiques. Les traitements ont été arrêtés 3 jours avant les mesures.



**Figure 17: Évolution des taux de calcium aortique lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et L-NAME ainsi que la localisation des dépôts de calcium au niveau de la paroi aortique selon un protocole de progression de la calcification.**

WVK : 8 semaines de traitement WVK; +L-NAME : 4 semaines de WVK et L-NAME précédées de 4 semaines de traitement WVK seul. **A** : Représentation graphique des taux de calcium dans l'aorte; \*  $P < 0,0125$  vs Témoins, un ANOVA non-paramétrique Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples Dunn a été effectué; †  $P < 0,05$  vs WVK, un test Mann-Whitney a été effectué à chaque temps de traitement. **B** : Coupes transversales d'aorte colorées pour la localisation du calcium à 8 semaines de traitement WVK au Von Kossa; A = adventice, M = média, L = lumière.

Cette déposition de calcium a eu des répercussions sur le PWV qui a été également augmenté dans le traitement WVK et l'administration de L-NAME l'a augmenté davantage et ce de manière significative. Il est également possible d'observer une certaine similitude dans la forme du graphique du calcium et celui du PWV. En effet, à 6 et 8 semaines de traitement WVK, les taux de calcium aortique sont plus élevés ce qui a entraîné une augmentation du PWV à ces même temps (figure 18).



**Figure 18:** Évolution du PWV aortique lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et du L-NAME selon un protocole de régression de la calcification.

WVK : 8 semaines de traitement WVK; +L-NAME : 4 semaines de WVK et L-NAME précédées de 4 semaines de traitement WVK seul. \*  $P < 0,0125$  vs Témoins, un ANOVA non-paramétrique Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples Dunn a été effectué; †  $P < 0,05$  vs WVK, un test Mann-Whitney a été effectué à chaque temps de traitement.

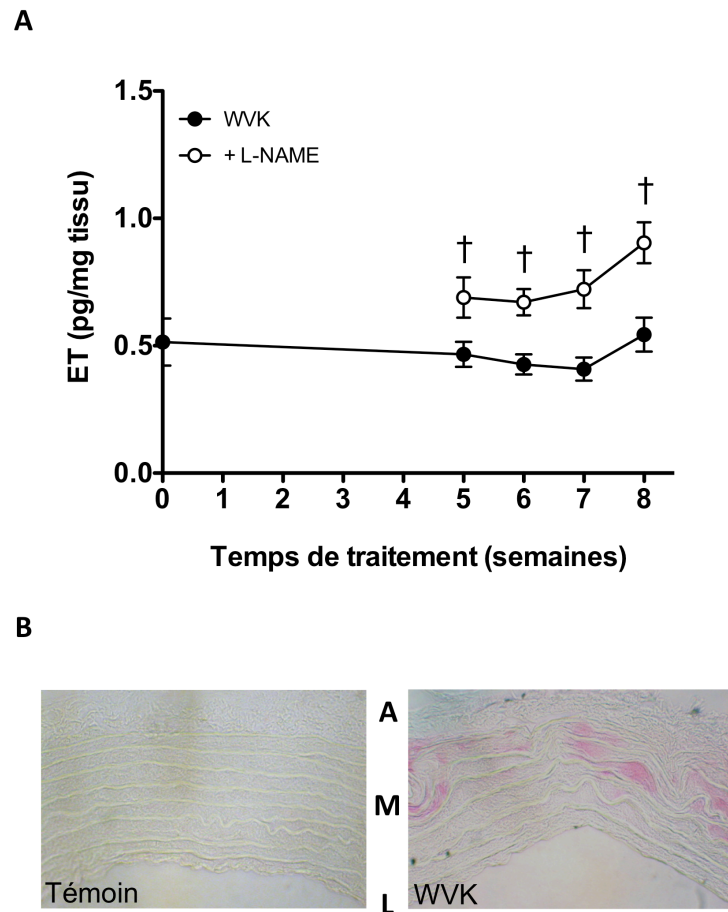
Tout comme dans le volet initiation de la calcification, l'ET aortique a également été mesurée. Comme le montre la figure 19A, le traitement WVK n'a pas augmenté les



taux d'ET, par contre, l'administration de L-NAME l'a augmenté significativement dès la 1<sup>re</sup> semaine de traitement (semaine 5). Il est également possible d'observer que plus les semaines de traitement avec du L-NAME avancent et plus les concentrations aortiques d'ET augmentent.

Tel que publié dans des articles précédents de notre laboratoire, le traitement WVK augmente l'expression de l'ET qui est surtout exprimée au niveau des zones de calcification situées près de l'adventice. Malgré une augmentation significative de l'ET dans les groupes +L-NAME, la méthode qualitative qu'est l'immunohistochimie ne permet pas de distinguer les changements dans l'expression de celle-ci. C'est pour cette raison qu'aucune photo montrant l'expression de l'ET sur des coupes histologiques dans le traitement +L-NAME n'est présentée (figure 19B).

Afin d'expliquer par quels mécanismes le L-NAME augmente la calcification vasculaire, l'expression de différentes protéines a été mesurée. Tout comme dans la partie initiation de la calcification, l'expression de la eNOS, la p-eNOS, la iNOS et la GCs a été mesurée par immunobuvardage de type western (tableau 11). Aucune de ces protéines ne présente de modulation significative. Il est toutefois possible d'observer une augmentation de l'expression de la eNOS et de la iNOS au cours du traitement WVK. En effet, l'expression de la eNOS a été augmentée entre 28 et 38% tandis que celle de la iNOS a été augmentée de 51% à la semaine 8. L'administration de L-NAME a légèrement augmenté l'expression de la eNOS par rapport au traitement WVK seul, mais aucun changement majeur n'a été observé au niveau de sa phosphorylation (p-eNOS). Il n'est toutefois pas surprenant d'un tel résultat puisque le L-NAME a été arrêté 3 jours avant les sacrifices, durée suffisamment longue pour un retour aux valeurs basales (WVK). Contrairement aux autres protéines, la GCs semble avoir été régulée à la baisse dans les premières semaines de traitement WVK et l'administration de L-NAME a diminué son expression de près de 60 % à la semaine 8 (tableau 11).



**Figure 19: Évolution des taux d'endothéline aortique lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et du L-NAME ainsi que la localisation de l'ET au niveau de la paroi aortique selon un protocole de progression de la calcification.**

WVK : 8 semaines de traitement WVK; +L-NAME : 4 semaines de WVK et L-NAME après 4 semaines de traitement WVK seul. **A** : représentation graphique des taux d'ET dans l'aorte. Témoin vs WVK, un ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples Bonferroni a été effectué; †  $P < 0,05$  vs WVK, un test de t de Student a été effectué à chaque temps de traitement. **B** : Coupe transversale d'aorte montrant l'expression de l'ET à 8 semaine de traitement WVK; la coloration rose correspond à l'expression de l'ET au niveau de la média; A = adventice, M = média, L = lumière.

**Tableau 11 : Évolution de l'expression de la eNOS, la p-eNOS, la iNOS et la GCs lors d'une cinétique chez des rats recevant le traitement WVK et le traitement WVK et du L-NAME selon un protocole de progression de la calcification.**

Paramètres	Groupes	Témoins	Semaine 5	Semaine 6	Semaine 7	Semaine 8
Expression eNOS (ratio eNOS/actine)	WVK		1,38 ± 0,15	1,32 ± 0,16	1,36 ± 0,19	1,28 ± 0,18
	+L-NAME	1,00 ± 0,16	1,05 ± 0,15	1,21 ± 0,14	1,49 ± 0,20	1,55 ± 0,26
Expression p-eNOS (ratio p-eNOS/actine)	WVK		1,43 ± 0,07	1,28 ± 0,24	1,30 ± 0,10	1,43 ± 0,24
	+L-NAME	1,00 ± 0,15	1,50 ± 0,29	1,22 ± 0,05	1,23 ± 0,24	1,59 ± 0,11
Expression iNOS (ratio iNOS/actine)	WVK		0,95 ± 0,12	0,85 ± 0,12	0,98 ± 0,18	1,51 ± 0,35
	+L-NAME	1,00 ± 0,05	0,99 ± 0,17	1,15 ± 0,34	1,15 ± 0,05	1,29 ± 0,19
Expression GCs (ratio sGC/actine)	WVK		0,67 ± 0,07	0,62 ± 0,10	1,06 ± 0,30	1,03 ± 0,37
	+L-NAME	1,00 ± 0,32	0,85 ± 0,09	0,97 ± 0,35	0,95 ± 0,41	0,42 ± 0,13

Semaine 5, 6, 7 et 8: respectivement 5, 6, 7, 8 semaines de traitement WVK ou 4 semaines de traitement WVK seul suivi du traitement WVK avec du L-NAME (20 mg/kg/jour) pendant 1 (semaine 5), 2 (semaine 6), 3 (semaine 7) et 4 semaine (semaine 8); Comparaisons effectuées : Témoins vs WVK et WVK vs +L-NAME. Voir la section Matériel et méthode pour plus de détails sur les analyses statistiques. Les traitements ont été arrêtés 3 jours avant les mesures.

Tout comme dans la section initiation de la calcification, afin de mieux étudier les changements aigus provoqués par l'administration de L-NAME, celui-ci a été administré jusqu'au moment des sacrifices.

#### *b. Poursuite du traitement L-NAME*

La section poursuite du traitement de la partie progression de la calcification consiste en un traitement de 8 semaines WVK ainsi que WVK et L-NAME où des mesures

hémodynamiques, des mesures de calcium et d'expression protéique ont été effectuées à 8 semaines de traitement. Ainsi, dans les graphiques et tableaux, le groupe WVK8 correspond au traitement WVK seul de 8 semaines tandis que le traitement +L-NAME8 correspond au traitement WVK seul de 4 semaines suivi de 4 semaines de L-NAME tout en continuant le traitement WVK. Le groupe témoin est composé de rats du même âge que les rats traités, mais qui n'ont pas été manipulés ou traités. Dans cette section, les rats témoins ont le même âge que les rats traités pendant 8 semaines et l'administration de L-NAME a été administré jusqu'au moment des sacrifices.

Contrairement aux résultats attendus, dans cette étude, le traitement WVK n'a pas modifié de manière significative les paramètres hémodynamiques. Les valeurs sont même plus basses que dans le groupe témoin. Par contre, l'administration de L-NAME a augmenté significativement la PS, la PD et conséquemment la PAM, mais pas la PP (tableau 12).

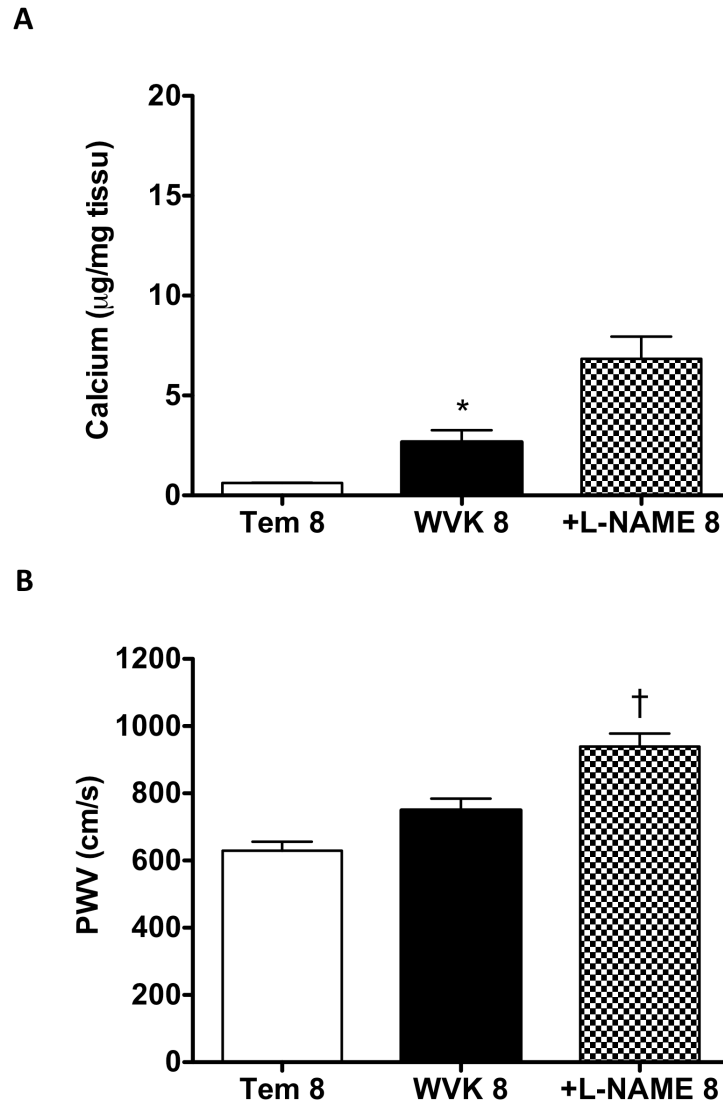
**Tableau 12 : Effet de l'administration chronique du traitement WVK et du L-NAME sur les paramètres hémodynamiques selon un protocole de progression de la calcification (poursuite du L-NAME).**

Paramètres/Groupes	Témoins	WVK8	+L-NAME8
<b>n</b>	6	10	10
<b>Poids (g)</b>	562,8 ± 23,1	471,7 ± 7,0	444,6 ± 4,6
<b>Fréquence cardiaque (bpm)</b>	327,3 ± 9,7	309,1 ± 10,3	326,5 ± 10,0
<b>PS (mmHg)</b>	154,0 ± 4,9	146,8 ± 8,6	192,0 ± 7,5 †
<b>PD (mmHg)</b>	112,9 ± 3,5	97,0 ± 5,6	136,1 ± 7,7 †
<b>PAM (mmHg)</b>	126,6 ± 3,9	113,6 ± 6,5	154,7 ± 7,4 †
<b>PP (mmHg)</b>	41,1 ± 2,4	49,8 ± 3,8	55,9 ± 3,5

WVK8 : 8 semaines de traitement WVK; +L-NAME8 : 4 semaines de traitement WVK seul suivi de 4 semaines avec du L-NAME (20 mg/kg/jour) tout en continuant le traitement WVK. Les valeurs de PS, PD, PAM et de PP ont été mesurées dans la carotide. \*  $P < 0,025$  vs Témoins; †  $P < 0,025$  vs WVK. Voir la section Matériel et méthode pour plus de détails sur les analyses statistiques. L'administration de L-NAME a été poursuivie jusqu'au moment des sacrifices.

Malgré des mesures hémodynamiques anormalement basses, le traitement WVK a augmenté significativement la déposition de calcium dans l'aorte sans toutefois modifier le PWV. Même si les résultats de calcium sont significatifs, les valeurs sont également anormalement basses, surtout pour un traitement de 8 semaines. Ces faibles valeurs de calcium ont eu des répercussions sur le PWV qui, malgré une augmentation au cours du traitement WVK, n'est pas statistiquement différent lorsque comparé au groupe témoin. Par contre, l'administration de L-NAME a augmenté la déposition de calcium dans l'aorte ce qui a pour conséquence d'augmenter le PWV. Il faut toutefois garder à l'esprit que le L-

NAME n'a pas été arrêté 3 jours avant les sacrifices, celui-ci a donc sûrement eu un effet amplificateur sur les valeurs de PWV (figure 20).



**Figure 20: Effet du traitement WVK et du L-NAME sur les taux de calcium dans l'aorte selon un protocole de progression de la calcification (poursuite du L-NAME).**

WVK8 : 8 semaines de traitement WVK; +L-NAME8 : 4 semaines de WVK et L-NAME après 4 semaines de traitement WVK seul. L'administration de L-NAME a été poursuivie jusqu'au moment des sacrifices. A : Calcium aortique ;\*  $P < 0,025$  vs témoin, un ANOVA non-paramétrique Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples Dunn a été

effectué. **B** : PWV; †  $P < 0,025$  vs WVK, un ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples Bonferroni a été effectué.

Comme dans les autres études, l'expression de la eNOS, la p-eNOS, la iNOS et la GCs a été mesurée par immunobuvardage de type western (tableau 13). Le traitement WVK n'a pas modulé de manière significative l'expression des protéines. Il est toutefois possible de constater que l'expression de la eNOS est augmentée de 46% par rapport au groupe témoin. Ce résultat est comparable à celui obtenu dans la cinétique de 8 semaines avec le L-NAME (tableau 11). Nous devons tenir compte que le traitement WVK dans cette étude n'a pas bien fonctionné puisque les paramètres hémodynamiques étaient tous plus bas que le groupe témoin et que le calcium ainsi que le PWV ont des valeurs moins élevées qu'à la normale. Toutefois, il est possible d'observer que l'administration de L-NAME a diminué l'expression protéique comparativement au traitement WVK seul.

**Tableau 13 : Expression de la eNOS, la phospho-eNOS, la iNOS et la GCs au cours des traitements WVK ainsi que WVK et L-NAME selon un protocole de progression de la calcification (poursuite du L-NAME).**

Paramètres/Groupes	Témoin	WVK8	+L-NAME8
Expression eNOS (ratio eNOS/actine)	1,00 ± 0,31	1,46 ± 0,12	1,14 ± 0,09
Expression p-eNOS (ratio p-eNOS/actine)	1,00 ± 0,27	0,94 ± 0,71	0,85 ± 0,07
Expression iNOS (ratio iNOS/actine)	1,00 ± 0,16	1,12 ± 0,13	0,86 ± 0,11
Expression GCs (ratio sGC/actine)	1,00 ± 0,18	0,78 ± 0,06	0,69 ± 0,06

WVK8 : 8 semaines de traitement WVK; +L-NAME8 : 4 semaines de traitement WVK avec du L-NAME (20 mg/kg/jour) après 4 semaines de traitement WVK seul. Les comparaisons : Témoin vs WVK8 et WVK8 vs +L-NAME. Voir la section Matériel et méthode pour plus de détails sur les analyses statistiques. L'administration de L-NAME a été poursuivie jusqu'au moment des sacrifices.

L'inhibition de la production endogène de NO par l'administration de L-NAME a permis de découvrir son importance dans la limitation de la calcification vasculaire. Si le NO est bénéfique, son administration exogène pourrait donc être efficace pour diminuer la rigidité artérielle par une régression de la calcification vasculaire.

## **6.2. Aspect thérapeutique**

Afin d'étudier le potentiel thérapeutique du NO dans la calcification vasculaire et la rigidité artérielle, deux approches ont été expérimentées. L'une consiste en l'administration exogène de NO et l'autre en l'augmentation des effets endogènes du NO en réduisant la dégradation du GMPc.

### **6.2.1. Administration exogène de NO**

Cette étude se divise en deux volets : l'administration aiguë d'un donneur de NO, le sinitrodil, et son administration chronique selon un protocole de progression de la calcification (traitement de 8 semaines).

#### **6.2.1.1. Effet aigu du sinitrodil**

Dans le volet aigu, des rats ont reçu le traitement WVK pendant 8 semaines (WVK). Le groupe témoin est composé de rats du même âge que les rats traités, mais qui n'ont pas été manipulés ou traités (Tem). À la fin du traitement, une injection intraveineuse (i.v.) de salin ou de sinitrodil (1 mg/kg) a été administrée. Ainsi, les groupes Tem et Tem+Sin correspondent aux groupes de rats témoins ayant reçus respectivement une injection de salin ou de sinitrodil, les groupes WVK et WVK+Sin correspondent aux groupes de rats traités selon le modèle WVK pendant 8 semaines et ayant reçus respectivement une injection de salin ou de sinitrodil.



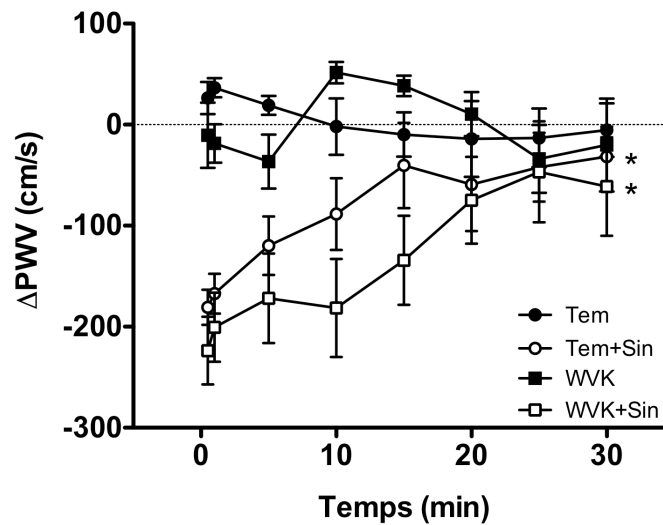
Le traitement WVK a augmenté significativement la PP sans toutefois moduler significativement la PS. Malgré des valeurs élevées de PWV, celles-ci ne sont pas significativement différentes des témoins. L'augmentation de la déposition de calcium n'est significative que dans le groupe WVK (sinitrodil). Les rats recevant le traitement WVK prennent généralement moins de poids que les rats témoins, mais ils sont tout de même en santé (tableau 14).

**Tableau 14 : Paramètres hémodynamiques de base et taux de calcium aortique chez des rats WVK soumis à l'administration aiguë de sinitrodil (Avant l'injection de sinitrodil).**

Paramètres/Groupes	Tem	Tem+Sin	WVK	WVK+Sin
<b>n</b>	5	6	7	8
<b>Poids (g)</b>	513,0 ± 17,6	531,5 ± 21,8	473,0 ± 15,4	445,6 ± 11,8 †
<b>Fréquence cardiaque (bpm)</b>	317,6 ± 20,2	353,2 ± 16,9	330,6 ± 12,8	337,1 ± 23,9
<b>PS (mmHg)</b>	138,1 ± 8,5	139,9 ± 4,0	160,9 ± 4,2	149,3 ± 11,7
<b>PD (mmHg)</b>	107,3 ± 6,4	108,6 ± 4,5	111,5 ± 5,2	100,6 ± 7,8
<b>PAM (mmHg)</b>	117,6 ± 7,1	119,0 ± 4,2	128,0 ± 4,4	116,8 ± 8,9
<b>PP (mmHg)</b>	30,8 ± 2,7	31,3 ± 2,8	49,4 ± 4,4 †	48,7 ± 5,6 †
<b>PWV (cm/s)</b>	626,9 ± 35,4	621,3 ± 26,8	829,0 ± 42,9	782,8 ± 64,7
<b>Calcium aortique (µg/mg tissu sec)</b>	0,70 ± 0,07	0,64 ± 0,05	4,68 ± 1,47	5,33 ± 1,08 †

Tem, Tem+Sin, les rats témoins pairés en âge ont reçu une injection i.v. de salin ou de sinitrodil; WVK, WVK+Sin, 8 semaines de traitement WVK suivi d'une seule injection i.v. de salin ou de sinitrodil. Les valeurs de PS, PD, PAM et de PP ont été mesurées dans la carotide. †  $P < 0,025$  vs Témoins respectifs; autre comparaison : Tem ou WVK vs Tem+Sin ou WVK+Sin. Voir la section Matériel et méthodes pour les détails des analyses statistiques.

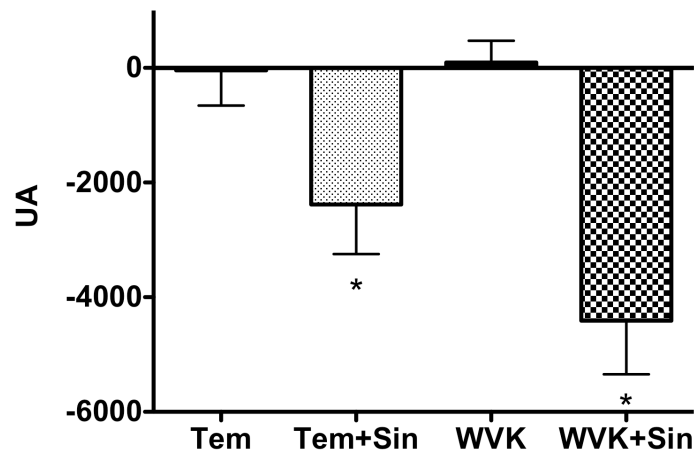
Comme le montre la figure 21, l'injection d'un bolus de sinitrodil a diminué rapidement le PWV qui est ensuite retourné à des valeurs de base à l'intérieur de 30 minutes. L'injection de salin n'a, quant à elle, eu aucun effet sur les valeurs de PWV.



**Figure 21: Variation des valeurs de PWV après une injection i.v. de sinitrodil.**

Tem, Tem+Sin, les rats témoins pairés en âge ont reçu une injection i.v. de salin ou de sinitrodil; WVK, WVK+Sin, 8 semaines de traitement WVK suivi d'une seule injection i.v. de salin ou de sinitrodil (1 mg/kg). Les cercles et les carrés noirs correspondent aux groupes témoins ayant reçus du salin; les cercles et les carrés blancs correspondent aux groupes ayant reçus du sinitrodil. \*  $P < 0,025$  vs salin (Tem ou WVK), un ANOVA non-paramétrique Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples Dunn a été effectué.

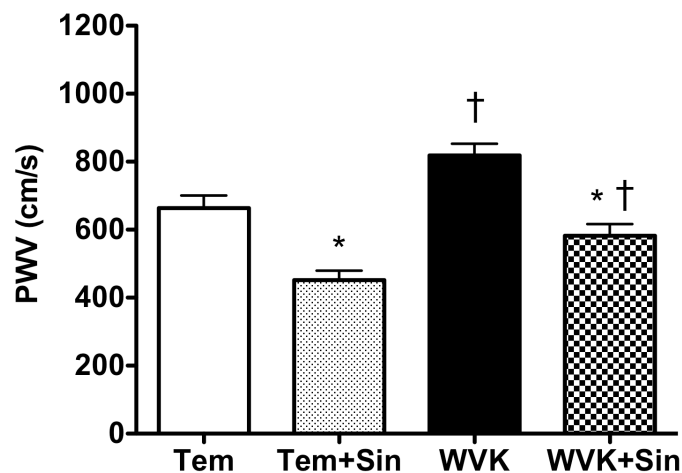
Dans la figure 22, les résultats obtenus suite à la cinétique d'injection du sinitrodil ont été exprimés en tant qu'aire sous la courbe. Cette figure montre bien que le salin n'a eu aucun effet sur le PWV tandis que l'injection de sinitrodil, que ce soit chez des rats témoins ou des rats WVK a significativement diminué le PWV. Il est cependant possible d'observer que l'injection de sinitrodil semble avoir eu un impact plus important chez les rats WVK que chez les témoins. La différence n'est toutefois pas significative.



**Figure 22:** Aire sous la courbe des résultats présentés à la figure 21.

Tem, Tem+Sin, les rats témoins pairés en âge ont reçu une injection i.v. de salin ou de sinitrodil; WVK, WVK+Sin, 8 semaines de traitement WVK suivi d'une seule injection i.v. de salin ou de sinitrodil (1 mg/kg). \*  $P < 0,05$  vs 0; un test de t pour une seule valeur comparé à 0 a été effectué (*one sample t test*);  $P < 0,05$  vs Tem+Sin, un ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples Bonferroni a également été effectué.

La figure 23 montre les valeurs absolues de PWV avant et après l'injection de sinitrodil. Il est possible d'observer que l'injection de sinitrodil a permis de normaliser de façon aiguë le PWV chez des rats WVK.



**Figure 23: Effet maximal du sinitrodil sur le PWV (Après l'injection de sinitrodil).**

Tem, Tem+Sin, les rats témoins pairés en âge ont reçu une injection i.v. de salin ou de sinitrodil; WVK, WVK+Sin, 8 semaines de traitement WVK suivi d'une seule injection i.v. de salin ou de sinitrodil (1 mg/kg). \*  $P < 0,025$  vs groupe salin respectif; †  $P < 0,025$  vs Témoins; un ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples Bonferroni a été effectué.

L'administration aiguë de sinitrodil a eu des effets bénéfiques sur le PWV. Il fallait donc tester ce donneur de NO dans une étude où il serait administré à tous les jours pendant 4 semaines après avoir induit la calcification vasculaire pendant 4 semaines, dans le but de déterminer si le NO exogène a un effet sur la composition de la paroi vasculaire.

#### 6.2.1.2. Effet chronique du sinitrodil

Dans le volet chronique, des rats ont reçu le traitement WVK pendant 4 semaines, puis à partir de la 5<sup>e</sup> semaine, ils ont reçu 4 semaines de sinitrodil tout en continuant le

traitement WVK. Deux doses ont été testées, soient les doses de 12 et de 100 mg/kg/jour. Ainsi, le groupe WVK correspond à un traitement WVK pendant 8 semaines, les groupes +Sin12 et +Sin100 correspondent à 4 semaines de traitement WVK suivi de 4 semaines de traitement WVK et de 12 ou de 100 mg/kg/jour de sinitrodil. Le groupe témoin est composé de rats du même âge que les rats traités, mais qui n'ont pas été manipulés ou traités. L'administration de sinitrodil a été arrêtée 3 jours avant les sacrifices. Dans cette partie, les graphiques du calcium ont une échelle allant jusqu'à 20 µg/mg de tissu.

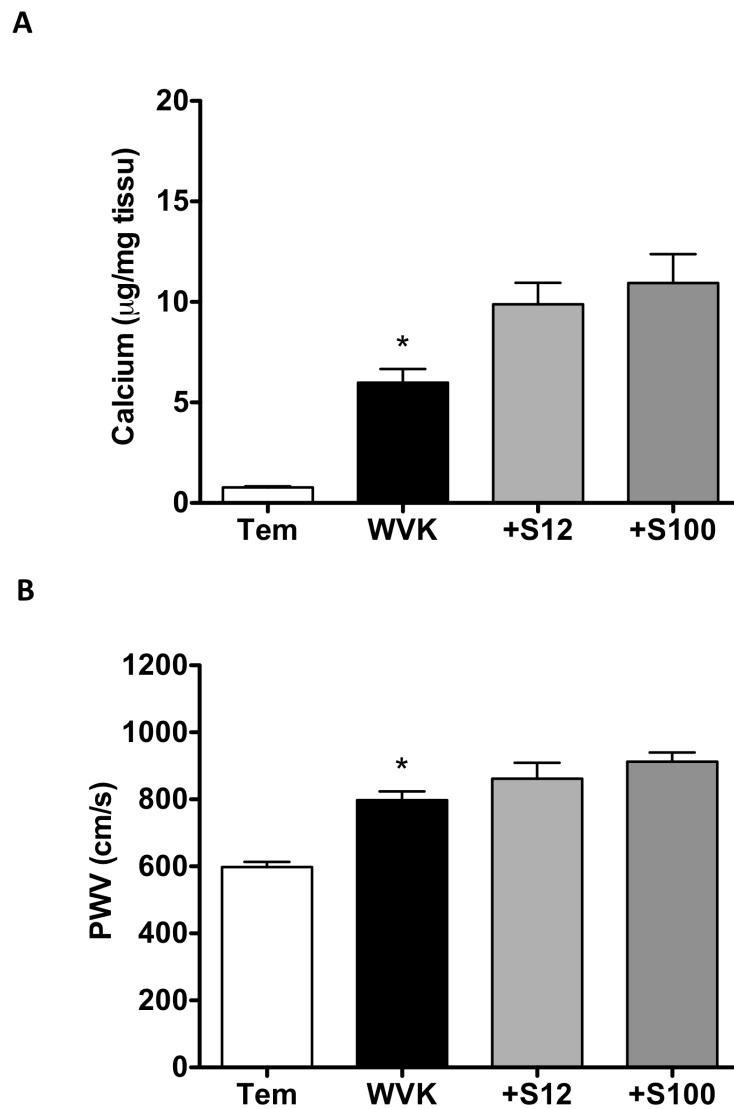
Le traitement WVK a significativement augmenté la PP, la PS et la PAM. L'administration de sinitrodil, quelque soit la dose, n'a toutefois pas modifiée les paramètres hémodynamiques (tableau 15).

**Tableau 15 : Effet de l'administration chronique du sinitrodil sur les paramètres hémodynamiques chez des rats WVK.**

Paramètres /Groupes	Témoins	WVK	+Sin12	+Sin100
<b>n</b>	25	28	10	10
<b>Poids (g)</b>	554,4 ± 10,9	472,8 ± 8,2 *	451,8 ± 8,9 †	429,6 ± 9,7
<b>Fréquence cardiaque (bpm)</b>	337,9 ± 9,2	344,8 ± 9,7	363,1 ± 14,4	366,4 ± 14,7
<b>PS (mmHg)</b>	139,3 ± 2,6	166,4 ± 4,0 *	167,3 ± 5,7	174,7 ± 5,1
<b>PD (mmHg)</b>	106,9 ± 2,3	112,6 ± 2,7	111,3 ± 3,6	121,5 ± 3,3
<b>PAM (mmHg)</b>	117,7 ± 2,3	131,2 ± 3,1 *	130,0 ± 4,2	139,2 ± 3,7
<b>PP (mmHg)</b>	32,3 ± 1,1	52,8 ± 2,9 *	56,0 ± 2,5	53,3 ± 3,2

WVK : 8 semaines de traitement WVK; +Sin12, +Sin100 : 4 semaines de traitement WVK avec du sinitrodil (12 et 100 mg/kg/jour) après 4 semaines de traitement WVK seul. Les valeurs de PS, PD, PAM et de PP ont été mesurées dans la carotide. \*  $P < 0,0167$  vs Témoins; †  $P < 0,0167$  vs WVK. Voir la section Matériel et méthode pour plus de détails sur les analyses statistiques. Les traitements ont été arrêtés 3 jours avant les mesures.

Tel qu'attendu, le traitement WVK a augmenté la déposition de calcium dans l'aorte entraînant du même coup l'élévation significative du PWV. Contrairement aux résultats intéressants obtenus lors de l'administration aiguë de sinitrodil, le traitement avec ce dernier a augmenté les taux de calcium dans l'aorte et le PWV. Cette augmentation semble dépendante de la dose de sinitrodil administrée, malgré que le tout ne soit pas significatif (figure 24).



**Figure 24: Effet chronique du sinitrodil sur les taux de calcium et les valeurs de PWV chez des rats WVK.**

WVK : 8 semaines de traitement WVK; +Sin12, +Sin100 : 4 semaines de traitement WVK avec du sinitrodil (12 et 100 mg/kg/jour) après 4 semaines de traitement WVK seul. **A** : Calcium aortique et **B** : PWV; \*  $P < 0,0167$  vs Tem, un ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples Bonferroni a été effectué.

En plus des paramètres hémodynamiques et du calcium, l'ET, les nitrates plasmatiques, la eNOS et la GCs ont été mesurés. Tel qu'attendu, le traitement WVK a augmenté significativement les taux d'ET dans l'aorte, mais n'a pas modifié significativement la production de nitrates ni l'expression de la eNOS ni de la GCs. Toutefois, il faut mentionner que l'expression de la GCs est similaire à celle obtenue dans d'autres études de 8 semaines. Même si l'administration de 100 mg/kg/jour de sinitrodil a augmenté l'ET aortique, cette élévation n'est pas significative. L'administration de sinitrodil n'a pas non plus modifié significativement l'expression de la eNOS et la GCs. Par contre, la production de nitrates plasmatiques a été diminuée dans les groupes recevant du sinitrodil. L'administration de 100 mg/kg/jour de sinitrodil a même significativement diminué la production de nitrates plasmatiques. L'absence d'effet sur l'expression protéique peut être due à l'arrêt des traitements 3 jours avant les sacrifices (tableau 16), suggérant que les effets potentiels de ce composé ne se maintiendraient pas.

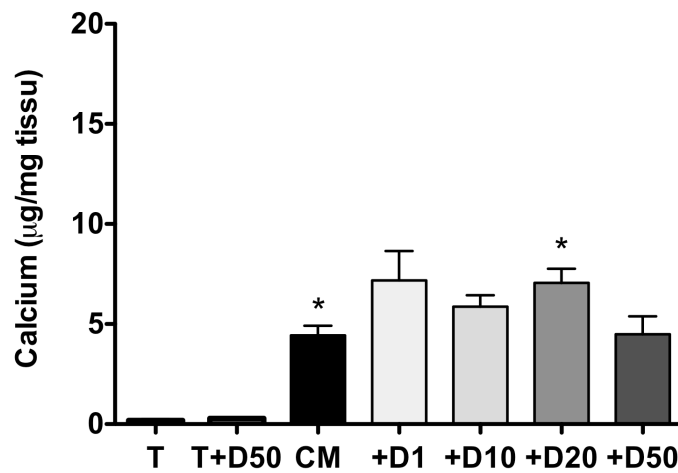
**Tableau 16 : Effet de l'administration chronique du sinitrodil sur les concentrations aortiques d'ET et de nitrates plasmatiques ainsi que l'expression de la eNOS et de la GCs chez des rats WVK.**

Paramètres /Groupes	Témoins	WVK	+Sin12	+Sin100
<b>ET aortique (pg/mg tissu sec)</b>	0,23 ± 0,03	0,44 ± 0,05 *	n/d	0,55 ± 0,08
<b>Nitrates plasmatiques (µmol/L)</b>	77,1 ± 15,3	96,1 ± 9,6	58,8 ± 17,7	43,8 ± 3,2 †
<b>Expression eNOS (ratio eNOS/actine)</b>	1,00 ± 0,39	1,17 ± 0,21	1,00 ± 0,17	1,04 ± 0,15
<b>Expression GCs (ratio sGC/actine)</b>	1,00 ± 0,30	0,69 ± 0,16	0,60 ± 0,15	1,43 ± 0,66

WVK : 8 semaines de traitement WVK; +Sin12, +Sin100 : 4 semaines de traitement WVK avec du sinitrodil (12 et de 100 mg/kg/jour) après 4 semaines de traitement WVK seul; \*  $P < 0,0167$  vs Témoins; †  $P < 0,0167$  vs WVK. Voir la section Matériel et méthode pour plus de détails sur les analyses statistiques. Les traitements ont été arrêtés 3 jours avant les mesures.



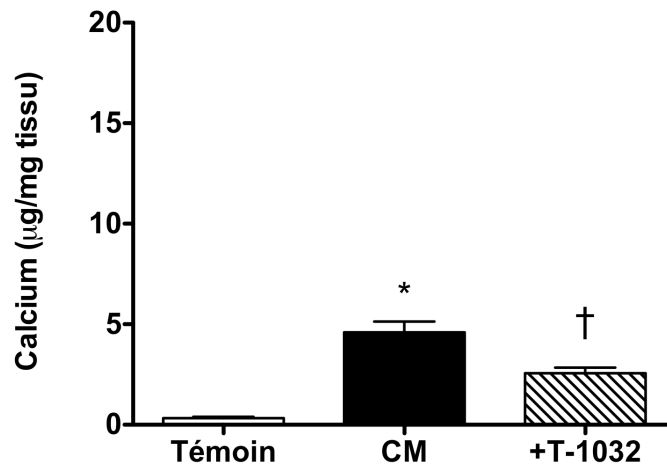
Comme l'administration chronique de sinitrodil ne semble pas avoir été efficace pour limiter la calcification vasculaire et la rigidité artérielle, un autre donneur de NO a été testé. Ici encore, au lieu d'avoir un effet réducteur sur la calcification, la plupart des doses se sont avérées pro-calcifiantes. L'ajout de 20  $\mu\text{mol/L}$  de DETA/NO dans le milieu calcifiant (CM) a même augmenté significativement la calcification comparativement au CM seul (figure 25).



**Figure 25:** Effet du DETA/NO sur les taux de calcium aortique dans le modèle *ex vivo* de calcification vasculaire médiale.

T : aortes dans le milieu de culture; T+D50 : aortes dans un milieu de culture contenant 50  $\mu\text{mol/L}$  de DETA/NO; CM : aortes dans un milieu calcifiant; +D1 à +D50 : aortes dans un milieu calcifiant contenant des concentrations de 1 à 50  $\mu\text{mol/L}$  de DETA/NO. \*  $P < 0,0083$  vs T, un ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples Bonferroni a été effectué.

À la lumière de ces résultats décevants, l'administration exogène de NO a été abandonnée. En utilisant le modèle *ex vivo* de calcification, une petite étude pilote a été réalisée afin d'étudier l'efficacité d'un inhibiteur de phosphodiésterases, le T-1032. L'ajout du T-1032 au milieu calcifiant a permis de diminuer significativement la calcification (figure 26).



**Figure 26: Effet du T-1032 (iPDE5) sur les taux de calcium aortique dans un modèle *ex vivo* de calcification vasculaire.**

Témoin : aortes dans un milieu de culture; CM : aortes dans un milieu calcifiant; +T-1032: aortes dans un milieu calcifiant contenant du T-1032 (10 µmol/L). \*  $P < 0,025$  vs Témoins, †  $P < 0,025$  vs CM; un ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples Bonferroni a été effectué.

Avec ces résultats prometteurs, une étude animale a donc été planifiée. En effet, au lieu d'augmenter les concentrations de NO par une administration exogène de NO, les effets endogènes du NO ont été augmentés par l'administration d'un iPDE5.

De par ses propriétés pharmacocinétiques intéressantes, c'est-à-dire une longue demi-vie et une liaison préférentielle à l' $\alpha_1$  glycoprotéine plutôt qu'à l'albumine [455], le tadalafil (Cialis) a été choisi préférentiellement au sildénafil pour être administré oralement à des rats WVK. Tel que mentionné précédemment, l'utilisation de la warfarine pour induire la calcification vasculaire entraîne certains problèmes puisqu'elle est impliquée dans plusieurs interactions pharmacocinétiques. Toutefois, des études d'interactions n'ont montré aucun effet significatif suite à la co-administration de tadalafil et de warfarine [455]. De plus, la warfarine est connue pour être liée de façon importante aux protéines plasmatiques (97 à 99%) et préférentiellement à l'albumine [456] et comme le sildénafil se

fixe également à cette protéine plasmatique, il pourrait déplacer la warfarine de l'albumine et ainsi augmenter considérablement sa biodisponibilité. Une biodisponibilité accrue de la warfarine provoquerait une hausse indésirable de la calcification vasculaire et possiblement une mortalité animale plus importante. En plus de se lier préférentiellement à l' $\alpha_1$  glycoprotéine et de ne pas interférer au niveau du métabolisme de la warfarine, le tadalafil possède une plus longue de demi-vie de que le sildénafil (17,5 vs 3-4 heures) [457]. Sa présence dans l'organisme des rats n'est pas compromise durant leur sommeil.

## **6.2.2. Augmentation des effets du NO endogène**

Cette étude se divise en deux volets : initiation de la calcification (traitement 4 semaines) et progression de la calcification (traitement 8 semaines). Dans la partie initiation de la calcification, l'administration du tadalafil a été poursuivi jusqu'au moment des sacrifices tandis qu'il a été arrêté 3 jours avant les sacrifices dans la partie progression de la calcification.

### **6.2.2.1. Effet du tadalafil dans l'initiation de la calcification**

Dans la partie initiation de la calcification, les traitements WVK ainsi que WVK et tadalafil (+Tad4) font partie d'une étude de 4 semaines où le tadalafil (2 mg/kg/jour) a été administré en même temps que débute l'administration de la warfarine et de la vitamine K. Le groupe témoin est composé de rats du même âge que les rats traités, mais qui n'ont pas été manipulés ou traités. Des mesures hémodynamiques et des mesures de calcium ont été effectuées à 4 semaines de traitement. Dans cette partie, les graphiques du calcium ont une échelle allant jusqu'à 25  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu. Il est à noter que le tadalafil a été poursuivi jusqu'au moment des sacrifices.

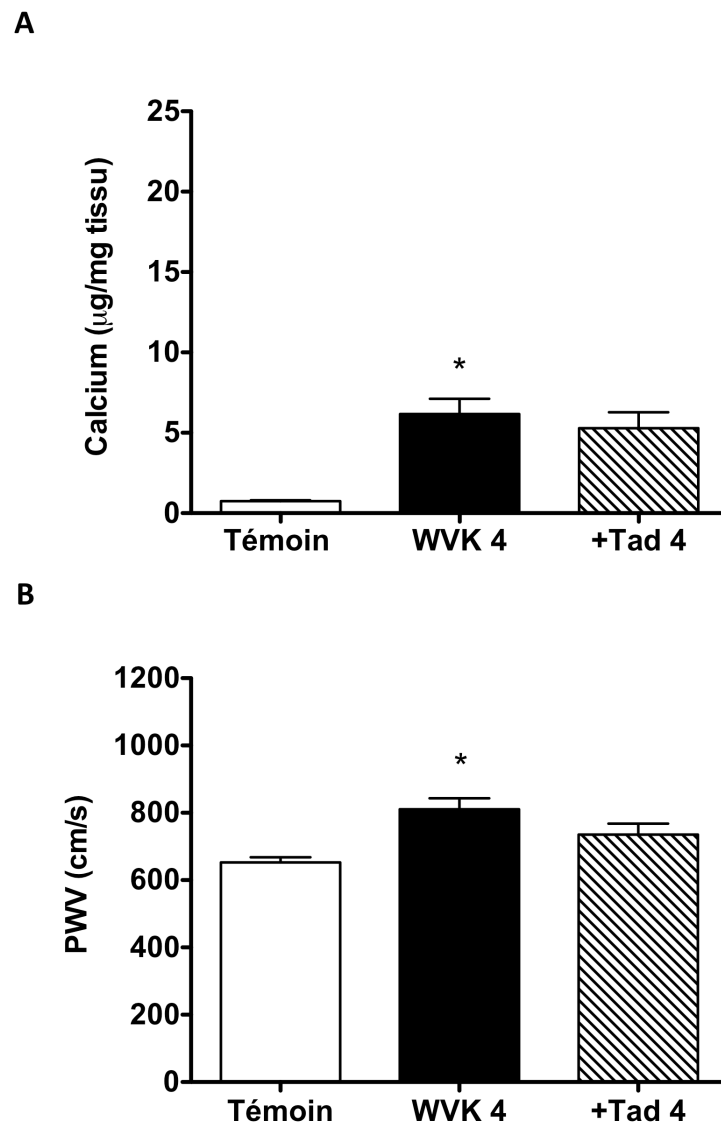
Le traitement WVK a augmenté la PP sans toutefois modifier la PS. L'administration de tadalafil a réduit significativement la PS, la PD et conséquemment la PAM. Comme la PS et la PD ont été diminuées, la PP a très peu changé par rapport au traitement WVK seul. Il faut noter que dans cette partie de l'étude, le tadalafil a été administré jusqu'au moment des sacrifices. La modulation des paramètres hémodynamiques est probablement due aux effets aigus du tadalafil (tableau 17).

**Tableau 17 : Effet de l'administration chronique de tadalafil sur les paramètres hémodynamiques selon un protocole d'initiation de la calcification.**

Paramètres/Groupes	Témoins	WVK4	+Tad4
<b>n</b>	6	10	10
<b>Poids (g)</b>	450,0 ± 18,8	404,5 ± 13,2	414,7 ± 7,7
<b>Fréquence cardiaque (bpm)</b>	384,3 ± 18,6	377,1 ± 11,5	354,7 ± 11,6
<b>PS (mmHg)</b>	155,5 ± 5,0	162,4 ± 4,0	143,9 ± 5,9 †
<b>PD (mmHg)</b>	118,2 ± 4,3	112,4 ± 2,7	96,0 ± 4,6 †
<b>PAM (mmHg)</b>	130,7 ± 4,2	129,0 ± 3,0	112,0 ± 4,9 †
<b>PP (mmHg)</b>	37,3 ± 3,3	50,0 ± 2,5 *	48,0 ± 2,9

WVK4 : 4 semaines de traitement WVK; +Tad4 : 4 semaines de traitement WVK avec du tadalafil (2 mg/kg/jour). Les valeurs de PS, PD, PAM et de PP ont été mesurées dans la carotide. \*  $P < 0,025$  vs Témoins; †  $P < 0,025$  vs WVK. Voir la section Matériel et méthode pour plus de détails sur les analyses statistiques. Le tadalafil a été poursuivi jusqu'au moment des sacrifices.

Tel qu'attendu, le traitement WVK a augmenté les concentrations de calcium dans l'aorte et l'administration de tadalafil l'a légèrement diminué, mais pas significativement. Les valeurs de PWV suivent le même profil que celles du calcium. (figure 27).



**Figure 27: Effet de l'administration chronique de tadalafil sur les taux de calcium aortique et les valeurs de PWV selon un protocole d'initiation de la calcification.**

WVK4 : 4 semaines de traitement WVK; +Tad4 : 4 semaines de traitement WVK avec du tadalafil (2 mg/kg/jour). Le tadalafil a été poursuivi jusqu'au moment des sacrifices. **A** : Calcium aortique; \*  $P < 0,025$  vs Témoins, un ANOVA non-paramétrique Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples Dunn a été effectué. **B** : PWV; \*  $P < 0,025$  vs Témoins et WVK vs +Tad, un ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples Bonferroni a été effectué. Le tadalafil a été poursuivi jusqu'au moment des sacrifices.

### **6.2.2.2. Effet du tadalafil dans la progression de la calcification**

Dans la partie progression de la calcification, les traitements WVK ainsi que WVK et tadalafil (+Tad8) font partie d'une étude de 8 semaines où le tadalafil (2 mg/kg/jour) a été administré à partir de la 5<sup>e</sup> semaine, une fois la calcification bien établie. Le groupe témoin est composé de rats du même âge que les rats traités, mais qui n'ont pas été manipulés ou traités. Des mesures hémodynamiques et des mesures de calcium ont été effectuées à 8 semaines de traitement. Dans cette partie, les graphiques du calcium ont une échelle allant jusqu'à 25 µg/mg de tissu. Il est à noter que dans cette section, le tadalafil a été arrêté 3 jours avant les sacrifices.

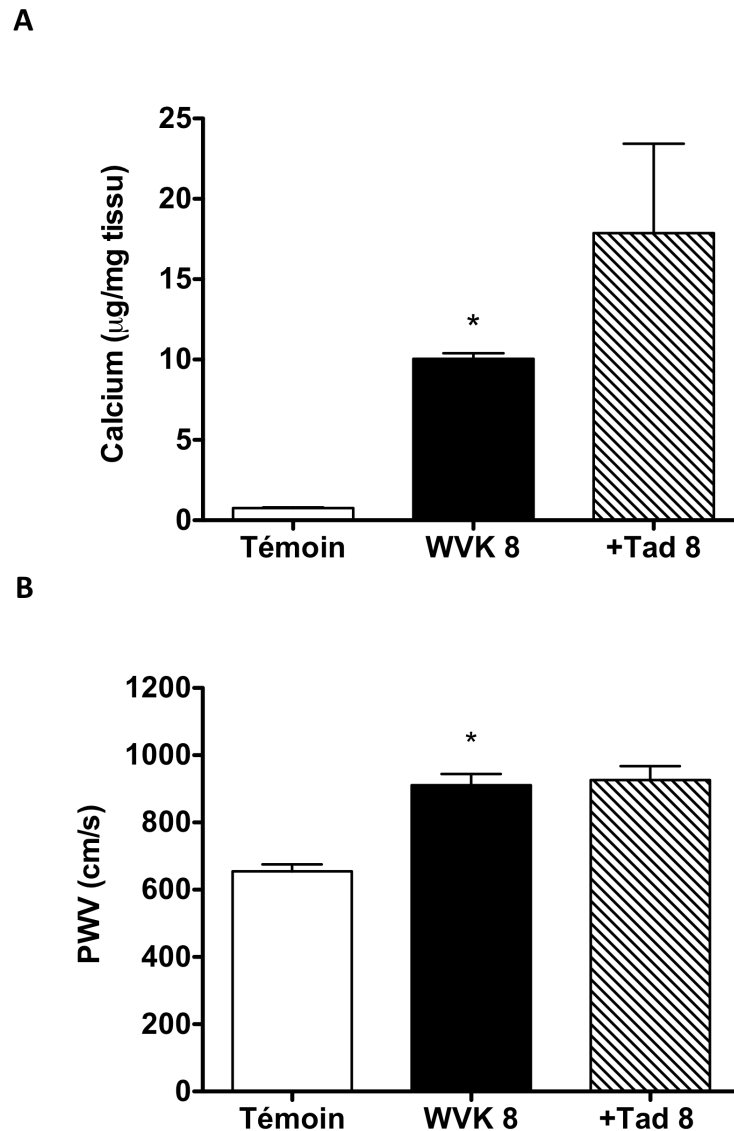
Dans cette partie de l'étude, le traitement WVK n'a pas augmenté de manière significative la PP ni la PS. En effet, malgré une différence de plus de 25 mmHg entre les témoins et les rats WVK pour la PS et 22 mmHg pour la PP, ces paramètres ne sont pas statistiquement différents du groupe témoin. Ceci est sûrement dû au n très faible du groupe WVK8 ainsi que la grande variabilité de ces paramètres à l'intérieur de ce groupe. Contrairement aux résultats dans la partie initiation de la calcification, le tadalafil n'a pas eu d'effet sur les mesures hémodynamiques. Il faut rappeler que le tadalafil a été arrêté 3 jours avant les sacrifices. Les résultats obtenus représentent donc uniquement les effets chroniques du tadalafil (tableau 18).

**Tableau 18 : Effet de l'administration chronique de tadalafil sur les paramètres hémodynamiques selon un protocole de progression de la calcification.**

Paramètres/Groupes	Témoins	WVK8	+Tad8
<b>n</b>	7	4	9
<b>Poids (g)</b>	545, 4 ± 16,2	444,3 ± 3,4 *	474,4 ± 10,3
<b>Fréquence cardiaque (bpm)</b>	376, 9 ± 16,3	390,0 ± 16,3	383, 8 ± 13,2
<b>PS (mmHg)</b>	161,4 ± 4,0	185,9 ± 10,3	179,7 ± 8,1
<b>PD (mmHg)</b>	123,6 ± 2,9	123,4 ± 4,7	118,5 ± 4,5
<b>PAM (mmHg)</b>	136,2 ± 3,1	144,2 ± 5,3	138,9 ± 5,4
<b>PP (mmHg)</b>	39,0 ± 3,0	62,5 ± 10,0	61,2 ± 5,4

WVK8 : 8 semaines de traitement WVK; +Tad8 : 4 semaines de traitement WVK avec du tadalafil (2 mg/kg/jour) après 4 semaines de traitement WVK seul. Les valeurs de PS, PD, PAM et de PP ont été mesurées dans la carotide. \*  $P < 0,025$  vs Témoins et WVK8 vs +Tad8. Voir la section Matériel et méthode pour plus de détails sur les analyses statistiques. Les traitements ont été arrêtés 3 jours avant les mesures.

Tout comme dans le volet initiation de la calcification, le traitement de 8 semaines WVK a significativement augmenté la déposition de calcium et le PWV. Même si les valeurs ne sont pas significatives et la variabilité est très importante à l'intérieur de ce groupe, l'administration de tadalafil après 4 semaines de traitement WVK tend à augmenter la calcification dans l'aorte. Le PWV n'a, quant à lui, pas été modulé (figure 28).



**Figure 28: Effet de l'administration chronique de tadalafil sur les taux de calcium aortique et le PWV selon un protocole de progression de la calcification.**

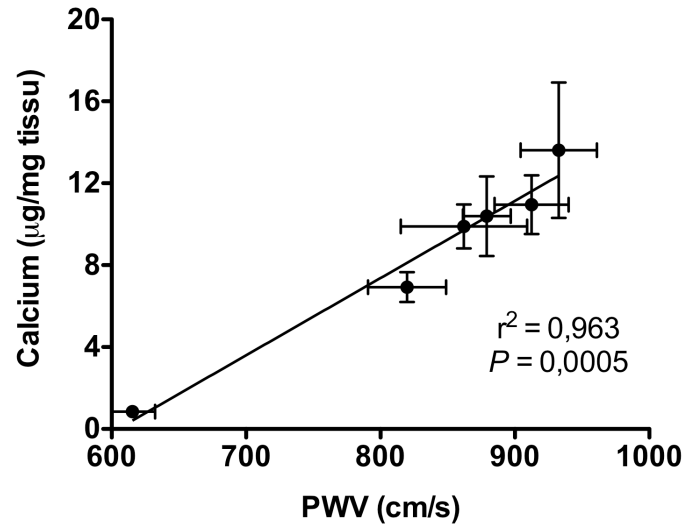
WVK8 : 8 semaines de traitement WVK; +Tad8 : 4 semaines de traitement WVK avec du tadalafil (2 mg/kg/jour) après 4 semaines de traitement WVK seul. **A** : Calcium aortique et **B** : PWV; \*  $P < 0,025$  vs Témoin et WVK8 vs +Tad8, un ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples Bonferroni a été effectué. Le tadalafil a été arrêté 3 jours avant les mesures.



## 7. Discussion

### 7.1. Général

La rigidité artérielle est associée à plusieurs modifications de la paroi vasculaire dont notamment la fragmentation et la calcification de l'élastine ainsi que l'augmentation du collagène. Au cours de mon doctorat, c'est surtout l'élastocalcinose qui a été étudiée. En rassemblant plusieurs études réalisées au cours de ma formation aux cycles supérieures, une corrélation entre le calcium et le PWV a été faite. Il est possible d'observer une très forte corrélation ayant un  $r^2 = 0,96$  entre la déposition de calcium au niveau de l'aorte et la rigidité artérielle de celle-ci. Il est certain que la relation entre le calcium et le PWV n'est pas toujours aussi importante [335] que celle présentée à la figure 29, mais cette corrélation montre tout de même que ces deux paramètres sont intimement liés. Il existe donc une relation très étroite entre l'élastocalcinose et l'augmentation de rigidité artérielle dans l'hypertension systolique isolée. Plusieurs études chez l'animal ont montré une relation directe entre la calcification vasculaire et l'augmentation de rigidité artérielle [312, 313, 333, 334]. En clinique, la rigidité artérielle, associée à l'élastocalcinose, est observée chez les patients souffrant d'insuffisance rénale [336-338]. En effet, une étude a montré que la densité de la calcification est augmentée avec l'âge, la durée de l'hémodialyse ainsi qu'avec les doses de carbonate de calcium prescrites ( $\text{CaCO}_3$ ) et que cette calcification (aorte et carotides) est associée à une augmentation de la rigidité artérielle [339]. Plus récemment, une étude a montré que la calcification est associée à une augmentation du PWV chez des hommes en santé et qu'il existe une relation entre le développement de l'HSI et les niveaux de calcium aortique [340].



**Figure 29: Relation entre la calcification de l'aorte et le PWV.**

Ce graphique regroupe des rats témoins, des rats qui ont reçu le traitement WVK seul, WVK+Sin12, WVK+Sin100, WVK+L-NAME ainsi que WVK+Sin12+L-NAME. Nonobstant le groupe témoin, la relation demeure linéaire dans les groupes traités.

## 7.2. Aspect physiologique

### 7.2.1. Bloquer la production de NO par l'administration de L-NAME

L'implication du NO dans des processus chroniques reliés à la rigidité artérielle n'avait pas encore été investiguée en profondeur. Des études antérieures de notre laboratoire montrant l'efficacité d'un antagoniste des récepteurs à l'ET à régresser la déposition de calcium au niveau de l'aorte [385, 435] ont été le point de départ pour étudier l'impact de la modulation du NO sur la rigidité artérielle dans un contexte d'HSI. En effet, puisque le NO diminue la production d'ET par un mécanisme dépendant du GMPc [458,

459], il était donc pertinent de déterminer son implication chronique et aiguë dans l'initiation et la progression de l'élastocalcinose.

### **7.2.1.1. Initiation de la calcification**

#### *a. Arrêt précoce du traitement L-NAME*

Dans cette partie, le traitement WVK a augmenté significativement la PP, mais n'a modifié la PS qu'à la 3<sup>e</sup> semaine de traitement. Cette hausse de la PP est accompagnée d'une augmentation de la déposition de calcium et du PWV. Ces modifications se produisent également chez l'homme au cours de l'HSI [312, 385]. L'observation d'un pic de calcification à 3 semaines de traitement a quelque peu étonné. Cette augmentation pourrait être expliquée par le fait qu'à ce temps, plusieurs processus enclenchés depuis les premières semaines de traitement, deviennent concrets. C'est le cas de la fragmentation de l'élastine et de l'expression du facteur de transcription Cbfa-1 [313]. Cette période dans l'initiation de la calcification est donc une étape charnière. Comme cette période du traitement semble être cruciale, la variabilité entre les animaux traités peut être plus importante. En effet, comme la calcification et tous les processus qui lui sont associés dépendent de l'équilibre entre la vitamine K et la warfarine, un ajustement rigoureux des doses de warfarine est essentiel. Cependant, une des faiblesses de notre protocole est le mode d'administration de la warfarine. L'administration de la warfarine dans l'eau de boisson et le fait que les rats soient 2 par cages entraînent des variations dans la dose quotidienne de warfarine que reçoit chaque rat puisque l'eau consommée est une moyenne par cage. En effet, s'il y a un rat qui boit plus que l'autre dans une cage, sa dose de warfarine sera plus importante. Il est donc difficile de bien contrôler la consommation de warfarine et ce même si la dose est ajustée fréquemment. Pour être vraiment rigoureux et certain de la dose de warfarine que chaque rat reçoit, il aurait fallu avoir qu'un seul rat par cage, mais cette pratique est contraire aux normes. Il aurait également été possible d'administrer la warfarine par gavage. Le protocole initial, développé par le Dr Paul Price,

impliquait 3 injections par jours (2 de warfarine et 1 de vitamine K) [449]. Il est certain qu'avec ce protocole ou la technique de gavage, tous les rats reçoivent les mêmes doses, par contre, c'est plus exigeant pour l'expérimentateur et plus stressant pour les animaux. Le gavage nécessite, de plus, une expertise particulière. Notre laboratoire a préconisé une approche expérimentale qui a été utilisée dans plusieurs études [313, 385, 435, 436]. Cette technique impliquant l'administration des médicaments dans la nourriture ainsi que dans l'eau de boisson est moins exigeante et moins traumatisante pour les rats, mais des variations possibles entre les animaux sont à prendre en considération. Ainsi, peut-être à cause d'une plus grande consommation de warfarine, il y a eu également une plus grande mortalité dans le groupe WVK 3 semaines. Le nombre de rats dans ce groupe est faible ce qui peut davantage accentuer les variations. En plus des variations attribuables aux doses de warfarine et le faible nombre de rats dans ce groupe, le fait que le groupe +L-NAME 3 semaines ait également eu un pic de calcification suggère qu'il y a effectivement quelque chose qui se passe à cette période. Selon le protocole, les quantités de vitamine K injectée sont diminuées à partir de la 3<sup>e</sup> semaine de traitement. Il est donc possible d'observer une hausse plus importante de la calcification entre la semaine 2 et la semaine 3 qu'entre la semaine 1 et la semaine 2 par exemple. Ce phénomène est également observable dans d'autres études de notre laboratoire [313] et ce même si les taux de calcium sont généralement plus importants à 4 semaines de traitement WVK ce qui n'est pas le cas dans la présente étude. Contrairement à d'autres études publiées antérieurement par notre laboratoire, l'augmentation plus importante de la calcification à 3 semaines de traitement pourrait être le fruit de l'addition des facteurs qui ont été discutés plus haut. De plus, comme chaque temps de traitement correspond à des groupes de rats différents, il peut arriver qu'un groupe réagisse différemment d'un autre à l'intérieur d'une même étude.

L'administration chronique de L-NAME lors de l'initiation de la calcification a prévenu la déposition de calcium sans toutefois avoir un impact sur la rigidité artérielle. L'absence de modulation du PWV par le L-NAME pourrait s'expliquer par le fait que la calcification n'est pas le seul facteur qui influence la rigidité artérielle. Par exemple

l'administration de L-NAME pourrait avoir prévenu la calcification sans toutefois moduler la fibrose [342]. La prévention de la calcification de l'aorte par le L-NAME a été quelque peu surprenante et avait été perçue, au départ, comme un problème dans la méthodologie et cette étude avait été mise de côté. Après avoir pu reproduire ces résultats plusieurs fois, une investigation plus approfondie a été entreprise. L'administration de L-NAME devait donc inhiber une substance impliquée dans les processus de mise en place de l'élastocalcinose. Comme le L-NAME est connu pour être un inhibiteur non sélectif des NOS [58], nous avons voulu savoir si en plus de la eNOS, la iNOS était exprimée au niveau de l'aorte dans le traitement WVK. À notre grande surprise, la iNOS était exprimée de manière basale au niveau de l'aorte, le traitement WVK l'a augmentée et le L-NAME l'a diminuée. Contrairement à la eNOS, l'activité de la iNOS dépend de son degré d'expression. En effet, une étude a montré une forte diminution de l'expression de la iNOS dans des cœurs de rats suite à 4 semaines d'administration de L-NAME [460]. Une diminution d'expression a également été remarquée avec un inhibiteur sélectif pour la iNOS, le 1400W [461]. Étant donnée la production massive de NO par la iNOS, elle pourrait être impliquée dans l'initiation de la calcification au cours du traitement WVK. Son inhibition serait donc bénéfique pour limiter le développement de l'élastocalcinose. En plus des immunobuvardage de type Western, des expériences d'immunohistochimie ont permis de localiser la iNOS au niveau de l'adventice. À cause de la forte proportion de fibroblastes au niveau de l'adventice et de la forme allongée des cellules colorées, la iNOS pourrait être exprimée par les fibroblastes. Une étude utilisant un modèle *in vitro* de culture d'anneaux aortiques ainsi qu'un modèle animal a montré l'expression de la iNOS au niveau de l'adventice par les fibroblastes, mais aussi par les cellules endothéliales de l'intima [38]. Dans notre étude, l'expression est beaucoup plus importante au niveau de l'adventice que dans l'intima. Sur quelques lames, une expression a été observée au niveau de l'endothélium, mais pas sur toutes les coupes d'aorte. Comme l'endothélium est très fragile, il est possible qu'il ait été endommagé suite à la manipulation des vaisseaux.

En plus de la iNOS, l'expression de d'autres protéines a été mesurée. La eNOS a été augmenté de 53% et sa phosphorylation de 26% lors du traitement WVK. Malgré l'accroissement de l'expression et de l'activité de la eNOS, ces modulations ne sont pas significatives, mais la eNOS semble tout de même être impliquée dans l'initiation de la calcification, peut-être pour limiter celle-ci. Plusieurs études rapportent une diminution de l'expression et de l'activité de la eNOS lors d'une augmentation de la rigidité artérielle [462, 463]. De plus, avec l'âge, l'expression [366, 367] et l'activité de la eNOS [368] sont diminuées au profit de la iNOS [367]. Dans notre étude, ça ne semble pas être le cas puisque, même si l'effet est modeste, l'expression et l'activité de la eNOS sont augmentées dans le modèle WVK. L'administration de L-NAME ne semble pas avoir modulé l'expression de la eNOS, mais les valeurs sont tout de même plus basses que dans les groupes WVK seul. Le L-NAME semble avoir eu un effet plus important sur l'activité de la eNOS puisque sa phosphorylation a été légèrement augmentée au cours du traitement WVK et l'administration du L-NAME a ramené ces valeurs aux mêmes niveaux que les témoins. Certaines études ont montré une augmentation de l'expression de la eNOS dans des modèles animaux de dysfonction endothéliale [234, 464]. Cette augmentation n'a toutefois pas été observée dans les groupes +L-NAME.

Par l'administration de L-NAME, nous avons voulu mimer une dysfonction endothéliale. Par contre, contrairement à ce qui se passe dans la pathologie, l'induction chimique d'une dysfonction endothéliale a eu pour conséquence d'inhiber toutes les NOS. Cette inhibition nous a permis de mettre en évidence l'expression de la iNOS qui semble être impliquée dans l'initiation de la calcification puisque l'administration de L-NAME n'a pas augmenté la déposition de calcium, mais l'a plutôt prévenu. Il est certain que le L-NAME a également inhibé la eNOS, qui semble, selon la littérature, bénéfique. Une explication possible pourrait être que l'inhibition de la iNOS, connue pour ses effets délétères à cause de sa production de grandes quantités de NO, a permis de limiter le développement de la calcification. De plus, comme une inhibition n'est jamais totale, le L-

NAME aurait diminué la quantité de NO au niveau vasculaire, ce qui a été bénéfique pour l'aorte.

En utilisant le modèle WVK, une étude provenant de notre laboratoire a montré l'implication de la MMP-9 dans le développement de l'élastocalcinose [313]. De plus, une étude a montré que la iNOS est nécessaire à l'expression de la MMP-9 au niveau CMLVs [465]. Il serait donc possible que l'inhibition de la iNOS par le L-NAME a diminué l'expression et l'activité de la MMP-9, enzyme responsable de la dégradation de l'élastine. Cependant, dans ce domaine, plusieurs études contradictoires ont été publiées. En effet, des études montrent que l'administration exogène de NO entraîne une diminution de l'expression de la MMP-9 [466] et que le L-NMMA l'augmente [467] alors que d'autres ont montré une augmentation de l'activité de la MMP-9 par la nitrosylation [468].

Contrairement à d'autres études publiées par notre laboratoire [435], le traitement WVK de 4 semaines n'a pas augmenté la production de l'ET. Ici, elle semble avoir un rôle mineur dans la calcification vasculaire. Malgré une diminution de la production de NO par le L-NAME, l'ET n'a pas été davantage augmentée. Cependant, si nous gardons en tête que le L-NAME a été, dans ce cas-ci, bénéfique pour l'aorte à cause de l'inhibition de la iNOS, l'absence de modulation de l'ET dans les groupes +L-NAME demeure compatible avec son rôle.

#### *b. Poursuite du traitement L-NAME*

Afin de voir les réels effets de l'inhibition de la production de NO sur l'élastocalcinose et la rigidité artérielle, une étude a été réalisée en ayant continué l'administration de L-NAME jusqu'au moment des sacrifices. Dans cette section, le traitement WVK ne semble pas avoir fonctionné puisque les valeurs hémodynamiques sont toutes plus faibles que celles du groupe témoin. La PP est quand même significativement augmentée dans le groupe WVK4, mais c'est à cause de la diminution de la PD dans ce groupe. Les valeurs de calcification sont également beaucoup plus faibles que la normale

qui est aux alentours de 3  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu [313]. Lorsque comparées à l'étude de la section *arrêt précoce du traitement L-NAME*, dont les valeurs de calcification se situent entre 3 et 5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu, les valeurs dans la section *poursuite du traitement L-NAME* sont beaucoup plus basses. En effet, elles sont d'à peine 1,5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu. Par contre, le traitement L-NAME semble avoir fonctionné puisque les valeurs de calcification obtenues sont comparables aux valeurs obtenues dans la section *arrêt précoce du traitement L-NAME*. Ainsi, comme le traitement WVK n'a pas fonctionné, l'administration de L-NAME donne l'impression d'avoir augmenté la déposition de calcium dans l'aorte ce qui serait contraire à ce qui a été observé les 3 fois que ce traitement 4 semaines a été réalisé. Idéalement, il aurait fallu reprendre cette étude sans l'arrêt du traitement.

De par les valeurs de calcification obtenues, la cinétique aurait été modifiée de telle sorte que les valeurs observées représenteraient des temps de traitement plus précoces. En effet, les valeurs sont comparables à la 2<sup>e</sup> semaine de traitement. Malgré ce problème, les valeurs de PWV dans le groupe WVK4 ne semble pas avoir été influencées par les faibles valeurs de calcium aortique. Les valeurs de PWV sont comparables à celles de la section *arrêt précoce du traitement L-NAME* ainsi que dans d'autres études [313]. Une explication possible serait que la rigidité artérielle ne dépend pas seulement de la calcification des lamelles élastiques, mais également d'autres facteurs tels que la fragmentation de l'élastine [313, 469] et la fibrose caractérisée par l'augmentation de collagène [342, 470, 471]. De plus, la fragmentation de l'élastine libère certaines molécules comme le TGF- $\beta$  qui stimule la synthèse de collagène et de fibronectine par les CMLVs [348, 349]. Le TGF- $\beta$  est d'ailleurs exprimé dans le modèle WVK. Il est activé dès la 1<sup>re</sup> semaine de traitement [313]. La mesure de l'activité du TGF- $\beta$  a été testée afin de voir si le L-NAME le modulait, mais aux temps de traitement effectués, aucune activation n'a été observée (résultats non montrés).

Malgré quelques difficultés dans cette section, il est tout de même intéressant d'observer les effets aigus du L-NAME sur les paramètres hémodynamiques ainsi que sur



l'expression protéiques. En effet, il est possible d'observer que le L-NAME a augmenté significativement la FC, la PS, la PD et la PAM sans moduler la PP. L'absence de modulation de la PP est normale puisque que le L-NAME a haussé à la fois la PS et la PD. Comme le L-NAME bloque la production de NO et qu'il n'a pas été arrêté quelques jours avant les sacrifices, cet accroissement des mesures hémodynamiques était tout à fait prévisible. D'autres études ont montré les effets aigus du L-NAME sur les paramètres hémodynamiques [262].

Concernant l'expression protéique, le traitement WVK a augmenté significativement l'expression de la eNOS sans moduler la iNOS. Dans la section *arrêt précoce du traitement L-NAME*, la iNOS a été significativement augmentée à 3 et à 4 semaines de traitement. Les résultats semblent variables, mais il faut garder en tête que le traitement n'a pas fonctionné dans ce groupe et que les niveaux de calcification à 4 semaines ressemblent à des niveaux de calcification normalement mesurés à 2 semaines de traitement WVK. Ainsi, une explication probable serait que le changement de cinétique entre les expériences *arrêt précoce du traitement L-NAME* et *poursuite du traitement L-NAME* aurait également modifié la cinétique d'expression de la iNOS. Comme celle-ci semble être augmentée dans les dernières semaines de traitement WVK, elle n'aurait pas eu le temps d'être augmentée dans la 2<sup>e</sup> série d'expériences. La eNOS, quant à elle, est peut-être exprimée plus précocement dans l'initiation de la calcification. Dans la section *arrêt précoce du traitement L-NAME*, elle est déjà augmentée de 28% à la 1<sup>re</sup> semaine de traitement WVK. Cette étude vient confirmer l'importance de la eNOS dans l'initiation de la calcification vasculaire. En effet, l'accroissement de son expression lors du traitement WVK pourrait être un des mécanismes enclenchés par l'organisme pour palier au déséquilibre entraîné par l'administration de warfarine et ainsi limiter l'élastocalcinose. Il est certain qu'une hausse d'expression n'implique pas nécessairement une hausse de la production de NO. Toutefois, il est possible de croire que cette augmentation de l'expression de la eNOS s'est traduite par une élévation de la production de NO. Il y a des indices qui suggèrent une hausse de la production de NO. En effet, dans la section *arrêt*

*précoce du traitement L-NAME*, il a été possible d'observer une hausse de l'expression de la eNOS et de son activité, sans toutefois que celles-ci soient significatives. Dans la section *poursuite du traitement L-NAME*, son expression est significativement augmentée, mais pas son activité et ce malgré une hausse de 38% de sa phosphorylation. Toutefois, l'intervalle de confiance indique que la hausse de la phosphorylation est très près d'être significative.

Dans la *section arrêt précoce du traitement L-NAME*, l'expression de la GCs a été augmentée dans le modèle WVK et le L-NAME l'a diminuée. Ces modulations ne sont toutefois pas significatives. Par contre, dans la section *poursuite du traitement L-NAME*, le traitement WVK a légèrement diminué son expression et le L-NAME a davantage accentué cette diminution. Des études ont montré une diminution de l'expression de la GCs dans un contexte de vieillissement [472] alors que d'autres études, dans un contexte de dysfonction endothéliale, obtiennent des résultats contradictoires [473, 474]. De plus, dans une étude utilisant le L-NAME pour induire une dysfonction endothéliale, l'expression de la GCs a été diminuée [475]. Cette étude serait donc en lien avec nos résultats, même si ce volet est encore passablement incertain.

Globalement, l'administration de L-NAME lors de l'initiation de la calcification a prévenu l'élastocalcinose sans toutefois modifier le PWV. Le traitement WVK a augmenté l'expression de la iNOS. Elle serait ainsi impliquée dans les processus de calcification vasculaire et de rigidité artérielle. La eNOS semble également impliquée. La hausse de son expression lors du traitement WVK pourrait être bénéfique pour limiter l'élastocalcinose alors que l'expression de la iNOS serait délétère. Afin de discriminer les effets de la eNOS et de la iNOS, l'inhibition sélective de cette dernière pourrait fournir davantage d'information sur sa réelle implication dans les mécanismes d'élastocalcinose menant à une rigidité artérielle.

### 7.2.1.2. Progression de la calcification

#### a. Arrêt précoce du traitement L-NAME

Dans cette partie, le traitement WVK a augmenté la PS, la déposition de calcium dans l'aorte et la rigidité artérielle telle que montrée par la hausse du PWV et de la PP. L'administration de L-NAME a davantage augmenté la PS, la PD et conséquemment la PAM. En modulant à la fois la PS et la PD, le L-NAME n'a pas amplifié la PP sauf à la semaine 3. Cette amplification des mesures hémodynamiques n'est pas surprenante puisque le L-NAME est connu pour inhiber la production de NO et augmenter la pression artérielle [476].

L'administration chronique de L-NAME lorsque la calcification est bien établie a augmenté significativement la déposition de calcium dans l'aorte entraînant du même coup une hausse de la rigidité artérielle. Ainsi, il est clair que l'inhibition de la production de NO est délétère pour l'aorte. Une explication possible pour expliquer l'augmentation de la calcification induite par le L-NAME impliquerait l'activation des MMPs. Quelques études ont récemment montré l'implication des MMPs dans la calcification vasculaire [313, 332]. De plus, des études ont montré que l'inhibition du NO augmente l'expression et l'activité des MMPs au niveau de l'aorte, du cœur et des reins [433, 477, 478]. Une autre explication possible est basée sur une étude qui a exploré l'expression génique des cellules musculaires lisses de l'aorte lors de l'administration chronique de L-NAME. Cette étude a montré l'implication de deux gènes codant pour des protéines connues pour leur implication dans la calcification vasculaire [384]. En effet, les expériences génétiques et d'immunohistochimie ont montré que l'OPN et la BSP sont augmentées suite à l'administration chronique de L-NAME. L'OPN est connue pour être un puissant inhibiteur de la formation de l'hydroxyapatite *in vitro* [479] tandis que la BSP est impliquée dans la formation osseuse en induisant la nucléation de l'hydroxyapatite [399]. De plus, le L-NAME entraîne une hausse de l'expression du TGF- $\beta$  qui provoque une

fibrose au niveau cardiaque [480] alors que d'autres ont observé une induction génique et protéique du TGF- $\beta$  et des collagènes I et IV au niveau du rein suite à l'inhibition du NO [433]. Ainsi, le NO pourrait limiter l'élastocalcinose par l'inhibition de la BSP, protéine facilitant les processus de calcification ainsi que la fibrose par l'inhibition du TGF- $\beta$ , facteur de croissance impliqué dans l'augmentation du collagène.

Dans le modèle WVK, la coloration Von Kossa de coupes d'aortes servant à localiser la calcification a permis de voir qu'en plus de la déposition de calcium sur les lamelles élastiques près de l'adventice, l'administration de L-NAME a également provoqué une calcification des lamelles plus près de l'intima suggérant que le NO pourrait être protecteur pour les fibres d'élastine près de la lumière du vaisseau.

Il existe un équilibre entre le NO et l'ET [459], donc en inhibant le NO, les concentrations d'ET devraient être plus importantes. Une étude a montré que l'ET endogène contribue à l'augmentation du PWV puisque l'administration d'un inhibiteur du récepteur ET<sub>A</sub> a prévenue cette hausse. Dans cette même étude, la perfusion d'ET a augmenté les valeurs de PWV [269]. L'utilisation d'un antagoniste des récepteurs à l'ET, le darusentan, a même permis de régresser l'élastocalcinose dans le modèle WVK [385]. Une étude chez des souris qui surexpriment l'ET et où le gène de la eNOS a été inactivé (ET +/+ eNOS -/-) montre une augmentation de la pression systolique par rapport aux souris eNOS -/- ou aux souris sauvages [481]. Dans la présente étude, le traitement WVK n'a pas modulé les taux d'ET dans l'aorte contrairement à ce qui a été rapporté dans d'autres études de notre laboratoire [435]. L'administration de L-NAME a toutefois augmenté significativement les concentrations locales d'ET et ce dès la 1<sup>re</sup> semaine de traitement. Visuellement, dans le modèle WVK, l'ET est exprimée au niveau des zones de calcification situées dans la média près de l'adventice. Normalement, l'ET n'est exprimée qu'au niveau de l'endothélium.

*b. Poursuite du traitement L-NAME*

Dans cette section le L-NAME n'a pas été arrêté quelques jours avant les sacrifices ce qui a permis d'évaluer ses effets aigus. Tout comme dans la partie initiation de la calcification, le traitement WVK n'a pas donné les résultats attendus. En effet, la plupart des valeurs de mesures hémodynamiques sont inférieures à celles du groupe témoin. Malgré une augmentation significative des taux de calcium aortique, ceux-ci sont environ 50% plus bas que les valeurs obtenues dans la section *arrêt précoce du traitement L-NAME*. Cette diminution de l'efficacité du traitement WVK pourrait s'expliquer par l'administration d'une quantité plus importante de vitamine K. En effet, la vitamine K limite la mortalité en évitant les hémorragies cependant, elle peut également interférer dans l'efficacité de la warfarine à induire une calcification vasculaire puisqu'elle permet la carboxylation de la MGP via l'activation de la  $\gamma$ -glutamate carboxylase. Même si la DT-diaphorase est 100 fois moins active au niveau vasculaire qu'au niveau hépatique [448], il y a une certaine quantité de vitamine K hydroquinone qui est utilisée au niveau de l'aorte et qui peut ainsi contrer l'action de la warfarine. L'équilibre est fragile entre la vitamine K et la warfarine ainsi, une modification dans les doses, si minime soit-elle, jouera sur la calcification et/ou la mortalité. Un autre indice suggérant l'augmentation de la vitamine K est l'absence de mortalité dans cette étude. Normalement, les études comportent environ 5% de mortalité [312]. Le groupe +L-NAME8 semble, quant à lui, avoir été moins affecté car, même si ces taux de calcium sont plus bas que la normale et qu'ils ne sont pas significativement plus importants que le groupe WVK8, ils sont semblables aux valeurs mesurées dans la section *arrêt précoce du traitement L-NAME*. Tout comme dans la section initiation de la calcification, les valeurs de PWV ont été très peu influencées par les faibles taux de calcium aortique. Ses valeurs sont comparables à celles obtenues dans la section *arrêt précoce du traitement L-NAME*. Tel que mentionné précédemment, la rigidité artérielle n'est pas influencée que par la calcification de l'élastine, mais également par sa fragmentation et la fibrose. En effet, nous avons mesuré les taux de collagène au niveau

l'aorte dans le modèle WVK ainsi que chez des rats ayant reçu du L-NAME. Il a été possible d'observer que le collagène est augmenté significativement dans les zones de calcification comparativement aux zones non calcifiées (résultats non montrés). Une autre étude du laboratoire a également montré ces hausses de collagène [436]. Ces études suggèrent que dans le modèle WVK, l'accumulation de collagène au niveau la paroi aortique pourrait également être un mécanisme impliqué dans la rigidité artérielle.

Dans cette étude, malgré une calcification anormalement basse, il est intéressant d'observer les effets aigus du L-NAME sur les paramètres hémodynamiques et l'expression protéique. Telle qu'attendue, l'administration de L-NAME a augmenté significativement la PS, la PD et conséquemment la PAM. Les comparaisons statistiques ont été faites par rapport au traitement WVK et comme les mesures hémodynamiques du groupe WVK8 sont plus basses que les témoins, il est d'autant plus intéressant d'observer que les valeurs hémodynamiques du groupe L-NAME8 sont plus élevées que les témoins. Toutefois, il est certain que dans cette étude, les résultats obtenus sont la combinaison des effets aigus et chroniques du L-NAME.

Tout comme dans la partie initiation de la calcification ainsi que dans la section *arrêt précoce du traitement L-NAME* de la partie progression de la calcification, le traitement WVK a augmenté l'expression de la eNOS. Par contre, dans la présente section, le traitement WVK ne semble pas avoir influencé son activité. Cette absence de modulation de la phosphorylation n'est pas attribuable à l'efficacité du traitement WVK puisque la p-eNOS a été augmentée dans la section *poursuite du traitement L-NAME* de la partie initiation de la calcification, section où la calcification vasculaire est également anormalement faible. Par contre, il est possible d'observer que la variation de l'expression de la p-eNOS dans le groupe WVK8 est particulièrement élevée. Il est donc difficile de déterminer sa réelle implication dans la progression de la calcification. De plus, contrairement à la partie initiation de la calcification où l'expression de la iNOS a plus que doublée dans les 2 dernières semaines de traitement WVK, dans la partie progression de la

calcification, son rôle semble beaucoup moins important puisqu'elle diffère peu ou pas du tout par rapport au groupe témoin. Les mesures d'expression effectuées dans la section *poursuite du traitement L-NAME* abondent dans le même sens. Toutefois, l'expression de la iNOS à la semaine 8 dans la section *arrêt précoce du traitement L-NAME* a été considérablement augmentée par le traitement WVK, mais la variation à l'intérieur de ce groupe est importante ce qui complique l'interprétation. Finalement, le traitement WVK semble avoir diminué l'expression de la GCs dans la progression de la calcification. Ces résultats diffèrent de la partie initiation de la calcification où là, l'expression de la GCs semble avoir été augmentée dans les dernières semaines, mais là encore, la variation a été très importante ce qui complique l'interprétation. D'une manière générale, l'expression protéique dans les groupes L-NAME n'a pas subi de modifications significatives. Il serait donc possible de penser que le L-NAME n'influence pas de manière chronique l'expression des protéines investiguées dans la progression de la calcification. Par contre, dans la section *poursuite du traitement L-NAME*, l'expression protéique a été diminuée dans le groupe +L-NAME8. Malgré des différences non significatives, le L-NAME semble donc moduler de manière aiguë l'expression protéique qui retourne à la normale lorsque ce traitement est interrompu.

Globalement, l'administration de L-NAME lors de la progression de la calcification a augmenté l'élastocalcinose et le PWV. Dans un contexte de dysfonction endothéliale, l'ET serait impliquée dans les processus d'amplification de la calcification vasculaire entraînant une hausse de la rigidité artérielle. Ainsi, le NO endogène dans la progression de la calcification semble être protecteur au niveau de l'aorte puisqu'il limite la progression et la calcification et conséquemment la rigidité artérielle. Afin de déterminer les mécanismes par lesquels le NO limite l'élastocalcinose, l'expression ainsi que l'activité du TGF- $\beta$  et de certaines MMPs (MMP-2 et MMP-9) pourraient être étudiées. De plus, dans le modèle WVK, aucun indice de stress oxydatif n'a été observé, mais il serait intéressant de vérifier sa présence lorsque la fonction endothéliale est altérée par l'administration de L-NAME.

### **7.2.2. Rôle physiologique du NO et dysfonction endothéliale**

L'inhibition de la production de NO par le L-NAME mime une dysfonction endothéliale telle que retrouvée chez les personnes âgées. En effet, le vieillissement vasculaire provoque une sénescence au niveau des cellules endothéliales qui entraîne une diminution progressive de la vasodilatation dépendante de l'endothélium [354, 355]. À la lumière des données obtenues, l'inhibition de la production de NO par le L-NAME une fois la calcification bien établie serait néfaste sur le développement de l'HSI. Une étude récente a montré que la fonction endothéliale est diminuée chez des gens souffrant d'HSI comparativement à des sujets normotendus du même âge et à des sujets jeunes. De plus, le PWV est indépendamment associé avec la fonction endothéliale. Ces résultats suggèrent que la perte de fonction endothéliale est associée à l'âge et contribue à l'augmentation de la rigidité artérielle chez des patients atteints d'HSI [482]. Les résultats de cette étude sont en lien avec nos découvertes montrant une augmentation encore plus importante de l'élastocalcinose et de la rigidité artérielle dans un modèle expérimental d'HSI où la production de NO a été abolie. Contrairement à la pathologie humaine, le modèle WVK ne présente pas de dysfonction endothéliale [312], donc l'administration de L-NAME vient améliorer davantage le modèle animal d'HSI en mimant une dysfonction endothéliale. Cette dysfonction endothéliale a provoqué une augmentation significative des concentrations locales d'ET, qui pourrait, à la lumière de nos résultats antérieurs, être impliquée dans l'amplification de l'élastocalcinose et de la rigidité artérielle observée suite à l'administration de L-NAME au cours de l'HSI. Des études ont montré que la rigidité artérielle est régulée en partie par le tonus vasculaire qui à son tour dépend de médiateurs comme le NO [261] et l'ET [269]. Ainsi, en diminuant la production de NO par le L-NAME, l'ET a été augmentée et elle est également connue pour hausser le PWV chez l'homme [269]. La dysfonction endothéliale provoque donc d'un côté la diminution du NO qui est bénéfique et conséquemment une augmentation de l'ET qui est délétère. Il serait



donc souhaitable d'améliorer la fonction endothéliale chez les patients hypertendus et âgés afin de limiter la sévérité de l'HSI.

L'administration de L-NAME avait pour but d'induire une dysfonction endothéliale chez les rats recevant le traitement WVK puisque ce dernier n'affecte pas la production de NO. Il est certain que l'induction chimique d'une dysfonction endothéliale est un modèle qui ressemble à ce qui se passe dans la pathophysiologie du vieillissement et chez les patients souffrant d'HSI [482]. Cependant, ce modèle n'est pas parfait. L'étude d'initiation de la calcification en est un exemple. Chez l'homme, selon la littérature, une dysfonction endothéliale serait délétère puisque son amélioration par l'administration de certains médicaments a des effets bénéfiques, notamment sur la rigidité artérielle [267]. Par contre, dans notre étude, le L-NAME a prévenu l'élastocalcinose, possiblement par l'inhibition de la iNOS. Des études ont montré que la iNOS est augmentée avec l'âge [367] et que son inhibition rétablit la fonction endothéliale [483]. Tel que mentionné précédemment, le modèle WVK ne présente pas de dysfonction endothéliale, donc la iNOS n'est pas impliquée dans la détérioration de la fonction endothéliale dans ce contexte-ci. Elle est également souvent associée au stress oxydatif ainsi qu'à l'inflammation, mais aucun marqueur de ces phénomènes n'a été identifié dans le modèle WVK [393, 484]. Malheureusement, en se basant sur les résultats obtenus, nous n'avons pas pu démontrer les effets d'une dysfonction endothéliale sur les processus d'initiation de l'élastocalcinose et de la rigidité artérielle. Toutefois, avec les résultats obtenus dans la partie progression de la calcification, il est possible d'affirmer que le NO limite la calcification vasculaire et la rigidité artérielle puisque son inhibition par le L-NAME les a amplifiés.

L'implication de l'ET dans un contexte d'HSI et de dysfonction endothéliale semble peu importante dans les processus d'initiation de la calcification. Cependant, comme dans cette étude, la dysfonction endothéliale induite par le L-NAME n'a pas amplifiée la calcification vasculaire, mais l'a plutôt prévenue, l'absence de modulation de l'ET n'est pas si surprenante.

D'une façon globale, nous avons déterminé l'implication du NO endogène dans l'initiation et la progression de l'élastocalcinose et la rigidité artérielle. En effet, le NO endogène semble être protecteur au niveau de l'aorte puisqu'il limite la progression de la calcification vasculaire. Ainsi, dans un contexte d'une dysfonction endothéliale, l'élastocalcinose et la rigidité artérielle sont amplifiées. Dans les processus d'initiation de l'élastocalcinose, les conclusions sur l'implication réelle du NO sont moins claires, mais quelques indices suggèrent qu'il serait également important.

### **7.3. Aspect thérapeutique**

L'inhibition de la production de NO endogène par l'administration de L-NAME a permis de mettre en évidence l'implication de la iNOS dans les processus d'initiation de la calcification ainsi que de découvrir l'importance du NO dans la limitation de la progression de la calcification vasculaire. Si le NO est bénéfique dans la progression de la calcification, son administration exogène pourrait donc être efficace pour diminuer la rigidité artérielle par une réduction de la progression ou même une régression de la calcification vasculaire.

#### **7.3.1. Administration de NO exogène**

##### **7.3.1.1. Effet aigu du sinitrodil**

Plusieurs études ont montré une amélioration aiguë de la rigidité artérielle par le NO dans différents lits vasculaires. Chez l'homme en santé, la NTG sublinguale augmente la compliance et diminue le PWV au niveau de l'artère brachiale [382]. De plus, des méthodes non-invasives de mesure de la rigidité artérielle chez l'homme en santé montrent également que la perfusion de L-NMMA augmente l'Aix et le PWV [264]. Dans notre étude, l'administration d'un donneur de NO, le sinitrodil, a diminué transitoirement la rigidité au niveau de l'aorte comme l'ont montré les valeurs de PWV. Il est peu probable que cet effet aigu passe par un changement de la composition de la paroi vasculaire.

Toutefois, la rigidité artérielle des grosses artères pourrait être modulée par le niveau de tonus vasculaire des CMLVs qui est, à son tour, modulée par le NO, connu pour induire une relaxation [485, 486]. Toutefois, la modulation du tonus vasculaire n'est pas facile à prouver *in vivo*, mais de nombreuses études ont montré que le tonus peut être modifié par différents médiateurs tels que l'AngII, l'ET, le peptide natriurétique de type C et le NO [487]. Les CMLVs qui sont stimulées par un vasoconstricteur ou dans le cas présent, un vasodilatateur, devraient augmenter ou diminuer la rigidité artérielle [488]. Dans notre étude, le sinitrodil a diminué le PWV qui s'est accompagné d'une baisse concomitante de la PAM (résultats non présentés) suggérant que les artères de résistance sont également dilatées. Au départ, le sinitrodil avait été choisi à cause de sa sélectivité pour les grosses artères [144] ainsi que pour l'absence de tolérance [489]. Avec la baisse de la PAM, il a des effets vasodilatateurs sur les artères de résistance. D'autres études ont également montré une modulation concomitante du PWV et de la PAM. En effet, Fitch et al. ont montré que l'inhibition de la production de NO chez le rat augmente la rigidité artérielle tout en augmentant également la PAM [262]. Une étude a montré une diminution du PWV suite à une perfusion de nébivolol. Cette réduction de rigidité artérielle a été abolie après l'administration de L-NMMA confirmant que les effets sur le tonus vasculaire du nébivolol passe par la relâche de NO [265]. De plus, plusieurs études chez l'homme ont montré une modulation de la rigidité artérielle en utilisant soit des inhibiteurs des NOS ou soit des donneurs de NO. Des études cliniques ont montré que la NTG réduit le PWV [487] et que l'infusion de L-NMMA l'augmente en plus de hausser l'Aix [490]. Ainsi, d'une manière générale nos résultats sont consistants avec les effets aigus de l'administration de NO exogène décrits dans d'autres études.

Il est possible d'observer que l'injection de sinitrodil a eu un impact plus important chez les rats WVK que chez les témoins, tel que mesuré par l'aire sous la courbe de la réduction du PWV suite à l'injection de sinitrodil. Même si la différence entre les 2 groupes n'est pas significative, il y a une forte tendance. Dans la figure 23, il est également possible de remarquer que malgré des valeurs de PWV plus hautes dans les groupes WVK

et WVK+Sin comparativement aux groupes témoins, la diminution du PWV est plus importante dans le groupe WVK+Sin que dans le groupe Tem+Sin. Afin d'expliquer cette différence, il a été suggéré que les CMLVs du groupe WVK seraient plus contractées. En effet, dans les études de vasoréactivité, les anneaux aortiques sont normalement précontractés afin d'uniformiser le tonus vasculaire et être en mesure de comparer les différents vaisseaux entre eux [312, 481]. En étant plus contractées, les CMLVs du groupe WVK+Sin auraient été plus susceptibles de se relaxer contrairement à celles du groupe Tem+Sin qui sont déjà dans un état plus relâché.

### **7.3.1.2. Effet chronique du sinitrodil**

Comme le sinitrodil a eu des effets prometteurs sur la rigidité artérielle lorsqu'il a été administré de façon aiguë, ses effets chroniques ont également été étudiés. Contrairement à l'administration aiguë, le sinitrodil a augmenté la calcification. Ce qui a été à la fois surprenant et décevant. En effet, l'inhibition des NOS par le L-NAME (étude précédente) ou l'administration exogène de NO (présente étude) produit le même effet. L'hypothèse de la tolérance suite à l'administration chronique de sinitrodil a été émise afin d'expliquer l'augmentation de la déposition de calcium. Nous avons essayé de démontrer qu'il y avait effectivement une tolérance. Afin d'éviter les effets aigus du donneur de NO, les traitements ont été arrêtés 3 jours avant les sacrifices. Cette procédure était bien adaptée pour étudier les effets chroniques des différents agents pharmacologiques sur les paramètres hémodynamiques indépendamment de la vasoréactivité. Toutefois, cette précaution limite l'interprétation des résultats de la possible implication de la tolérance parce que l'activité de la voie du NO a eu amplement le temps de revenir à des valeurs normales. Néanmoins, l'expression de la eNOS et de la GCs a été mesurée. Dans notre étude, aucun changement dans l'expression de la eNOS suite au traitement chronique avec du sinitrodil n'a été observé. Une étude, utilisant l'ISDN, a montré que l'expression de la eNOS est régulée à la baisse par le GMPC au niveau des cellules endothéliales des artères coronaires chez l'homme ainsi qu'au niveau de l'aorte de rats [491]. Toutefois, en gardant

en tête la possibilité d'une tolérance aux nitrates, la diminution de la disponibilité du NO pourrait être secondaire à une diminution de la production de GMPC et ainsi une élévation de l'expression de la eNOS serait attendue. En conséquence, dans une étude où des aortes de rats ont été traitées 3 jours avec de la NTG, celle-ci a montré une augmentation de l'ARNm de la eNOS ainsi que la protéine associée [124]. De plus, concernant la GCs, certaines études ont montré une diminution de son expression lors de l'administration de donneurs de NO [492, 493] tandis que d'autres ont observé une augmentation de 2 fois suite à une perfusion à long terme de NTG (modèle de tolérance aux nitrates) [494]. L'administration de 12 mg/kg/jour de sinitrodil n'a pas diminué davantage l'expression de la GCs qui avait déjà subi une diminution d'environ 30% lors du traitement WVK, ce qui est en lien avec les résultats obtenus dans l'étude de progression de la calcification. Par contre, l'administration de 100 mg/kg/jour de sinitrodil a doublé l'expression de la GCs comparativement au traitement WVK. Cette augmentation est en accord avec l'équipe de Mulsch qui ont également observé une forte augmentation de l'expression de la GCs suite à la perfusion de NTG [494]. En plus, cette dose de sinitrodil a diminué significativement la production de nitrates plasmatiques qui est un indice de NO. À cette dose, le sinitrodil semble diminuer la quantité de NO endogène, possiblement par un mécanisme de tolérance. Des études ont montré qu'il existe une boucle de rétroaction négative sur les NOS [495, 496]. Plus particulièrement, une étude, utilisant l'isosorbide dinitrate, a montré que l'expression de la eNOS est régulée à la baisse par le GMPC au niveau des cellules endothéliales des artères coronaires chez l'homme ainsi qu'au niveau de l'aorte de rats [491]. À la lumière de ces informations, la réduction de la production de nitrates via une boucle de rétroaction négative serait plausible. Il n'est donc plus surprenant que l'administration exogène de NO augmente la calcification vasculaire et par conséquent la rigidité artérielle. D'une façon globale, la diminution de l'activité de la eNOS ou l'action du NO amplifie la déposition de calcium et le PWV, un indice de rigidité artérielle.

L'administration de sinitrodil tend à augmenter les concentrations locales d'ET. La tolérance est souvent associée à une augmentation du stress oxydatif caractérisé entre autre par un découplage de la eNOS [497] et l'augmentation de la NADPH oxydase [146, 498]. Quelques études ont montré que le stress oxydatif, qui contribue à la tolérance aux nitrates, a également tendance à augmenter l'ET [499]. Il est toutefois à noter qu'aucun indice de stress oxydatif n'a été observé dans le modèle WVK [484], mais il est cependant possible que l'administration de sinitrodil l'induisse.

Globalement, le sinitrodil module de façon aiguë la rigidité artérielle possiblement par la modulation du tonus vasculaire sans toutefois avoir des effets sur la composition de la paroi artérielle. Comme le modèle WVK n'affecte pas la fonction endothéliale, les concentrations endogènes de NO semblent être optimales puisque l'administration de NO exogène provoque une augmentation de l'élastocalcinose possiblement par le développement d'une tolérance. Pour éviter cette tolérance et mimer plus adéquatement l'HSI chez l'homme, l'administration concomitante de L-NAME et de sinitrodil pourrait être testée. Des résultats prometteurs ont déjà été obtenus. En effet, lors de l'étude sur le sinitrodil, un groupe de rats a été traité simultanément avec du sinitrodil et du L-NAME. Dans ce groupe, les taux de calcification étaient moindres que dans le groupe L-NAME seul ou sinitrodil seul. Ces résultats suggèrent qu'en présence d'une dysfonction endothéliale (mimé ici par le L-NAME), un donneur de NO pourrait avoir un effet bénéfique. Pour appuyer cette hypothèse, les nitrates plasmatiques étaient abaissés chez les rats ayant reçus du sinitrodil ou du L-NAME. L'administration concomitante de sinitrodil et de L-NAME a rétabli les taux de nitrates à des valeurs comparables aux rats WVK (résultats non montrés et non publiés).

Les donneurs de NO font partie d'une classe de médicaments peu homogène, il serait donc pertinent d'en tester un autre. En effet, le nébivolol, un  $\beta$ -bloqueur stimulant la relâche de NO, semble très prometteur puisqu'il diminue la rigidité artérielle de façon chronique [267].

## 7.3.2. Augmentation des effets endogènes du NO

### 7.3.2.1. Effet du tadalafil dans l'initiation de la calcification

Les inhibiteurs de phosphodiesterase de type 5 sont utilisés dans le traitement de la dysfonction érectile depuis maintenant plusieurs années et plus récemment, ils ont été approuvés pour le traitement de l'hypertension pulmonaire. De plus en plus d'études montrent également leur efficacité dans les maladies coronariennes [500], l'insuffisance cardiaque [501] et l'hypertension artérielle [502]. Peu d'études ont toutefois évalué l'efficacité des iPDE à moduler la rigidité artérielle et aucune n'a regardé l'élastocalcinose. De par ses propriétés pharmacocinétiques intéressantes, c'est-à-dire une longue demi-vie et une liaison préférentielle à l' $\alpha_1$  glycoprotéine plutôt qu'à l'albumine [455], le tadalafil (Cialis) a été préféré au sildénafil (Viagra) pour être administré oralement à des rats WVK. Tel que mentionné précédemment, l'utilisation de la warfarine pour induire la calcification vasculaire entraîne certains problèmes puisqu'elle est impliquée dans plusieurs interactions pharmacocinétiques. Toutefois, des études d'interactions n'ont montré aucun effet significatif suite à la co-administration de tadalafil et de warfarine [455].

Il est à noter qu'étant donné sa mise en marché plus récente, le tadalafil a été beaucoup moins étudié que le sildénafil, donc une grande partie des études citées impliquent le sildénafil. Toutefois, une étude a comparé les effets hémodynamiques des 3 iPDEs autorisés par les gouvernements, soient le sildénafil, le vardénafil et le tadalafil, au niveau de l'aorte de rat et a montré qu'ils avaient des effets similaires. [503].

Avec les résultats encourageant provenant des expériences *ex vivo* qui démontraient qu'un iPDE de type 5, le T-1032, peut régresser l'élastocalcinose, tous les espoirs étaient permis. Malheureusement, l'administration chez l'animal du tadalafil n'a eu aucun effet sur la calcification de l'aorte. Ses effets hémodynamiques aigus ont été toutefois plus évidents. Quelques études ont montré l'efficacité de l'administration aiguë du sildénafil sur

la réduction de la rigidité artérielle telle que mesurée par le PWV [501, 504]. D'autres ont montré une diminution aiguë de l'AIX [505, 506]. Dans notre étude, il a également été possible d'observer une diminution du PWV. L'effet aigu des iPDEs de type 5 sur la pression artérielle a également été regardé dans différentes études et comparativement à ce que nous avons obtenus, la réduction de pression artérielle est plus modeste. En effet, dans notre étude, la diminution a été de 19/16 mmHg comparativement à 10/7 mmHg chez des sujets en santé suite à l'administration d'une dose unique de 50 mg de sildénafil [507]. Par contre, l'administration d'une dose unique de tadalafil de 10 ou 20 mg n'a pas modifié significativement la pression artérielle chez l'homme [508]. Ces différences dans la diminution de pression pourraient s'expliquer par le fait que les modulations aiguës des valeurs de pression dans notre étude viennent de la poursuite du tadalafil jusqu'au moment des sacrifices et non de l'administration d'une dose unique. Comme le tadalafil a une longue demi-vie (17,5 heures) [457], les résultats plus élevés obtenus pourrait être dus à une accumulation de médicament dans l'organisme [509]. Une autre possibilité serait que les doses administrées aux rats sont plus importantes que celles données dans les études cliniques. Dans notre étude, nous avons donné 2 mg/kg/jour. En uniformisant les unités, l'administration d'une dose unique chez l'homme de 10 mg correspond à 0,14 mg/kg en utilisant un poids corporel moyen de 70 kg (10 mg/70 kg) et à 0,29 mg/kg pour un comprimé de 20 mg de tadalafil. Il est certain qu'il est difficile d'extrapoler puisqu'il existe des différences métaboliques entre l'homme et le rat. Cependant, d'une façon générale, les doses administrées aux rats devraient être plus importantes que celle données chez l'homme. Toutefois, dans notre étude, la dose utilisée est 10 fois plus grosse que celle administrée dans les études citées et c'est peut-être ce qui explique la réduction de pression plus importante. Malgré son effet aigu sur la rigidité artérielle, le tadalafil n'a pas prévenu la déposition de calcium suggérant qu'il n'agit pas sur les composantes de la paroi vasculaire impliquées dans la rigidité.



### 7.3.2.2. Effet du tadalafil dans la progression de la calcification

Dans la partie progression de la calcification, malgré l'arrêt du tadalafil 3 jours avant les sacrifices, les valeurs de la PS, la PD et de la PAM du groupe +Tad8 étaient encore légèrement inférieures au groupe WVK8. Ceci pourrait s'expliquer par les effets résiduels du tadalafil malgré l'arrêt du traitement. Tel que mentionnée précédemment, la demi-vie du tadalafil est de 17,5 heures, donc après 3 jours d'arrêt, il se peut qu'il ait resté du tadalafil dans l'organisme.

Tout comme le sinitrodil, le tadalafil a eu un impact sur la rigidité artérielle par une modulation du tonus vasculaire, mais sans modifications de la composition de la paroi artérielle. Une étude a montré des résultats similaires. En effet, Oliver et al. ont également montré que le tadalafil a des effets aigus sur la pression et la rigidité artérielle, mais que son administration chronique ne module que très peu le PWV [502]. Au moment où cette étude a été élaborée, peu d'étude chez l'animal avait été réalisée avec le tadalafil, donc nous avons choisi la dose en se basant sur les comprimés de sildénafil et de tadalafil présents sur le marché ainsi que les doses de sildénafil administrées aux rats dans différentes études. Il est certain que cette méthode est un peu aléatoire, donc il se peut très bien que la dose ainsi que le temps de traitement ne soient pas optimaux. L'équipe d'Oliver est arrivée à des conclusions similaires suite à l'administration chronique de tadalafil chez des patients souffrant d'hypertension essentielle [502, 509].

Dans la partie progression de la calcification, l'administration de tadalafil tend à augmenter la déposition de calcium dans l'aorte. Ces résultats ressemblent à ceux obtenus avec le sinitrodil. En effet, l'administration de sinitrodil selon un protocole de progression de la calcification a augmenté les concentrations de calcium dans l'aorte ainsi que la rigidité artérielle. Dans le cas du sinitrodil, le développement d'une tolérance a été suggéré pour expliquer nos résultats. Pour le tadalafil, puisque les concentrations de NO ne sont pas plus importantes, la tolérance est peu probable, cependant, il pourrait y avoir

l'activation d'une boucle de rétroaction négative suite à l'augmentation des concentrations de GMPc qui sont déjà maximales puisque le modèle WVK ne produit pas de dysfonction endothéliale. Une étude a montré que la PKG peut inhiber l'activité de la GCs en la phosphorylant [510]. Ainsi, l'augmentation de GMPc induit par le tadalafil pourrait provoquer une activation accrue de la PKG qui irait phosphoryler la GCs en amont. Il y aurait donc une diminution de la voie du NO qui pourrait s'apparenter à une dysfonction endothéliale.

Globalement, l'administration de tadalafil module de façon aiguë la rigidité artérielle sans toutefois modifier la composition de la paroi aortique. Il n'a, en effet, aucun impact sur l'élastocalcinose.

### **7.3.3. Rôle thérapeutique du NO et dysfonction endothéliale**

Le modèle WVK n'induit pas de dysfonction endothéliale [312]. Les résultats obtenus suggèrent qu'il faut que les concentrations endogènes de NO soient optimales pour limiter l'évolution de l'élastocalcinose. Par contre, dans un contexte pathologique impliquant une dysfonction endothéliale, l'augmentation de NO exogène par l'administration d'un donneur de NO ou l'augmentation de ses effets endogènes par l'inhibition de la phosphodiesterase de type 5 pourraient être efficaces. En effet, des études animales ont montré l'efficacité du sildénafil à prévenir les effets délétères tant vasculaires que cardiaques associées au modèle d'hypertension induite par le L-NAME [511, 512]. Ces études ont, entre autre, montré que le sildénafil prévient l'augmentation de pression systolique et artérielle tout en rétablissant les concentrations de GMPc. Cependant, une étude chez l'homme a montré que malgré une hypertension essentielle, le sildénafil n'a que peu d'effet sur le PWV [502]. Avec ce résultat ainsi que les nôtres, les inhibiteurs de phosphodiesterases ne semblent pas agir sur les composantes de la paroi vasculaire afin de prévenir ou limiter l'élastocalcinose. Toutefois, comme les effets du NO passe principalement par une élévation du GMPc, les iPDEs de type 5 pourraient indirectement

améliorer la fonction endothéliale en augmentant la voie du NO en aval de sa production et ainsi maintenir ou amplifier ses effets protecteurs [513].

Le sildénafil augmente la vasodilatation dépendante de l'endothélium chez des patients souffrant de maladies coronariennes [500] et d'insuffisance cardiaque [514]. Ainsi, les iPDEs pourraient être bénéfiques dans un contexte d'hypertension systolique isolée puisque l'inhibition de production de NO par le L-NAME amplifie la calcification vasculaire et la rigidité artérielle. L'amélioration de la fonction endothéliale peut aussi se faire par l'utilisation de donneurs de NO. En effet, des études ont montré leur efficacité à réduire la rigidité artérielle [515]. De plus l'isosorbide mono et dinitrate ont permis de réduire la PS et la PP chez des patients souffrant d'HSI [437, 516]. Dans notre modèle, l'utilisation chronique d'un donneur de NO a été délétère, sûrement à cause d'une fonction endothéliale préservée. La mesure des nitrates plasmatiques a effectivement montré que la production de NO n'était pas affectée dans le modèle WVK. Par contre, l'administration de sinitrodil a diminué les nitrates suggérant une baisse de production de NO ou une diminution de sa disponibilité. Toutefois, l'administration concomitante de sinitrodil et de L-NAME a prévenu cette baisse de nitrates, probablement en partie par une prévention de la tolérance via l'action du L-NAME (résultats non montrés). En plus de prévenir la baisse des nitrates plasmatiques, l'administration concomitante de L-NAME et de sinitrodil chez des rats WVK a diminué l'augmentation de déposition de calcium induite par le L-NAME seul suggérant que le NO possède effectivement des propriétés inhibitrices sur la calcification vasculaire (résultats non présentés). Ce type d'étude serait intéressant à poursuivre pour replacer notre modèle dans un contexte pathologique plus fidèle à la condition des patients.

D'une façon générale, malgré aucun effet sur l'élastocalcinose (composition de la paroi vasculaire), le sinitrodil et le tadalafil modulent de façon aiguë la rigidité artérielle ce qui est intéressant surtout dans un contexte d'HSI où la fonction endothéliale est altérée.

## 7.4. Rôle du NO dans l'hypertension systolique isolée

Globalement, dans le modèle WVK, le NO semble avoir des effets plus protecteurs que thérapeutiques. En effet, le NO physiologique semble optimal pour limiter le développement de l'élastocalcinose et l'augmentation de la rigidité artérielle puisque bloquer sa production amplifie la pathologie. Par contre, en donner davantage ou augmenter ses effets n'ont que peu d'impact et même aggravent la situation. Toutefois, le NO a des effets bénéfiques dans plusieurs pathologies, particulièrement dans celles où la fonction endothéliale est affectée comme dans l'hypertension, les maladies coronariennes et l'insuffisance cardiaque. Je crois donc que le NO thérapeutique est tout de même prometteur dans l'HSI surtout quand une nouvelle molécule, le nébivolol, un  $\beta$ -bloqueur de 3<sup>e</sup> génération, connu pour avoir des effets vasodilatateurs par la relâche de NO, diminue efficacement la rigidité artérielle de façon chronique [267]. L'effet passe par la relâche de NO puisque la perfusion simultanée de L-NMMA avec le nébivolol atténue la réduction du PWV obtenue avec le nébivolol seul [265]. De plus, connaissant l'interaction entre le NO et l'ET, une étude de notre laboratoire montrant qu'un inhibiteur des récepteurs à l'ET, le darusentan, peut renverser l'élastocalcinose est encourageante [385]. Il est certain que dans cette étude, l'implication de l'anhydrase carbonique IV comme mécanisme permettant au calcium de se résorber suite à l'administration du darusentan a été mise en évidence, mais la diminution de la rigidité artérielle sans modification de la paroi vasculaire peut être quand même bénéfique, surtout pour les organes cibles comme le cœur, les reins et le cerveau.

Nous ne pouvons pas complètement écarter les effets du NO sur la composition de la paroi artérielle, même si nos résultats sont assez négatifs en ce sens. En effet, il semble que le NO pourrait moduler l'activité des MMPs. Dans un modèle de cœurs isolés, la perfusion de L-NAME a augmenté l'activité de la MMP-2 et la perfusion simultanée de L-NAME et de SNAP a prévenu cette hausse [477]. Ces résultats sont particulièrement

intéressant puisqu'une étude récente de notre laboratoire a montré l'implication des MMPs dans l'élastocalcinose [313].

Finalement, l'utilisation chronique de donneurs de NO semble bénéfique pour réduire la rigidité artérielle [268] mais est limitée par le développement d'une tolérance [517]. Toutefois, des études chez des patients âgés souffrant d'HSI n'ont montré aucun signe de tachyphylaxie avec un traitement à l'isosorbide dinitrate [516, 518]. Nous avons pu reproduire cette situation en combinant le sinitrodil au L-NAME. En effet, la tolérance observée avec le sinitrodil seul a été prévenue par l'administration concomitante de L-NAME.

## **Conclusion**

Avec le vieillissement de la population, l'hypertension systolique isolée est une pathologie de plus en plus courante, mais qui est loin d'avoir livré tous ses secrets. La calcification des vaisseaux en plus de la fibrose contribuent aux conséquences du vieillissement vasculaire telle que la rigidité artérielle. Ainsi, le traitement optimal de l'HSI est la réduction de la rigidité artérielle [487]. Dans l'insuffisance rénale, où il y a une calcification importante, la réduction de la rigidité et de la PAM est plus bénéfique que seulement une diminution de la PAM [339]. L'interaction complexe entre les différents facteurs qui sont impliqués dans le développement de l'HSI est au cœur des préoccupations de notre laboratoire. Le NO est l'un des facteurs qui a le potentiel d'influencer le développement et la progression de l'élastocalcinose. Mes travaux de doctorat ont permis de montrer que le NO exerce une influence positive sur la rigidité artérielle non seulement en relaxant les CMLVs, mais également en interférant dans les processus contribuant au développement à long terme de la rigidité artérielle. Malgré des résultats plutôt mitigés sur l'efficacité thérapeutique du NO dans l'élastocalcinose, sa modulation exogène mérite encore d'être investiguée.

## Bibliographie

1. Tortora G, Grabowski S, Principes d'anatomie et de physiologie. Version française de la neuvième édition ed. 2001, St-Laurent.
2. Boron W, Boulpaep E, Medical Physiology: a Cellular and Molecular Approach. 2005, Phyladelphia: Elsevier Saunders.
3. Levick J, An Introduction to Cardiovascular Physiology. Arnold ed. 2003, London.
4. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J, Biologie moléculaire de la cellule. Médecine-Sciences-Flammarion ed. 2000, Paris.
5. Vandembroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1123:134-45.
6. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cmlv/cmlv-a3.htm>.
7. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* 2007; 15:100-8.
8. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:349-63.
9. Greenwald SE, Moore JE, Jr., Rachev A, Kane TP, Meister JJ. Experimental investigation of the distribution of residual strains in the artery wall. *J Biomech Eng* 1997; 119:438-44.
10. Kelleher CM, McLean SE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and aortic development. *Curr Top Dev Biol* 2004; 62:153-88.
11. Howard PS, Macarak EJ. Localization of collagen types in regional segments of the fetal bovine aorta. *Lab Invest* 1989; 61:548-55.
12. Csiszar K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001; 70:1-32.
13. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 2005; 118:1341-53.
14. Dingemans KP, Teeling P, Lagendijk JH, Becker AE. Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media. *Anat Rec* 2000; 258:1-14.

15. Abraham D. Connective tissue growth factor: growth factor, matricellular organizer, fibrotic biomarker or molecular target for anti-fibrotic therapy in SSc? *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47 Suppl 5:v8-9.
16. Fan WH, Pech M, Karnovsky MJ. Connective tissue growth factor (CTGF) stimulates vascular smooth muscle cell growth and migration in vitro. *Eur J Cell Biol* 2000; 79:915-23.
17. Patel A, Fine B, Sandig M, Mequanint K. Elastin biosynthesis: The missing link in tissue-engineered blood vessels. *Cardiovasc Res* 2006; 71:40-9.
18. Long JL, Tranquillo RT. Elastic fiber production in cardiovascular tissue-equivalents. *Matrix Biol* 2003; 22:339-50.
19. Arribas SM, Hinek A, Gonzalez MC. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther* 2006; 111:771-91.
20. Ramirez F, Sakai LY, Rifkin DB, Dietz HC. Extracellular microfibrils in development and disease. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:2437-46.
21. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev* 2009; 89:957-89.
22. Lemaire R, Bayle J, Mecham RP, Lafyatis R. Microfibril-associated MAGP-2 stimulates elastic fiber assembly. *J Biol Chem* 2007; 282:800-8.
23. Gibson MA, Kumaratilake JS, Cleary EG. The protein components of the 12-nanometer microfibrils of elastic and nonelastic tissues. *J Biol Chem* 1989; 264:4590-8.
24. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci* 2002; 115:2817-28.
25. Bressan GM, Daga-Gordini D, Colombatti A, Castellani I, Marigo V, Volpin D. Emilin, a component of elastic fibers preferentially located at the elastin-microfibrils interface. *J Cell Biol* 1993; 121:201-12.
26. Zanetti M, Braghetta P, Sabatelli P, Mura I, Doliana R, Colombatti A, et al. EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects. *Mol Cell Biol* 2004; 24:638-50.
27. Kobayashi N, Kostka G, Garbe JH, Keene DR, Bachinger HP, Hanisch FG, et al. A comparative analysis of the fibulin protein family. Biochemical characterization, binding interactions, and tissue localization. *J Biol Chem* 2007; 282:11805-16.

28. Downing AK, Knott V, Werner JM, Cardy CM, Campbell ID, Handford PA. Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders. *Cell* 1996; 85:597-605.
29. Kostka G, Giltay R, Bloch W, Addicks K, Timpl R, Fassler R, et al. Perinatal lethality and endothelial cell abnormalities in several vessel compartments of fibulin-1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2001; 21:7025-34.
30. Bax DV, Bernard SE, Lomas A, Morgan A, Humphries J, Shuttleworth CA, et al. Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *J Biol Chem* 2003; 278:34605-16.
31. Ritty TM, Broekelmann TJ, Werneck CC, Mecham RP. Fibrillin-1 and -2 contain heparin-binding sites important for matrix deposition and that support cell attachment. *Biochem J* 2003; 375:425-32.
32. Arciniegas E, Neves CY, Candelle D, Parada D. Differential versican isoforms and aggrecan expression in the chicken embryo aorta. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004; 279:592-600.
33. Yao LY, Moody C, Schonherr E, Wight TN, Sandell LJ. Identification of the proteoglycan versican in aorta and smooth muscle cells by DNA sequence analysis, in situ hybridization and immunohistochemistry. *Matrix Biol* 1994; 14:213-25.
34. Reinboth B, Hanssen E, Cleary EG, Gibson MA. Molecular interactions of biglycan and decorin with elastic fiber components: biglycan forms a ternary complex with tropoelastin and microfibril-associated glycoprotein 1. *J Biol Chem* 2002; 277:3950-7.
35. Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol* 1998; 17:1-19.
36. Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* 2005; 85:979-1000.
37. Bou-Gharios G, Ponticos M, Rajkumar V, Abraham D. Extra-cellular matrix in vascular networks. *Cell Prolif* 2004; 37:207-20.
38. Zhang H, Du Y, Cohen RA, Chobanian AV, Brecher P. Adventitia as a source of inducible nitric oxide synthase in the rat aorta. *Am J Hypertens* 1999; 12:467-75.



39. Kleschyov AL, Muller B, Schott C, Stoclet JC. Role of adventitial nitric oxide in vascular hyporeactivity induced by lipopolysaccharide in rat aorta. *Br J Pharmacol* 1998; 124:623-6.
40. Sherwood L, *Physiologie humaine*. Traduction française de la 2e édition américaine ed. 2000, Paris: DeBoeck Université.
41. Klabunde R, *Cardiovascular physiology concepts*. ed. L.W. &Wilkins. 2005, Phyladelphia.
42. Guyton A, Hall J, *Textbook of medical physiology*. 10th edition ed. ed. Saunders. 2001, Phyladelphia.
43. McGeown J, *Physiologie, l'Essentiel*. Traduction française de la 2e édition ed. ed. Maloine. 2003, Paris.
44. Landry Y, Gies J, *Pharmacologie. Des cibles vers l'indication thérapeutique*. ed. Dunod. 2003, Paris.
45. Davis E, Loiacono R, Summers RJ. The rush to adrenaline: drugs in sport acting on the beta-adrenergic system. *Br J Pharmacol* 2008; 154:584-97.
46. Berne R, Levy M, *Cardiovascular Physiology*. 8th edition ed. 2001, St-Louis: Mosby.
47. Vanhoutte PM. Say NO to ET. *J Auton Nerv Syst* 2000; 81:271-7.
48. Nakahata N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther* 2008; 118:18-35.
49. Treschan TA, Peters J. The vasopressin system: physiology and clinical strategies. *Anesthesiology* 2006; 105:599-612; quiz 639-40.
50. Ito M, Nakano T, Erdodi F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem* 2004; 259:197-209.
51. Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* 2001; 91:1421-30.
52. Rubio AR, Morales-Segura MA. Nitric oxide, an iceberg in cardiovascular physiology: far beyond vessel tone control. *Arch Med Res* 2004; 35:1-11.

53. Moncada S, Higgs EA, Vane JR. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet* 1977; 1:18-20.
54. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-6.
55. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:9265-9.
56. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-6.
57. Feelisch M, te Poel M, Zamora R, Deussen A, Moncada S. Understanding the controversy over the identity of EDRF. *Nature* 1994; 368:62-5.
58. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357:593-615.
59. Ghafourifar P, Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* 1997; 418:291-6.
60. Carreras MC, Franco MC, Finocchietto PV, Converso DP, Antico Arciuch VG, Holod S, et al. The biological significance of mtNOS modulation. *Front Biosci* 2007; 12:1041-8.
61. Lacza Z, Pankotai E, Busija DW. Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies. *Front Biosci* 2009; 14:4436-43.
62. Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55:1015-28.
63. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23:1121-31.
64. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6:3051-64.
65. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298 ( Pt 2):249-58.

66. Stuehr DJ, Tejero J, Haque MM. Structural and mechanistic aspects of flavoproteins: electron transfer through the nitric oxide synthase flavoprotein domain. *FEBS J* 2009; 276:3959-74.
67. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411:217-30.
68. Matsuda H, Iyanagi T. Calmodulin activates intramolecular electron transfer between the two flavins of neuronal nitric oxide synthase flavin domain. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473:345-55.
69. Klatt P, Schmidt K, Lehner D, Glatter O, Bachinger HP, Mayer B. Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. *EMBO J* 1995; 14:3687-95.
70. Heinzl B, John M, Klatt P, Bohme E, Mayer B. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 1992; 281 ( Pt 3):627-30.
71. Vasquez-Vivar J, Hogg N, Martasek P, Karoui H, Pritchard KA, Jr., Kalyanaraman B. Tetrahydrobiopterin-dependent inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1999; 274:26736-42.
72. Wei CC, Crane BR, Stuehr DJ. Tetrahydrobiopterin radical enzymology. *Chem Rev* 2003; 103:2365-83.
73. Siddhanta U, Presta A, Fan B, Wolan D, Rousseau DL, Stuehr DJ. Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase. Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. *J Biol Chem* 1998; 273:18950-8.
74. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006; 113:1708-14.
75. Schmidt TS, Alp NJ. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin Sci (Lond)* 2007; 113:47-63.
76. Go YM, Park H, Maland MC, Darley-Usmar VM, Stoyanov B, Wetzker R, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase gamma mediates shear stress-dependent activation of JNK in endothelial cells. *Am J Physiol* 1998; 275:H1898-904.
77. Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R, Fleming I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand* 2000; 168:81-8.

78. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399:601-5.
79. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)* 2009; 196:193-222.
80. Harris MB, Blackstone MA, Sood SG, Li C, Goolsby JM, Venema VJ, et al. Acute activation and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287:H560-6.
81. Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca<sup>2+</sup> but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem* 2001; 276:30392-8.
82. Harris MB, Ju H, Venema VJ, Liang H, Zou R, Michell BJ, et al. Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem* 2001; 276:16587-91.
83. Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, et al. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J Biol Chem* 2002; 277:3388-96.
84. Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42:271-9.
85. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999; 399:597-601.
86. Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, et al. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* 1999; 443:285-9.
87. Bauer PM, Fulton D, Boo YC, Sorescu GP, Kemp BE, Jo H, et al. Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2003; 278:14841-9.
88. Michell BJ, Harris MB, Chen ZP, Ju H, Venema VJ, Blackstone MA, et al. Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. *J Biol Chem* 2002; 277:42344-51.

89. Matsubara M, Hayashi N, Jing T, Titani K. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by protein kinase C. *J Biochem* 2003; 133:773-81.
90. Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S, et al. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol* 1999; 9:845-8.
91. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 2001; 88:E68-75.
92. Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, Kotsonis P, Frohlich LG, Sickmann A, et al. Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 2000; 275:5179-87.
93. Michell BJ, Chen Z, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, et al. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2001; 276:17625-8.
94. Lane P, Gross SS. Disabling a C-terminal autoinhibitory control element in endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylation provides a molecular explanation for activation of vascular NO synthesis by diverse physiological stimuli. *J Biol Chem* 2002; 277:19087-94.
95. Greif DM, Kou R, Michel T. Site-specific dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by protein phosphatase 2A: evidence for crosstalk between phosphorylation sites. *Biochemistry* 2002; 41:15845-53.
96. Boo YC, Hwang J, Sykes M, Michell BJ, Kemp BE, Lum H, et al. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283:H1819-28.
97. Boo YC, Sorescu GP, Bauer PM, Fulton D, Kemp BE, Harrison DG, et al. Endothelial NO synthase phosphorylated at SER635 produces NO without requiring intracellular calcium increase. *Free Radic Biol Med* 2003; 35:729-41.
98. Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, et al. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 1996; 271:6518-22.
99. Busconi L, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem* 1993; 268:8410-3.

100. Michel T. Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32:1361-6.
101. Farazi TA, Waksman G, Gordon JI. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem* 2001; 276:39501-4.
102. Liu J, Hughes TE, Sessa WC. The first 35 amino acids and fatty acylation sites determine the molecular targeting of endothelial nitric oxide synthase into the Golgi region of cells: a green fluorescent protein study. *J Cell Biol* 1997; 137:1525-35.
103. Liu J, Garcia-Cardena G, Sessa WC. Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. *Biochemistry* 1995; 34:12333-40.
104. Prabhakar P, Thatte HS, Goetz RM, Cho MR, Golan DE, Michel T. Receptor-regulated translocation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 1998; 273:27383-8.
105. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:682-5.
106. Gachhui R, Abu-Soud HM, Ghosha DK, Presta A, Blazing MA, Mayer B, et al. Neuronal nitric-oxide synthase interaction with calmodulin-troponin C chimeras. *J Biol Chem* 1998; 273:5451-4.
107. Matsuoka A, Stuehr DJ, Olson JS, Clark P, Ikeda-Saito M. L-arginine and calmodulin regulation of the heme iron reactivity in neuronal nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 269:20335-9.
108. Salerno JC, Harris DE, Irizarry K, Patel B, Morales AJ, Smith SM, et al. An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1997; 272:29769-77.
109. Daff S, Sagami I, Shimizu T. The 42-amino acid insert in the FMN domain of neuronal nitric-oxide synthase exerts control over Ca(2+)/calmodulin-dependent electron transfer. *J Biol Chem* 1999; 274:30589-95.
110. Nishida CR, Ortiz de Montellano PR. Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase. Identification of an electron transfer control element. *J Biol Chem* 1999; 274:14692-8.

111. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284:R1-12.
112. Luckhoff A. Release of prostacyclin and EDRF from endothelial cells is differentially controlled by extra- and intracellular calcium. *Eicosanoids* 1988; 1:5-11.
113. Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res* 1996; 78:750-8.
114. Schmidt PP, Lange R, Gorren AC, Werner ER, Mayer B, Andersson KK. Formation of a protonated trihydrobiopterin radical cation in the first reaction cycle of neuronal and endothelial nitric oxide synthase detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Biol Inorg Chem* 2001; 6:151-8.
115. Hurshman AR, Krebs C, Edmondson DE, Huynh BH, Marletta MA. Formation of a pterin radical in the reaction of the heme domain of inducible nitric oxide synthase with oxygen. *Biochemistry* 1999; 38:15689-96.
116. Vasquez-Vivar J, Martasek P, Whitsett J, Joseph J, Kalyanaraman B. The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study. *Biochem J* 2002; 362:733-9.
117. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic Res* 2003; 37:121-7.
118. Stroes E, Hijmering M, van Zandvoort M, Wever R, Rabelink TJ, van Faassen EE. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 1998; 438:161-4.
119. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:9220-5.
120. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002; 105:1656-62.

121. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003; 111:1201-9.
122. Maier W, Cosentino F, Lutolf RB, Fleisch M, Seiler C, Hess OM, et al. Tetrahydrobiopterin improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35:173-8.
123. Heitzer T, Yla-Herttuala S, Luoma J, Kurz S, Munzel T, Just H, et al. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL. *Circulation* 1996; 93:1346-53.
124. Munzel T, Li H, Mollnau H, Hink U, Matheis E, Hartmann M, et al. Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ Res* 2000; 86:E7-E12.
125. Chen PF, Tsai AL, Wu KK. Cysteine 99 of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) is critical for tetrahydrobiopterin-dependent NOS-III stability and activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215:1119-29.
126. Raman CS, Li H, Martasek P, Kral V, Masters BS, Poulos TL. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* 1998; 95:939-50.
127. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 1996; 271:22810-4.
128. Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:6448-53.
129. Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 1997; 272:18522-5.
130. Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* 1997; 272:15583-6.
131. Feron O, Dessy C, Opel DJ, Arstall MA, Kelly RA, Michel T. Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate. *J Biol Chem* 1998; 273:30249-54.



132. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, et al. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 1998; 392:821-4.
133. Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, et al. Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res* 2002; 90:866-73.
134. Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ, Sessa WC. Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem* 2000; 275:22268-72.
135. Song Y, Zweier JL, Xia Y. Heat-shock protein 90 augments neuronal nitric oxide synthase activity by enhancing Ca<sup>2+</sup>/calmodulin binding. *Biochem J* 2001; 355:357-60.
136. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34:879-86.
137. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999; 43:562-71.
138. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide* 2001; 5:88-97.
139. Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. *Circ Res* 2002; 90:21-8.
140. Munzel T, Daiber A, Mulsch A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res* 2005; 97:618-28.
141. Fung HL. Biochemical mechanism of nitroglycerin action and tolerance: is this old mystery solved? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44:67-85.
142. Mayer B, Beretta M. The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate tolerance: news, views and troubles. *Br J Pharmacol* 2008; 155:170-84.
143. Miller MR, Megson IL. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol* 2007; 151:305-21.

144. Van Bortel LM, Spek JJ, Balkestein EJ, Sardina M, Struijker Boudier HA. Is it possible to develop drugs that act more selectively on large arteries? *J Hypertens* 1999; 17:701-5.
145. Herman AG, Moncada S. Therapeutic potential of nitric oxide donors in the prevention and treatment of atherosclerosis. *Eur Heart J* 2005; 26:1945-55.
146. Selemidis S. Suppressing NADPH oxidase-dependent oxidative stress in the vasculature with nitric oxide donors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35:1395-401.
147. Calderone V, Rapposelli S, Martelli A, Digiacomo M, Testai L, Torri S, et al. NO-glibenclamide derivatives: prototypes of a new class of nitric oxide-releasing anti-diabetic drugs. *Bioorg Med Chem* 2009; 17:5426-32.
148. Stokes GS, Bune AJ, Huon N, Barin ES. Long-term effectiveness of extended-release nitrate for the treatment of systolic hypertension. *Hypertension* 2005; 45:380-4.
149. Kass DA, Takimoto E, Nagayama T, Champion HC. Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. *Cardiovasc Res* 2007; 75:303-14.
150. Sonnenburg WK, Seger D, Kwak KS, Huang J, Charbonneau H, Beavo JA. Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem* 1995; 270:30989-1000.
151. Hagiwara M, Endo T, Hidaka H. Effects of vinpocetine on cyclic nucleotide metabolism in vascular smooth muscle. *Biochem Pharmacol* 1984; 33:453-7.
152. Kim D, Rybalkin SD, Pi X, Wang Y, Zhang C, Munzel T, et al. Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance. *Circulation* 2001; 104:2338-43.
153. Nagel DJ, Aizawa T, Jeon KI, Liu W, Mohan A, Wei H, et al. Role of nuclear Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated phosphodiesterase 1A in vascular smooth muscle cell growth and survival. *Circ Res* 2006; 98:777-84.
154. Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* 2003; 93:280-91.
155. MacPherson JD, Gillespie TD, Dunkerley HA, Maurice DH, Bennett BM. Inhibition of phosphodiesterase 5 selectively reverses nitrate tolerance in the venous circulation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 317:188-95.

156. Lin CS, Lin G, Xin ZC, Lue TF. Expression, distribution and regulation of phosphodiesterase 5. *Curr Pharm Des* 2006; 12:3439-57.
157. Shukla N, Jones R, Persad R, Angelini GD, Jeremy JY. Effect of sildenafil citrate and a nitric oxide donating sildenafil derivative, NCX 911, on cavernosal relaxation and superoxide formation in hypercholesterolaemic rabbits. *Eur J Pharmacol* 2005; 517:224-31.
158. Weimann J, Ullrich R, Hromi J, Fujino Y, Clark MW, Bloch KD, et al. Sildenafil is a pulmonary vasodilator in awake lambs with acute pulmonary hypertension. *Anesthesiology* 2000; 92:1702-12.
159. Bivalacqua TJ, Usta MF, Champion HC, Leungwattanakij S, Dabisch PA, McNamara DB, et al. Effect of combination endothelial nitric oxide synthase gene therapy and sildenafil on erectile function in diabetic rats. *Int J Impot Res* 2004; 16:21-9.
160. Turko IV, Francis SH, Corbin JD. Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation. *Biochem J* 1998; 329 ( Pt 3):505-10.
161. Thomas MK, Francis SH, Corbin JD. Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP. *J Biol Chem* 1990; 265:14971-8.
162. Corbin JD, Turko IV, Beasley A, Francis SH. Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur J Biochem* 2000; 267:2760-7.
163. Mullershausen F, Russwurm M, Thompson WJ, Liu L, Koesling D, Friebe A. Rapid nitric oxide-induced desensitization of the cGMP response is caused by increased activity of phosphodiesterase type 5 paralleled by phosphorylation of the enzyme. *J Cell Biol* 2001; 155:271-8.
164. Gopal VK, Francis SH, Corbin JD. Allosteric sites of phosphodiesterase-5 (PDE5). A potential role in negative feedback regulation of cGMP signaling in corpus cavernosum. *Eur J Biochem* 2001; 268:3304-12.
165. Kotera J, Francis SH, Grimes KA, Rouse A, Blount MA, Corbin JD. Allosteric sites of phosphodiesterase-5 sequester cyclic GMP. *Front Biosci* 2004; 9:378-86.
166. Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:755-68.

167. Li Y, Zhang D, Jin W, Shao C, Yan P, Xu C, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism contributes to the variation in efficacy of sublingual nitroglycerin. *J Clin Invest* 2006; 116:506-11.
168. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:61-74.
169. Schiffrin EL. Vascular protection with newer antihypertensive agents. *J Hypertens Suppl* 1998; 16:S25-9.
170. Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction and inhibition of converting enzyme. *Eur Heart J* 1998; 19 Suppl J:J7-15.
171. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97:1916-23.
172. Wassmann S, Hilgers S, Laufs U, Bohm M, Nickenig G. Angiotensin II type 1 receptor antagonism improves hypercholesterolemia-associated endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1208-12.
173. Schulz E, Anter E, Keaney JF, Jr. Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. *Curr Med Chem* 2004; 11:1093-104.
174. Laufs U, Fata VL, Liao JK. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1997; 272:31725-9.
175. Sowers JR. Effects of statins on the vasculature: Implications for aggressive lipid management in the cardiovascular metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 2003; 91:14B-22B.
176. Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. *JAMA* 1998; 279:1643-50.
177. John S, Schlaich M, Langenfeld M, Weihprecht H, Schmitz G, Weidinger G, et al. Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Circulation* 1998; 98:211-6.

178. Wassmann S, Laufs U, Muller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, et al. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:300-5.
179. Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, Just I, Hecker M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:61-9.
180. Dhein S, Salameh A, Berkels R, Klaus W. Dual mode of action of dihydropyridine calcium antagonists: a role for nitric oxide. *Drugs* 1999; 58:397-404.
181. Yang J, Fukuo K, Morimoto S, Niinobu T, Suhara T, Ogihara T. Pranidipine enhances the action of nitric oxide released from endothelial cells. *Hypertension* 2000; 35:82-5.
182. Ding Y, Vaziri ND. Nifedipine and diltiazem but not verapamil up-regulate endothelial nitric-oxide synthase expression. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292:606-9.
183. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 2009; 73:411-8.
184. Maffei A, Lembo G. Nitric oxide mechanisms of nebivolol. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2009; 3:317-27.
185. Lombardo RM, Reina C, Abrignani MG, Rizzo PA, Braschi A, De Castro S. Effects of nebivolol versus carvedilol on left ventricular function in patients with chronic heart failure and reduced left ventricular systolic function. *Am J Cardiovasc Drugs* 2006; 6:259-63.
186. Tzemos N, Lim PO, MacDonald TM. Nebivolol reverses endothelial dysfunction in essential hypertension: a randomized, double-blind, crossover study. *Circulation* 2001; 104:511-4.
187. de Groot AA, Mathy MJ, van Zwieten PA, Peters SL. Involvement of the beta3 adrenoceptor in nebivolol-induced vasorelaxation in the rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 42:232-6.
188. Mollnau H, Schulz E, Daiber A, Baldus S, Oelze M, August M, et al. Nebivolol prevents vascular NOS III uncoupling in experimental hyperlipidemia and inhibits NADPH oxidase activity in inflammatory cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:615-21.
189. Garbin U, Pasini AF, Stranieri C, Manfro S, Boccioletti V, Cominacini L. Nebivolol reduces asymmetric dimethylarginine in endothelial cells by increasing

- dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 (DDAH2) expression and activity. *Pharmacol Res* 2007; 56:515-21.
190. de Groot AA, Mathy MJ, van Zwieten PA, Peters SL. Antioxidant activity of nebivolol in the rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43:148-53.
191. Hibbs JB, Jr., Vavrin Z, Taintor RR. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 1987; 138:550-65.
192. Babu BR, Griffith OW. Design of isoform-selective inhibitors of nitric oxide synthase. *Curr Opin Chem Biol* 1998; 2:491-500.
193. Kerwin JF, Jr., Lancaster JR, Jr., Feldman PL. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 1995; 38:4343-62.
194. Kerwin JF, Jr., Heller M. The arginine-nitric oxide pathway: a target for new drugs. *Med Res Rev* 1994; 14:23-74.
195. Moore WM, Webber RK, Jerome GM, Tjoeng FS, Misko TP, Currie MG. L-N6-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem* 1994; 37:3886-8.
196. Bryk R, Wolff DJ. Mechanism of inducible nitric oxide synthase inactivation by aminoguanidine and L-N6-(1-iminoethyl)lysine. *Biochemistry* 1998; 37:4844-52.
197. Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, Kiff RJ, Laszlo F, Whittle BJ, et al. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1997; 272:4959-63.
198. Wolff DJ, Gribin BJ. The inhibition of the constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms by indazole agents. *Arch Biochem Biophys* 1994; 311:300-6.
199. Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55:1078-87.
200. Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* 1988; 95:1165-74.
201. Feletou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)* 2009; 117:139-55.
202. Campbell WB, Falck JR. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension* 2007; 49:590-6.

203. Halcox JP, Narayanan S, Cramer-Joyce L, Mincemoyer R, Quyyumi AA. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human forearm microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H2470-7.
204. Nelli S, Wilson WS, Laidlaw H, Llano A, Middleton S, Price AG, et al. Evaluation of potassium ion as the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in the bovine coronary artery. *Br J Pharmacol* 2003; 139:982-8.
205. Beny JL, Schaad O. An evaluation of potassium ions as endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 2000; 131:965-73.
206. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 1998; 396:269-72.
207. Krotz F, Riexinger T, Buerkle MA, Nithipatikom K, Gloe T, Sohn HY, et al. Membrane-potential-dependent inhibition of platelet adhesion to endothelial cells by epoxyeicosatrienoic acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:595-600.
208. Munzenmaier DH, Harder DR. Cerebral microvascular endothelial cell tube formation: role of astrocytic epoxyeicosatrienoic acid release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278:H1163-7.
209. Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, et al. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science* 1999; 285:1276-9.
210. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995; 268:C799-822.
211. Prior HM, Webster N, Quinn K, Beech DJ, Yates MS. K(+)-induced dilation of a small renal artery: no role for inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Cardiovasc Res* 1998; 37:780-90.
212. Gross PL, Weitz JI. New antithrombotic drugs. *Clin Pharmacol Ther* 2009; 86:139-46.
213. Prasad VS, Palaniswamy C, Frishman WH. Endothelin as a clinical target in the treatment of systemic hypertension. *Cardiol Rev* 2009; 17:181-91.
214. Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 2005; 43:19-29.
215. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:2863-7.

216. Shimada K, Matsushita Y, Wakabayashi K, Takahashi M, Matsubara A, Iijima Y, et al. Cloning and functional expression of human endothelin-converting enzyme cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 207:807-12.
217. Webb DJ, Strachan FE. Clinical experience with endothelin antagonists. *Am J Hypertens* 1998; 11:71S-79S.
218. Saida K, Kometani N, Masuda H, Oka S, Uchide T. Structure of mouse preproendothelin-3 and phylogenetic analysis of the endothelins. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36:S1-4.
219. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:851-76.
220. Tamirisa P, Frishman WH, Kumar A. Endothelin and endothelin antagonism: roles in cardiovascular health and disease. *Am Heart J* 1995; 130:601-10.
221. Schiffrin EL, *Endothelin*, in *Hypertension Primer: The Essentials of High Blood Pressure*, J. Izzo, A. Sica, and H. Black, Editor. 2008, Lippincott Williams & Wilkins: Dallas.
222. Gray GA, Webb DJ. The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 1996; 72:109-48.
223. Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990; 85:587-90.
224. Malek A, Izumo S. Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol* 1992; 263:C389-96.
225. Prins BA, Hu RM, Nazario B, Pedram A, Frank HJ, Weber MA, et al. Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269:11938-44.
226. Nakashima M, Vanhoutte PM. Endothelin-1 and -3 cause endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery. *Am J Physiol* 1993; 265:H2137-41.
227. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323:27-36.
228. Luscher TF. Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. A new concept in hypertension? *Am J Hypertens* 1990; 3:317-30.



229. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
230. Selemidis S, Sobey CG, Winkler K, Schmidt HH, Drummond GR. NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacol Ther* 2008; 120:254-91.
231. Serrander L, Cartier L, Bedard K, Banfi B, Lardy B, Plastre O, et al. NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem J* 2007; 406:105-14.
232. Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 2006; 18:69-82.
233. Wendt MC, Daiber A, Kleschyov AL, Mulsch A, Sydow K, Schulz E, et al. Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4. *Free Radic Biol Med* 2005; 39:381-91.
234. Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, et al. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 2002; 90:E58-65.
235. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Generation of superoxide from nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 2000; 481:305-6.
236. De Mey JG, Vanhoutte PM. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ Res* 1982; 51:439-47.
237. Tang EH, Vanhoutte PM. Prostanoids and reactive oxygen species: team players in endothelium-dependent contractions. *Pharmacol Ther* 2009; 122:140-9.
238. Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol* 2005; 144:449-58.
239. Miller VM, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. *Am J Physiol* 1985; 248:H432-7.
240. Wise H, Jones RL. Focus on prostacyclin and its novel mimetics. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17:17-21.
241. Gomez E, Schwendemann C, Roger S, Simonet S, Paysant J, Courchay C, et al. Aging and prostacyclin responses in aorta and platelets from WKY and SHR rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295:H2198-211.

242. Gluais P, Lonchamp M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Feletou M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol* 2005; 146:834-45.
243. Rapoport RM, Williams SP. Role of prostaglandins in acetylcholine-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension* 1996; 28:64-75.
244. Tesfamariam B, Jakubowski JA, Cohen RA. Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived PGH<sub>2</sub>-TxA<sub>2</sub>. *Am J Physiol* 1989; 257:H1327-33.
245. Zhou Y, Varadharaj S, Zhao X, Parinandi N, Flavahan NA, Zweier JL. Acetylcholine causes endothelium-dependent contraction of mouse arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289:H1027-32.
246. Okon EB, Golbabaie A, van Breemen C. In the presence of L-NAME SERCA blockade induces endothelium-dependent contraction of mouse aorta through activation of smooth muscle prostaglandin H<sub>2</sub>/thromboxane A<sub>2</sub> receptors. *Br J Pharmacol* 2002; 137:545-53.
247. Huang JS, Ramamurthy SK, Lin X, Le Breton GC. Cell signalling through thromboxane A<sub>2</sub> receptors. *Cell Signal* 2004; 16:521-33.
248. Miyagawa K, Ohashi M, Yamashita S, Kojima M, Sato K, Ueda R, et al. Increased oxidative stress impairs endothelial modulation of contractions in arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2007; 25:415-21.
249. Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension* 1994; 23:229-35.
250. Hibino M, Okumura K, Iwama Y, Mokuno S, Osanai H, Matsui H, et al. Oxygen-derived free radical-induced vasoconstriction by thromboxane A<sub>2</sub> in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33:605-10.
251. Katusic ZS, Schugel J, Cosentino F, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to oxygen-derived free radicals in the canine basilar artery. *Am J Physiol* 1993; 264:H859-64.
252. Katusic ZS, Vanhoutte PM. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol* 1989; 257:H33-7.
253. Yang ZW, Zheng T, Zhang A, Altura BT, Altura BM. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced contraction of rat aorta. *Eur J Pharmacol* 1998; 344:169-81.

254. Rodriguez-Martinez MA, Garcia-Cohen EC, Baena AB, Gonzalez R, Salaices M, Marin J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol* 1998; 125:1329-35.
255. Hamilton PK, Lockhart CJ, Quinn CE, McVeigh GE. Arterial stiffness: clinical relevance, measurement and treatment. *Clin Sci (Lond)* 2007; 113:157-70.
256. Dart AM, Kingwell BA. Pulse pressure--a review of mechanisms and clinical relevance. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:975-84.
257. Greenwald SE. Pulse pressure and arterial elasticity. *QJM* 2002; 95:107-12.
258. Greenwald SE. Ageing of the conduit arteries. *J Pathol* 2007; 211:157-72.
259. Ziemann SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:932-43.
260. Boutouyrie P, Bezie Y, Lacolley P, Challande P, Chamiot-Clerc P, Benetos A, et al. In vivo/in vitro comparison of rat abdominal aorta wall viscosity. Influence of endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1346-55.
261. Wilkinson IB, Qasem A, McEniery CM, Webb DJ, Avolio AP, Cockcroft JR. Nitric oxide regulates local arterial distensibility in vivo. *Circulation* 2002; 105:213-7.
262. Fitch RM, Vergona R, Sullivan ME, Wang YX. Nitric oxide synthase inhibition increases aortic stiffness measured by pulse wave velocity in rats. *Cardiovasc Res* 2001; 51:351-8.
263. McVeigh GE, Allen PB, Morgan DR, Hanratty CG, Silke B. Nitric oxide modulation of blood vessel tone identified by arterial waveform analysis. *Clin Sci (Lond)* 2001; 100:387-93.
264. Wilkinson IB, MacCallum H, Cockcroft JR, Webb DJ. Inhibition of basal nitric oxide synthesis increases aortic augmentation index and pulse wave velocity in vivo. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 53:189-92.
265. Cockcroft JR. Exploring vascular benefits of endothelium-derived nitric oxide. *Am J Hypertens* 2005; 18:177S-183S.
266. Dhakam Z, Yasmin, McEniery CM, Burton T, Brown MJ, Wilkinson IB. A comparison of atenolol and nebivolol in isolated systolic hypertension. *J Hypertens* 2008; 26:351-6.

267. Mahmud A, Feely J. Beta-blockers reduce aortic stiffness in hypertension but nebivolol, not atenolol, reduces wave reflection. *Am J Hypertens* 2008; 21:663-7.
268. Kals J, Kampus P, Kals M, Pulges A, Teesalu R, Zilmer M. Effects of stimulation of nitric oxide synthesis on large artery stiffness in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 2006; 185:368-74.
269. McEniery CM, Qasem A, Schmitt M, Avolio AP, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Endothelin-1 regulates arterial pulse wave velocity in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:1975-81.
270. Heintz B, Dorr R, Gillessen T, Walkenhorst F, Krebs W, Hanrath P, et al. Do arterial endothelin 1 levels affect local arterial stiffness? *Am Heart J* 1993; 126:987-9.
271. Dhaun N, Goddard J, Webb DJ. The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:943-55.
272. Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, et al. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267:16066-8.
273. Long DA, Newaz MA, Prabhakar SS, Price KL, Truong LD, Feng L, et al. Loss of nitric oxide and endothelial-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in aging. *Kidney Int* 2005; 68:2154-63.
274. Nakayama T, Masubuchi Y, Kawauchi K, Masaki R, Hironaga T, Ishima H, et al. Beneficial effect of beraprost sodium plus telmisartan in the prevention of arterial stiffness development in elderly patients with hypertension and cerebral infarction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007; 76:309-14.
275. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 2006; 27:2588-605.
276. Laurent S, Boutouyrie P. Arterial stiffness: a new surrogate end point for cardiovascular disease? *J Nephrol* 2007; 20 Suppl 12:S45-50.
277. Blacher J, Asmar R, Djane S, London GM, Safar ME. Aortic pulse wave velocity as a marker of cardiovascular risk in hypertensive patients. *Hypertension* 1999; 33:1111-7.
278. Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, Guize L, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* 2001; 37:1236-41.

279. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2007; 25:1105-87.
280. Laurent S. Aortic, carotid and femoral stiffness: how do they relate? Towards reference values. *J Hypertens* 2008; 26:1305-6.
281. Asmar R, Benetos A, Topouchian J, Laurent P, Pannier B, Brisac AM, et al. Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies. *Hypertension* 1995; 26:485-90.
282. Izzo JL, Jr. Arterial stiffness and the systolic hypertension syndrome. *Curr Opin Cardiol* 2004; 19:341-52.
283. O'Rourke MF, Mancia G. Arterial stiffness. *J Hypertens* 1999; 17:1-4.
284. 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *J Hypertens* 1999; 17:151-83.
285. Plante G, *Les objectifs du traitement de l'hypertension artérielle*, in *Hypertension: Guide thérapeutique*, S.q.d.h. artérielle, Editor. 2007, Montréal.
286. Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* 2000; 101:329-35.
287. Sever PS, Poulter NR. A hypothesis for the pathogenesis of essential hypertension: the initiating factors. *J Hypertens Suppl* 1989; 7:S9-12.
288. Staessen JA, Wang J, Bianchi G, Birkenhager WH. Essential hypertension. *Lancet* 2003; 361:1629-41.
289. Staessen J, Amery A, Fagard R. Isolated systolic hypertension in the elderly. *J Hypertens* 1990; 8:393-405.
290. Franklin SS, Larson MG, Khan SA, Wong ND, Leip EP, Kannel WB, et al. Does the relation of blood pressure to coronary heart disease risk change with aging? The Framingham Heart Study. *Circulation* 2001; 103:1245-9.
291. Stamler J, Stamler R, Neaton JD. Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks. US population data. *Arch Intern Med* 1993; 153:598-615.

292. Wong J, Wong S. Evidence-based care for the elderly with isolated systolic hypertension. *Nurs Health Sci* 2005; 7:67-75.
293. Beevers DG. Epidemiological, pathophysiological and clinical significance of systolic, diastolic and pulse pressure. *J Hum Hypertens* 2004; 18:531-3.
294. Wilking SV, Belanger A, Kannel WB, D'Agostino RB, Steel K. Determinants of isolated systolic hypertension. *JAMA* 1988; 260:3451-5.
295. Franklin SS. Hypertension in older people: part 1. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2006; 8:444-9.
296. Fagard RH, Van den Enden M. Treatment and blood pressure control in isolated systolic hypertension vs diastolic hypertension in primary care. *J Hum Hypertens* 2003; 17:681-7.
297. Van Bortel LM, Struijker-Boudier HA, Safar ME. Pulse pressure, arterial stiffness, and drug treatment of hypertension. *Hypertension* 2001; 38:914-21.
298. Somes GW, Pahor M, Shorr RI, Cushman WC, Applegate WB. The role of diastolic blood pressure when treating isolated systolic hypertension. *Arch Intern Med* 1999; 159:2004-9.
299. Vaccarino V, Berger AK, Abramson J, Black HR, Setaro JF, Davey JA, et al. Pulse pressure and risk of cardiovascular events in the systolic hypertension in the elderly program. *Am J Cardiol* 2001; 88:980-6.
300. Lakatta EG. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation* 2003; 107:490-7.
301. Lakatta EG. Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. *Physiol Rev* 1993; 73:413-67.
302. Jacob MP. [Extracellular matrix and vascular ageing]. *Med Sci (Paris)* 2006; 22:273-8.
303. van der Heijden-Spek JJ, Staessen JA, Fagard RH, Hoeks AP, Boudier HA, van Bortel LM. Effect of age on brachial artery wall properties differs from the aorta and is gender dependent: a population study. *Hypertension* 2000; 35:637-42.
304. Kimoto E, Shoji T, Shinohara K, Inaba M, Okuno Y, Miki T, et al. Preferential stiffening of central over peripheral arteries in type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52:448-52.

305. Milewicz DM, Urban Z, Boyd C. Genetic disorders of the elastic fiber system. *Matrix Biol* 2000; 19:471-80.
306. Johnson CP, Baugh R, Wilson CA, Burns J. Age related changes in the tunica media of the vertebral artery: implications for the assessment of vessels injured by trauma. *J Clin Pathol* 2001; 54:139-45.
307. O'Rourke MF. Pulsatile arterial haemodynamics in hypertension. *Aust N Z J Med* 1976; 6 suppl 2:40-8.
308. Avolio A, Jones D, Tafazzoli-Shadpour M. Quantification of alterations in structure and function of elastin in the arterial media. *Hypertension* 1998; 32:170-5.
309. Powell JT, Vine N, Crossman M. On the accumulation of D-aspartate in elastin and other proteins of the ageing aorta. *Atherosclerosis* 1992; 97:201-8.
310. Lefevre M, Rucker RB. Aorta elastin turnover in normal and hypercholesterolemic Japanese quail. *Biochim Biophys Acta* 1980; 630:519-29.
311. Gaillard V, Casellas D, Seguin-Devauz C, Schohn H, Dauca M, Atkinson J, et al. Pioglitazone improves aortic wall elasticity in a rat model of elastocalcinotic arteriosclerosis. *Hypertension* 2005; 46:372-9.
312. Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, Moreau P. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am J Hypertens* 2003; 16:103-10.
313. Bouvet C, Moreau S, Blanchette J, de Blois D, Moreau P. Sequential activation of matrix metalloproteinase 9 and transforming growth factor beta in arterial elastocalcinosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:856-62.
314. Yasmin, McEniery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Maki-Petaja K, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:372.
315. Yasmin, McEniery CM, O'Shaughnessy KM, Harnett P, Arshad A, Wallace S, et al. Variation in the human matrix metalloproteinase-9 gene is associated with arterial stiffness in healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:1799-805.
316. McNulty M, Spiers P, McGovern E, Feely J. Aging is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity in the human aorta. *Am J Hypertens* 2005; 18:504-9.

317. Li Z, Froehlich J, Galis ZS, Lakatta EG. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertension* 1999; 33:116-23.
318. Medley TL, Kingwell BA, Gatzka CD, Pillay P, Cole TJ. Matrix metalloproteinase-3 genotype contributes to age-related aortic stiffening through modulation of gene and protein expression. *Circ Res* 2003; 92:1254-61.
319. Gnasso A, Motti C, Irace C, Carallo C, Liberatoscioli L, Bernardini S, et al. Genetic variation in human stromelysin gene promoter and common carotid geometry in healthy male subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1600-5.
320. Medley TL, Cole TJ, Dart AM, Gatzka CD, Kingwell BA. Matrix metalloproteinase-9 genotype influences large artery stiffness through effects on aortic gene and protein expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1479-84.
321. Watanabe M, Sawai T, Nagura H, Suyama K. Age-related alteration of cross-linking amino acids of elastin in human aorta. *Tohoku J Exp Med* 1996; 180:115-30.
322. Klotz O. Studies Upon Calcareous Degeneration: I. The Process of Pathological Calcification. *J Exp Med* 1905; 7:633-674.
323. Blumenthal H, Lansing A, Wheeler P. Calcification of the media of the human aorta and its relation to intimal arteriosclerosis, ageing and disease. *Am J Pathol* 1944; 20:665-679.
324. Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286:E686-96.
325. Atkinson J. [Aging of arterial extracellular matrix elastin: etiology and consequences]. *Pathol Biol (Paris)* 1998; 46:555-9.
326. Bailey M, Pillarisetti S, Jones P, Xiao H, Simionescu D, Vyavahare N. Involvement of matrix metalloproteinases and tenascin-C in elastin calcification. *Cardiovasc Pathol* 2004; 13:146-55.
327. Seligman M, Eilberg RF, Fishman L. Mineralization of elastin extracted from human aortic tissues. *Calcif Tissue Res* 1975; 17:229-34.
328. Keeley FW, Partridge SM. Amino acid composition and calcification of human aortic elastin. *Atherosclerosis* 1974; 19:287-96.



329. Vyavahare N, Jones PL, Tallapragada S, Levy RJ. Inhibition of matrix metalloproteinase activity attenuates tenascin-C production and calcification of implanted purified elastin in rats. *Am J Pathol* 2000; 157:885-93.
330. Vyavahare N, Ogle M, Schoen FJ, Levy RJ. Elastin calcification and its prevention with aluminum chloride pretreatment. *Am J Pathol* 1999; 155:973-82.
331. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, Baxter BT, Starcher BC, Vyavahare NR. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation* 2004; 110:3480-7.
332. Qin X, Corriere MA, Matrisian LM, Guzman RJ. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:1510-6.
333. Niederhoffer N, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Duvivier C, Peslin R, Atkinson J. Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity. *Hypertension* 1997; 29:999-1006.
334. Atkinson J, Poitevin P, Chillon JM, Lartaud I, Levy B. Vascular Ca overload produced by vitamin D3 plus nicotine diminishes arterial distensibility in rats. *Am J Physiol* 1994; 266:H540-7.
335. Dao HH, Essalihi R, Bouvet C, Moreau P. Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc Res* 2005; 66:307-17.
336. Toussaint ND, Lau KK, Strauss BJ, Polkinghorne KR, Kerr PG. Associations between vascular calcification, arterial stiffness and bone mineral density in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23:586-93.
337. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:1731-40.
338. Raggi P, Bellasi A, Ferramosca E, Islam T, Muntner P, Block GA. Association of pulse wave velocity with vascular and valvular calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2007; 71:802-7.
339. Guerin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F. Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15:1014-21.

340. McEniery CM, McDonnell BJ, So A, Aitken S, Bolton CE, Munnery M, et al. Aortic calcification is associated with aortic stiffness and isolated systolic hypertension in healthy individuals. *Hypertension* 2009; 53:524-31.
341. Nagai Y, Metter EJ, Earley CJ, Kemper MK, Becker LC, Lakatta EG, et al. Increased carotid artery intimal-medial thickness in asymptomatic older subjects with exercise-induced myocardial ischemia. *Circulation* 1998; 98:1504-9.
342. Michel JB, Heudes D, Michel O, Poitevin P, Philippe M, Scalbert E, et al. Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes. II. Large arteries. *Am J Physiol* 1994; 267:R124-35.
343. Izzo JL, Jr., Mitchell GF. Aging and arterial structure-function relations. *Adv Cardiol* 2007; 44:19-34.
344. Dobrin PB. Mechanical properties of arteries. *Physiol Rev* 1978; 58:397-460.
345. Reiser K, McCormick RJ, Rucker RB. Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *FASEB J* 1992; 6:2439-49.
346. Bailey AJ. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech Ageing Dev* 2001; 122:735-55.
347. Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, Bank RA, Shaw JN, Lyons TJ, et al. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem* 2000; 275:39027-31.
348. Ghosh J, Murphy MO, Turner N, Khwaja N, Halka A, Kielty CM, et al. The role of transforming growth factor beta1 in the vascular system. *Cardiovasc Pathol* 2005; 14:28-36.
349. Singh NN, Ramji DP. The role of transforming growth factor-beta in atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17:487-99.
350. Challoh M, Nadaud S, Philippe M, Battle T, Soubrier F, Corman B, et al. Circulating and cellular markers of endothelial dysfunction with aging in rats. *Am J Physiol* 1997; 273:H1941-8.
351. Bonithon-Kopp C, Ducimetiere P, Touboul PJ, Feve JM, Billaud E, Courbon D, et al. Plasma angiotensin-converting enzyme activity and carotid wall thickening. *Circulation* 1994; 89:952-4.

352. Mattace-Raso FU, van der Cammen TJ, Sayed-Tabatabaei FA, van Popele NM, Asmar R, Schalekamp MA, et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and common carotid stiffness. The Rotterdam study. *Atherosclerosis* 2004; 174:121-6.
353. Benetos A, Gautier S, Ricard S, Topouchian J, Asmar R, Poirier O, et al. Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation* 1996; 94:698-703.
354. Matsushita H, Chang E, Glassford AJ, Cooke JP, Chiu CP, Tsao PS. eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: Preservation by hTERT immortalization. *Circ Res* 2001; 89:793-8.
355. Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, et al. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. *Circulation* 1993; 88:77-81.
356. Lyons D, Roy S, Patel M, Benjamin N, Swift CG. Impaired nitric oxide-mediated vasodilatation and total body nitric oxide production in healthy old age. *Clin Sci (Lond)* 1997; 93:519-25.
357. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Fasolo CB, et al. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation* 1995; 91:1981-7.
358. Busse R, Fleming I. Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24:24-9.
359. Najjar SS, Scuteri A, Lakatta EG. Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension* 2005; 46:454-62.
360. Barton M, Lattmann T, d'Uscio LV, Luscher TF, Shaw S. Inverse regulation of endothelin-1 and nitric oxide metabolites in tissue with aging: implications for the age-dependent increase of cardiorenal disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36:S153-6.
361. Stewart KG, Zhang Y, Davidge ST. Aging increases PGHS-2-dependent vasoconstriction in rat mesenteric arteries. *Hypertension* 2000; 35:1242-7.
362. Heymes C, Habib A, Yang D, Mathieu E, Marotte F, Samuel J, et al. Cyclo-oxygenase-1 and -2 contribution to endothelial dysfunction in ageing. *Br J Pharmacol* 2000; 131:804-10.

363. Kanie N, Kamata K. Effects of chronic administration of the novel endothelin antagonist J-104132 on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rat. *Br J Pharmacol* 2002; 135:1935-42.
364. Goto K, Fujii K, Onaka U, Abe I, Fujishima M. Angiotensin-converting enzyme inhibitor prevents age-related endothelial dysfunction. *Hypertension* 2000; 36:581-7.
365. Kansui Y, Fujii K, Goto K, Abe I, Iida M. Angiotensin II receptor antagonist improves age-related endothelial dysfunction. *J Hypertens* 2002; 20:439-46.
366. Barton M, Cosentino F, Brandes RP, Moreau P, Shaw S, Luscher TF. Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin. *Hypertension* 1997; 30:817-24.
367. Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, et al. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res* 2002; 90:1159-66.
368. Smith AR, Hagen TM. Vascular endothelial dysfunction in aging: loss of Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and partial restoration by (R)-alpha-lipoic acid. *Biochem Soc Trans* 2003; 31:1447-9.
369. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99:1141-6.
370. Clarke S. Protein methylation. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5:977-83.
371. Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001; 37:529-34.
372. Wautier JL, Schmidt AM. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res* 2004; 95:233-8.
373. van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, et al. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med* 2000; 192:1731-44.
374. Goettsch W, Lattmann T, Amann K, Szibor M, Morawietz H, Munter K, et al. Increased expression of endothelin-1 and inducible nitric oxide synthase isoform II in aging arteries in vivo: implications for atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280:908-13.

375. Clozel M. Effects of bosentan on cellular processes involved in pulmonary arterial hypertension: do they explain the long-term benefit? *Ann Med* 2003; 35:605-13.
376. Amiri F, Viridis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, et al. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation* 2004; 110:2233-40.
377. Kamoun WS, Karaa A, Kresge N, Merkel SM, Korneszczyk K, Clemens MG. LPS inhibits endothelin-1-induced endothelial NOS activation in hepatic sinusoidal cells through a negative feedback involving caveolin-1. *Hepatology* 2006; 43:182-90.
378. Karaa A, Kamoun WS, Clemens MG. Oxidative stress disrupts nitric oxide synthase activation in liver endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2005; 39:1320-31.
379. Loomis ED, Sullivan JC, Osmond DA, Pollock DM, Pollock JS. Endothelin mediates superoxide production and vasoconstriction through activation of NADPH oxidase and uncoupled nitric-oxide synthase in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315:1058-64.
380. Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, Shaw S, Munter K, Luscher TF. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:14367-72.
381. Dumont AS, Dumont RJ, McNeill JH, Kassell NF, Sutherland GR, Verma S. Chronic endothelin antagonism restores cerebrovascular function in diabetes. *Neurosurgery* 2003; 52:653-60; discussion 659-60.
382. Bank AJ, Kaiser DR, Rajala S, Cheng A. In vivo human brachial artery elastic mechanics: effects of smooth muscle relaxation. *Circulation* 1999; 100:41-7.
383. Kinlay S, Creager MA, Fukumoto M, Hikita H, Fang JC, Selwyn AP, et al. Endothelium-derived nitric oxide regulates arterial elasticity in human arteries in vivo. *Hypertension* 2001; 38:1049-53.
384. Dupuis M, Soubrier F, Brocheriou I, Raoux S, Haloui M, Louedec L, et al. Profiling of aortic smooth muscle cell gene expression in response to chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Circulation* 2004; 110:867-73.
385. Essalihi R, Dao HH, Gilbert LA, Bouvet C, Semerjian Y, McKee MD, et al. Regression of medial elastocalcinosis in rat aorta: a new vascular function for carbonic anhydrase. *Circulation* 2005; 112:1628-35.

386. Kirsch T. Determinants of pathological mineralization. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18:174-80.
387. Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res* 2005; 96:717-22.
388. Sweatt A, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *J Thromb Haemost* 2003; 1:178-85.
389. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; 386:78-81.
390. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 1999; 100:2168-76.
391. Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 2002; 277:4388-94.
392. Boskey AL, Spevak L, Paschalis E, Doty SB, McKee MD. Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif Tissue Int* 2002; 71:145-54.
393. Essalihi R, Ouellette V, Dao HH, McKee MD, Moreau P. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells during medial arterial calcification: a role for endothelin? *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44 Suppl 1:S147-50.
394. Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res* 1999; 84:166-78.
395. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem* 2000; 275:20197-203.
396. Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, Weissberg PL. Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:379-88.

397. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebbersold R, et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* 2001; 89:1147-54.
398. Demer LL. A skeleton in the atherosclerosis closet. *Circulation* 1995; 92:2029-32.
399. Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:8562-5.
400. Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res* 1995:266-80.
401. Romberg RW, Werness PG, Riggs BL, Mann KG. Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry* 1986; 25:1176-80.
402. O'Rourke MF. Mechanical principles. Arterial stiffness and wave reflection. *Pathol Biol (Paris)* 1999; 47:623-33.
403. Benetos A, Rudnichi A, Safar M, Guize L. Pulse pressure and cardiovascular mortality in normotensive and hypertensive subjects. *Hypertension* 1998; 32:560-4.
404. Franklin SS. Cardiovascular risks related to increased diastolic, systolic and pulse pressure. An epidemiologist's point of view. *Pathol Biol (Paris)* 1999; 47:594-603.
405. Staessen JA, Gasowski J, Wang JG, Thijs L, Den Hond E, Boissel JP, et al. Risks of untreated and treated isolated systolic hypertension in the elderly: meta-analysis of outcome trials. *Lancet* 2000; 355:865-72.
406. Mitchell GF, Moya LA, Braunwald E, Rouleau JL, Bernstein V, Geltman EM, et al. Sphygmomanometrically determined pulse pressure is a powerful independent predictor of recurrent events after myocardial infarction in patients with impaired left ventricular function. SAVE investigators. Survival and Ventricular Enlargement. *Circulation* 1997; 96:4254-60.
407. Haider AW, Larson MG, Franklin SS, Levy D. Systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and pulse pressure as predictors of risk for congestive heart failure in the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 2003; 138:10-6.
408. Katz AM. Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure. *N Engl J Med* 1990; 322:100-10.

409. O'Rourke MF, Hashimoto J. Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:1-13.
410. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation* 2003; 107:139-46.
411. Ferro G, Duilio C, Spinelli L, Liucci GA, Mazza F, Indolfi C. Relation between diastolic perfusion time and coronary artery stenosis during stress-induced myocardial ischemia. *Circulation* 1995; 92:342-7.
412. Hoffman JI, Buckberg GD. The myocardial supply:demand ratio--a critical review. *Am J Cardiol* 1978; 41:327-32.
413. Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 1996; 275:1557-62.
414. O'Rourke MF, Safar ME. Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertension* 2005; 46:200-4.
415. Mitchell GF. Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage. *J Appl Physiol* 2008; 105:1652-60.
416. Fesler P, Safar ME, du Cailar G, Ribstein J, Mimran A. Pulse pressure is an independent determinant of renal function decline during treatment of essential hypertension. *J Hypertens* 2007; 25:1915-20.
417. Verhave JC, Fesler P, du Cailar G, Ribstein J, Safar ME, Mimran A. Elevated pulse pressure is associated with low renal function in elderly patients with isolated systolic hypertension. *Hypertension* 2005; 45:586-91.
418. Yokoyama H, Aoki T, Imahori M, Kuramitsu M. Subclinical atherosclerosis is increased in type 2 diabetic patients with microalbuminuria evaluated by intima-media thickness and pulse wave velocity. *Kidney Int* 2004; 66:448-54.
419. Smith A, Karalliedde J, De Angelis L, Goldsmith D, Viberti G. Aortic pulse wave velocity and albuminuria in patients with type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:1069-75.
420. Ishimura E, Taniwaki H, Tsuchida T, Obatake N, Emoto M, Shoji T, et al. Urinary albumin excretion associated with arterial wall stiffness rather than thickness in type 2 diabetic patients. *J Nephrol* 2007; 20:204-11.



421. Waldstein SR, Rice SC, Thayer JF, Najjar SS, Scuteri A, Zonderman AB. Pulse pressure and pulse wave velocity are related to cognitive decline in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Hypertension* 2008; 51:99-104.
422. Scuteri A, Brancati AM, Gianni W, Assisi A, Volpe M. Arterial stiffness is an independent risk factor for cognitive impairment in the elderly: a pilot study. *J Hypertens* 2005; 23:1211-6.
423. Hanon O, Haulon S, Lenoir H, Seux ML, Rigaud AS, Safar M, et al. Relationship between arterial stiffness and cognitive function in elderly subjects with complaints of memory loss. *Stroke* 2005; 36:2193-7.
424. Laurent S, Katsahian S, Fassot C, Tropeano AI, Gautier I, Laloux B, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke* 2003; 34:1203-6.
425. Franklin SS. Hypertension in older people: part 2. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2006; 8:521-5.
426. Poirier L, Lefebvre J, Lacoursière Y, *Le traitement pharmacologique initial de l'hypertension artérielle non compliquée et de l'hypertension associée à différentes conditions*, in *Hypertension: Guide thérapeutique*, S.q.d.h. artérielle, Editor. 2007, Montréal.
427. Honda T, Hamada M, Shigematsu Y, Matsumoto Y, Matsuoka H, Hiwada K. Effect of antihypertensive therapy on aortic distensibility in patients with essential hypertension: comparison with trichlormethiazide, nicardipine and alacepril. *Cardiovasc Drugs Ther* 1999; 13:339-46.
428. Lacolley P, Safar ME, Lucet B, Ledudal K, Labat C, Benetos A. Prevention of aortic and cardiac fibrosis by spironolactone in old normotensive rats. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:662-7.
429. Savoia C, Touyz RM, Amiri F, Schiffrin EL. Selective mineralocorticoid receptor blocker eplerenone reduces resistance artery stiffness in hypertensive patients. *Hypertension* 2008; 51:432-9.
430. Safar ME, Benetos A. Factors influencing arterial stiffness in systolic hypertension in the elderly: role of sodium and the renin-angiotensin system. *Am J Hypertens* 2003; 16:249-58.

431. Labat C, Lacolley P, Lajemi M, de Gasparo M, Safar ME, Benetos A. Effects of valsartan on mechanical properties of the carotid artery in spontaneously hypertensive rats under high-salt diet. *Hypertension* 2001; 38:439-43.
432. Cockcroft JR. ACE inhibition in hypertension: focus on perindopril. *Am J Cardiovasc Drugs* 2007; 7:303-17.
433. Boffa JJ, Lu Y, Placier S, Stefanski A, Dussaule JC, Chatziantoniou C. Regression of renal vascular and glomerular fibrosis: role of angiotensin II receptor antagonism and matrix metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:1132-44.
434. Shargorodsky M, Leibovitz E, Lubimov L, Gavish D, Zimlichman R. Prolonged treatment with the AT1 receptor blocker, valsartan, increases small and large artery compliance in uncomplicated essential hypertension. *Am J Hypertens* 2002; 15:1087-91.
435. Dao HH, Essalihi R, Graillon JF, Lariviere R, De Champlain J, Moreau P. Pharmacological prevention and regression of arterial remodeling in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens* 2002; 20:1597-606.
436. Essalihi R, Zandvliet ML, Moreau S, Gilbert LA, Bouvet C, Lenoel C, et al. Distinct effects of amlodipine treatment on vascular elastocalcinosis and stiffness in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens* 2007; 25:1879-86.
437. Stokes GS, Ryan M, Brnabic A, Nyberg G. A controlled study of the effects of isosorbide mononitrate on arterial blood pressure and pulse wave form in systolic hypertension. *J Hypertens* 1999; 17:1767-73.
438. Gray CL, Ndefo UA. Nebivolol: a new antihypertensive agent. *Am J Health Syst Pharm* 2008; 65:1125-33.
439. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:817-24.
440. Ariyoshi T, Eishi K, Sakamoto I, Matsukuma S, Odate T. Effect of etidronic acid on arterial calcification in dialysis patients. *Clin Drug Investig* 2006; 26:215-22.
441. Kieffer P, Robert A, Capdeville-Atkinson C, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene I. Age-related arterial calcification in rats. *Life Sci* 2000; 66:2371-81.
442. Proudfoot D, Shanahan CM. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein. *Nephrology (Carlton)* 2006; 11:455-61.

443. Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, et al. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med* 2002; 196:1047-55.
444. Fleckenstein A, Frey M, Zorn J, Fleckenstein-Grün G. Experimental basis of the long-term therapy of arterial hypertension with calcium antagonists. *Am J Cardiol* 1985; 56:3H-14H.
445. Thorin E, Henrion D, Oster L, Thorin-Trescases N, Capdeville C, Martin JA, et al. Vascular calcium overload produced by administration of vitamin D3 and nicotine in rats. Changes in tissue calcium levels, blood pressure, and pressor responses to electrical stimulation or norepinephrine in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16:257-66.
446. Henrion D, Chillon JM, Godeau G, Muller F, Capdeville-Atkinson C, Hoffman M, et al. The consequences of aortic calcium overload following vitamin D3 plus nicotine treatment in young rats. *J Hypertens* 1991; 9:919-26.
447. Yu SY, Blumenthal HT. The Calcification of Elastic Fiber. 4. Epinephrine and Beta-Aminopropionitrile-Induced Calcification in Animal Aortas. *J Atheroscler Res* 1965; 5:159-73.
448. Wallin R, Cain D, Sane DC. Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells--a cell system which resembles the system in bone cells. *Thromb Haemost* 1999; 82:1764-7.
449. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1400-7.
450. Herrmann SM, Whatling C, Brand E, Nicaud V, Gariépy J, Simon A, et al. Polymorphisms of the human matrix gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2386-93.
451. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1998-2003.
452. Schurgers LJ, Teunissen KJ, Knapen MH, Kwaijtaal M, van Diest R, Appels A, et al. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid

- (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1629-33.
453. McDonald DA. Regional pulse-wave velocity in the arterial tree. *J Appl Physiol* 1968; 24:73-8.
454. Lariviere R, Lebel M, Kingma I, Grose JH, Boucher D. Effects of losartan and captopril on endothelin-1 production in blood vessels and glomeruli of rats with reduced renal mass. *Am J Hypertens* 1998; 11:989-97.
455. Gupta M, Kovar A, Meibohm B. The clinical pharmacokinetics of phosphodiesterase-5 inhibitors for erectile dysfunction. *J Clin Pharmacol* 2005; 45:987-1003.
456. Palareti G, Legnani C. Warfarin withdrawal. Pharmacokinetic-pharmacodynamic considerations. *Clin Pharmacokinet* 1996; 30:300-13.
457. Schwarz ER, Kapur V, Rodriguez J, Rastogi S, Rosanio S. The effects of chronic phosphodiesterase-5 inhibitor use on different organ systems. *Int J Impot Res* 2007; 19:139-48.
458. Wiley KE, Davenport AP. Nitric oxide-mediated modulation of the endothelin-1 signalling pathway in the human cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 2001; 132:213-20.
459. Kelly LK, Wedgwood S, Steinhorn RH, Black SM. Nitric oxide decreases endothelin-1 secretion through the activation of soluble guanylate cyclase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286:L984-91.
460. Spanikova A, Simoncikova P, Ravingerova T, Pechanova O, Barancik M. The effect of chronic nitric oxide synthases inhibition on regulatory proteins in rat hearts. *Mol Cell Biochem* 2008; 312:113-20.
461. Patel P, Qi WN, Allen DM, Chen LE, Seaber AV, Stamler JS, et al. Inhibition of iNOS with 1400W improves contractile function and alters nos gene and protein expression in reperfused skeletal muscle. *Microsurgery* 2004; 24:324-31.
462. Peng X, Haldar S, Deshpande S, Irani K, Kass DA. Wall stiffness suppresses Akt/eNOS and cytoprotection in pulse-perfused endothelium. *Hypertension* 2003; 41:378-81.
463. Soucy KG, Ryoo S, Benjo A, Lim HK, Gupta G, Sohi JS, et al. Impaired shear stress-induced nitric oxide production through decreased NOS phosphorylation contributes to age-related vascular stiffness. *J Appl Physiol* 2006; 101:1751-9.

464. Marques M, Millas I, Jimenez A, Garcia-Colis E, Rodriguez-Feo JA, Velasco S, et al. Alteration of the soluble guanylate cyclase system in the vascular wall of lead-induced hypertension in rats. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2594-600.
465. Marcet-Palacios M, Graham K, Cass C, Befus AD, Mayers I, Radomski MW. Nitric oxide and cyclic GMP increase the expression of matrix metalloproteinase-9 in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307:429-36.
466. Eberhardt W, Beeg T, Beck KF, Walpen S, Gauer S, Bohles H, et al. Nitric oxide modulates expression of matrix metalloproteinase-9 in rat mesangial cells. *Kidney Int* 2000; 57:59-69.
467. Eberhardt W, Akool el S, Rebhan J, Frank S, Beck KF, Franzen R, et al. Inhibition of cytokine-induced matrix metalloproteinase 9 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists is indirect and due to a NO-mediated reduction of mRNA stability. *J Biol Chem* 2002; 277:33518-28.
468. Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, et al. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 2002; 297:1186-90.
469. Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Atkinson J. Aortic calcification produced by vitamin D3 plus nicotine. *J Vasc Res* 1997; 34:386-98.
470. Franklin SS. Is there a preferred antihypertensive therapy for isolated systolic hypertension and reduced arterial compliance? *Curr Hypertens Rep* 2000; 2:253-9.
471. Elliott RJ, McGrath LT. Calcification of the human thoracic aorta during aging. *Calcif Tissue Int* 1994; 54:268-73.
472. Kloss S, Bouloumie A, Mulsch A. Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* 2000; 35:43-7.
473. Bauersachs J, Bouloumie A, Mulsch A, Wiemer G, Fleming I, Busse R. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovasc Res* 1998; 37:772-9.
474. Laber U, Kober T, Schmitz V, Schrammel A, Meyer W, Mayer B, et al. Effect of hypercholesterolemia on expression and function of vascular soluble guanylyl cyclase. *Circulation* 2002; 105:855-60.

475. Bauersachs J, Bouloumie A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R, Ertl G. Hydralazine prevents endothelial dysfunction, but not the increase in superoxide production in nitric oxide-deficient hypertension. *Eur J Pharmacol* 1998; 362:77-81.
476. Bouvet C, Gilbert LA, Girardot D, deBlois D, Moreau P. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension* 2005; 45:432-7.
477. Wang W, Viappiani S, Sawicka J, Schulz R. Inhibition of endogenous nitric oxide in the heart enhances matrix metalloproteinase-2 release. *Br J Pharmacol* 2005; 145:43-9.
478. Eagleton MJ, Peterson DA, Sullivan VV, Roelofs KJ, Ford JA, Stanley JC, et al. Nitric oxide inhibition increases aortic wall matrix metalloproteinase-9 expression. *J Surg Res* 2002; 104:15-21.
479. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 1993; 7:1475-82.
480. Tomita H, Egashira K, Ohara Y, Takemoto M, Koyanagi M, Katoh M, et al. Early induction of transforming growth factor-beta via angiotensin II type 1 receptors contributes to cardiac fibrosis induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension* 1998; 32:273-9.
481. Quaschnig T, Voss F, Relle K, Kalk P, Vignon-Zellweger N, Pfab T, et al. Lack of endothelial nitric oxide synthase promotes endothelin-induced hypertension: lessons from endothelin-1 transgenic/endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:730-40.
482. Wallace SM, Yasmin, McEniery CM, Maki-Petaja KM, Booth AD, Cockcroft JR, et al. Isolated systolic hypertension is characterized by increased aortic stiffness and endothelial dysfunction. *Hypertension* 2007; 50:228-33.
483. Santhanam L, Lim HK, Miriel V, Brown T, Patel M, Balanson S, et al. Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction. *Circ Res* 2007; 101:692-702.
484. Lalaoui MZ, El Midaoui A, de Champlain J, Moreau P. Is there a role for reactive oxygen species in arterial medial elastocalcinosis? *Vascul Pharmacol* 2007; 46:201-6.
485. Dobrin PB, Rovick AA. Influence of vascular smooth muscle on contractile mechanics and elasticity of arteries. *Am J Physiol* 1969; 217:1644-51.

486. Gaballa MA, Jacob CT, Raya TE, Liu J, Simon B, Goldman S. Large artery remodeling during aging: biaxial passive and active stiffness. *Hypertension* 1998; 32:437-43.
487. Wilkinson IB, Franklin SS, Cockcroft JR. Nitric oxide and the regulation of large artery stiffness: from physiology to pharmacology. *Hypertension* 2004; 44:112-6.
488. Cholley BP, Lang RM, Korcarz CE, Shroff SG. Smooth muscle relaxation and local hydraulic impedance properties of the aorta. *J Appl Physiol* 2001; 90:2427-38.
489. Sardina M, Warrington SJ, Boyce M, Johnston A, Bianchini C. Hemodynamic and humoral effects at rest and after head-up tilt tests during 24-hour infusion of a new nitrate ester, ITF 296, compared with ISDN and placebo in healthy volunteers: a double-blind, randomized, within-subject study. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26 Suppl 4:S80-90.
490. Stewart AD, Millasseau SC, Kearney MT, Ritter JM, Chowienczyk PJ. Effects of inhibition of basal nitric oxide synthesis on carotid-femoral pulse wave velocity and augmentation index in humans. *Hypertension* 2003; 42:915-8.
491. Vaziri ND, Wang XQ. cGMP-mediated negative-feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by nitric oxide. *Hypertension* 1999; 34:1237-41.
492. Filippov G, Bloch DB, Bloch KD. Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1997; 100:942-8.
493. Scott WS, Nakayama DK. Sustained nitric oxide exposure decreases soluble guanylate cyclase mRNA and enzyme activity in pulmonary artery smooth muscle. *J Surg Res* 1998; 79:66-70.
494. Mulsch A, Oelze M, Kloss S, Mollnau H, Topfer A, Smolenski A, et al. Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation* 2001; 103:2188-94.
495. Cohen GA, Hobbs AJ, Fitch RM, Zinner MJ, Chaudhuri G, Ignarro LJ. Nitric oxide regulates endothelium-dependent vasodilator responses in rabbit hindquarters vascular bed in vivo. *Am J Physiol* 1996; 271:H133-9.
496. Griscavage JM, Hobbs AJ, Ignarro LJ. Negative modulation of nitric oxide synthase by nitric oxide and nitroso compounds. *Adv Pharmacol* 1995; 34:215-34.

497. Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1551-7.
498. Fayers KE, Cummings MH, Shaw KM, Laight DW. Nitrate tolerance and the links with endothelial dysfunction and oxidative stress. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56:620-8.
499. Kahler J, Ewert A, Weckmuller J, Stobbe S, Mittmann C, Koster R, et al. Oxidative stress increases endothelin-1 synthesis in human coronary artery smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38:49-57.
500. Halcox JP, Nour KR, Zalos G, Mincemoyer RA, Waclawiw M, Rivera CE, et al. The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation, and myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:1232-40.
501. Hirata K, Adji A, Vlachopoulos C, O'Rourke MF. Effect of sildenafil on cardiac performance in patients with heart failure. *Am J Cardiol* 2005; 96:1436-40.
502. Oliver JJ, Melville VP, Webb DJ. Effect of regular phosphodiesterase type 5 inhibition in hypertension. *Hypertension* 2006; 48:622-7.
503. Teixeira CE, Priviero FB, Webb RC. Differential effects of the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil, vardenafil, and tadalafil in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316:654-61.
504. Vlachopoulos C, Hirata K, O'Rourke MF. Effect of sildenafil on arterial stiffness and wave reflection. *Vasc Med* 2003; 8:243-8.
505. Mahmud A, Hennessy M, Feely J. Effect of sildenafil on blood pressure and arterial wave reflection in treated hypertensive men. *J Hum Hypertens* 2001; 15:707-13.
506. Schofield RS, Edwards DG, Schuler BT, Estrada J, Aranda JM, Pauly DF, et al. Vascular effects of sildenafil in hypertensive cardiac transplant recipients. *Am J Hypertens* 2003; 16:874-7.
507. Zusman RM, Morales A, Glasser DB, Osterloh IH. Overall cardiovascular profile of sildenafil citrate. *Am J Cardiol* 1999; 83:35C-44C.
508. Kloner RA, Mitchell M, Emmick JT. Cardiovascular effects of tadalafil. *Am J Cardiol* 2003; 92:37M-46M.



509. Ghiadoni L, Versari D, Taddei S. Phosphodiesterase 5 inhibition in essential hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2008; 10:52-7.
510. Zhou Z, Sayed N, Pyriochou A, Roussos C, Fulton D, Beuve A, et al. Protein kinase G phosphorylates soluble guanylyl cyclase on serine 64 and inhibits its activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:1803-10.
511. Rossoni G, Manfredi B, De Gennaro Colonna V, Berti M, Guazzi M, Berti F. Sildenafil reduces L-NAME-induced severe hypertension and worsening of myocardial ischaemia-reperfusion damage in the rat. *Br J Pharmacol* 2007; 150:567-76.
512. Ferreira-Melo SE, Yugar-Toledo JC, Coelho OR, De Luca IM, Tanus-Santos JE, Hyslop S, et al. Sildenafil reduces cardiovascular remodeling associated with hypertensive cardiomyopathy in NOS inhibitor-treated rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 542:141-7.
513. McDonald LJ, Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 211:1-6.
514. Hryniewicz K, Dimayuga C, Hudaihed A, Androne AS, Zheng H, Jankowski K, et al. Inhibition of angiotensin-converting enzyme and phosphodiesterase type 5 improves endothelial function in heart failure. *Clin Sci (Lond)* 2005; 108:331-8.
515. Stokes GS, Barin ES, Gilfillan KL. Effects of isosorbide mononitrate and AII inhibition on pulse wave reflection in hypertension. *Hypertension* 2003; 41:297-301.
516. Duchier J, Iannascoli F, Safar M. Antihypertensive effect of sustained-release isosorbide dinitrate for isolated systolic systemic hypertension in the elderly. *Am J Cardiol* 1987; 60:99-102.
517. Fung HL, Poliszczuk R. Nitrosothiol and nitrate tolerance. *Z Kardiol* 1986; 75 Suppl 3:25-7.
518. Starmans-Kool MJ, Kleinjans HA, Lustermaans FA, Kragten JA, Breed JG, Van Bortel LM. Treatment of elderly patients with isolated systolic hypertension with isosorbide dinitrate in an asymmetric dosing schedule. *J Hum Hypertens* 1998; 12:557-61.

## Liste des publications

1. Bouvet C, Essalihi R, **Gilbert LA**, Moreau S, Moreau P. *Arterial stiffness as a therapeutic target for isolated systolic hypertension*. Hypertension Review. 2010; Feb 6 (1) : 21-30.
2. Essalihi R, Zandvliet ML, Moreau S, **Gilbert LA**, Bouvet C, Lenoel C, Nekka F, McKee MD, Moreau P. *Distinct effects of amlodipine treatment on vascular elastocalcinosis and stiffness in a rat model of isolated systolic hypertension*. Journal of Hypertension. 2007 Sep ; 25(9) : 1879-86.
3. Essalihi R, Dao HH, **Gilbert LA**, Bouvet C, Semerjian Y, McKee MD, Moreau P. *Regression of media elastocalcinosis in rat aorta : a new vascular function for carbonic anhydrase*. Circulation. 2005 Sep 13 ; 112 (11) : 1628-1635.
4. Bouvet C, **Gilbert LA**, Girardot D, deBlois D, Moreau P. *Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NOS inhibition*. Hypertension. 2005 Mar; 45(3): 432-7.