

**ROLE DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE ET DES RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES DANS LES EFFETS VASCULAIRES D'UN EXTRAIT DE THE VERT SUR DES RATS FEMELLES DE SOUCHE *WISTAR*.**

**ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AND ESTROGEN RECEPTORS IN VASCULAR EFFECT OF GREEN TEA EXTRACT IN *WISTAR* FEMALE RATS.**

KANE Modou Oumy<sup>\*1,2</sup>, FALL Alioune Dior<sup>3</sup>, GUEYE Papa Madièye<sup>4,2</sup>, DOUPA Dominique<sup>5</sup>, SCHOTT Christa<sup>2</sup>, SALL/DIALLO Aminata<sup>1</sup>, SCHINI-KERTH Valérie<sup>2</sup>

---

**Résumé**

Le thé vert est connu pour ses multiples propriétés thérapeutiques. Dans cette étude nous avons montré que le polyphénol majeur du thé vert, l'épigallocatechine gallate est capable d'entraîner une relaxation du muscle vasculaire chez le rat. Cette relaxation exige la présence de l'endothélium et est médiée par le monoxyde d'azote. La présence d'un antagoniste des récepteurs aux œstrogènes n'affecte pas la relaxation induite par l'extrait de thé. Par contre, cette relaxation est affectée par la présence d'un antioxydant et de l'inhibiteur de PI3-kinase, suggérant l'implication d'une voie de signalisation redox-sensible.

**Mots clés :** espèces réactives de l'oxygène ; récepteurs aux œstrogènes, polyphénols, thé vert.

**Summary**

Green tea is known to have many therapeutic properties. In our study, we showed that major green tea polyphenol, epigallocatechin gallate is able to induce a vascular muscle relaxation in the rat. This relaxation needs the presence of a functional endothelium, and is mediated by nitric oxide. The presence of an estrogen receptor antagonist did not affect the green tea extract- induced relaxation. In contrary, the relaxation was affected by the presence of an antioxidant and an inhibitor of PI3-kinase suggesting an involvement of a redox-sensitive signaling pathway.

**Key words:** reactive oxygen species; estrogen receptors, polyphenols, green tea.

---

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie pharmaceutique, Faculté de Médecine, Pharmacie et Odontostomatologie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, BP 5005, Dakar, Sénégal.

**\*Correspondant et Tirés à part : Docteur Modou Oumy KANE, PHD. Tel : 00221 77.655.12.34 ; Fax : 00221.825.29.52 - Email : [kanebamba@yahoo.fr](mailto:kanebamba@yahoo.fr)**

<sup>2</sup> Université Strasbourg I, Institut Gilbert-Laustriat, CNRS - UMR 7175 CNRS, Département de Pharmacologie et Physicochimie, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France.

<sup>3</sup> Laboratoire de Pharmacognosie et Botanique, Faculté de Médecine, Pharmacie et Odontostomatologie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, BP 5005, Dakar, Sénégal.

<sup>4</sup> Laboratoire de Biochimie pharmaceutique, Faculté de Médecine, Pharmacie et Odontostomatologie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, BP 5005, Dakar, Sénégal.

<sup>5</sup> Laboratoire de Biochimie, UFR des Sciences de la Santé, Université Gaston Berger de Saint Louis, Sénégal.

## 1. Introduction

Les maladies cardiovasculaires constituent une cause majeure de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés; mais également dans les pays en voie de développement. Les conséquences cliniques qui en découlent sont l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque. Les facteurs de risque de ces maladies sont variés et incluent l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, le diabète de type II et le tabagisme. Des études épidémiologiques ont montré que la consommation modérée de vin rouge, de thé vert et d'aliments végétaux (fruits et légumes) était inversement corrélée à l'apparition des maladies coronariennes malgré une alimentation riche en lipides athérogènes dans les pays méditerranéens, (Renaud et al. [1]). La nature exacte de ces effets protecteurs reste encore mal connue mais ceux-ci pourraient être dus en partie à l'action de composés polyphénoliques sur le système vasculaire. En effet, il a été montré que les polyphénols contenus dans certains aliments et boissons sont capables d'inhiber le tonus vasculaire par augmentation de la synthèse d'un puissant facteur vasorelaxant d'origine endothéliale : le monoxyde d'azote (NO) (Andriambelason et al. [2]; Fitzpatrick et al. [3]).

Ce travail a porté sur la détermination expérimentale de la capacité du polyphénol majeur du thé vert, l'épigallocatechine gallate (EGCG) à induire une relaxation de l'aorte de rats femelles de souche *Wistar*. Dans un deuxième temps, nous nous sommes attelés à identifier les mécanismes impliqués dans cet effet vasodilatateur.

## 2. Matériels et Méthodes

### 2.1. Matériels

Les rats femelles âgés de 12 à 14 semaines proviennent de l'animalerie de l'Institut Gilbert Laustriat (Illkirch,

France). L'extrait d'épigallocatechine gallate (*Teavigo<sup>TM</sup>*), gracieusement offert par la société *DSM Nutrition* (Genève, Suisse), a été obtenu par extraction à l'eau chaude et purification à partir de feuille de thé vert (*Camellia sinensis*), selon la méthode décrite par Isbrucker et al. [4]. La phényléphrine, l'acétylcholine, La L-nitro-Arginine (LNA), la Polyéthylène glycol-catalase (PEG-catalase, analogue perméant membranaire de la catalase) ont été obtenus de *Sigma Chemical* (Strasbourg, France). Le pentachlorure de manganèse (III) tétrakis (1-méthyl-4-pyridyl) porphyrine (MnTMPyP), un analogue perméant membranaire de la superoxyde dismutase (SOD), et la wortmannine ont été obtenus de *Alexis Biochemicals* (Strasbourg, France). Le ICI 182780 a été obtenu de *Tocris* (Bristol, Royaume ni).

### 2.2 Etude de la réactivité vasculaire : mesure des variations de tension isométrique

Les rats femelles sont sacrifiés après anesthésie avec du pentobarbital administré par voie intrapéritonéale à la dose de 50 mg/kg. L'aorte thoracique est prélevée, soigneusement nettoyée des tissus adipeux, et coupée en petits anneaux d'environ 3 à 4 mm de long. Dans certaines expériences, l'endothélium a été supprimé par abrasion de la surface intimale du vaisseau à l'aide d'une pincette. Les anneaux sont suspendus dans des cuves à organes isolés contenant 10 mL de solution de Krebs (pH 7,4 ; composition en mM : 119 NaCl, 4,7 KCl, 1,18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,18 MgSO<sub>4</sub>, 1,25 CaCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucose) à 37°C et oxygénée par du carbogène (95% d'O<sub>2</sub> et 5% de CO<sub>2</sub>).

Après avoir équilibré les anneaux pendant 1 heure à une tension de 2 grammes, ils sont précontractés avec une solution de phényléphrine (1 µM) pour

vérifier la réactivité des anneaux. Le lavage des cuves consiste à renouveler trois fois successivement le milieu d'incubation avec de la solution de Krebs. Après une période de 30 minutes de repos, les vaisseaux sont contractés à nouveau avec la phényléphrine (1  $\mu$ M). Après obtention du plateau de contraction, de l'acétylcholine (1  $\mu$ M) est ajoutée dans les cuves pour vérifier la présence d'un endothélium fonctionnel caractérisé par une relaxation d'au moins 80%. Les vaisseaux sont ensuite lavés trois fois avec du Krebs, puis incubés ou non en présence des inhibiteurs pendant 30 minutes avant d'être recontractés par de la phényléphrine (1  $\mu$ M) pour réaliser une courbe concentration-relaxation à l'EGCG.

### 2.3. Expression des résultats

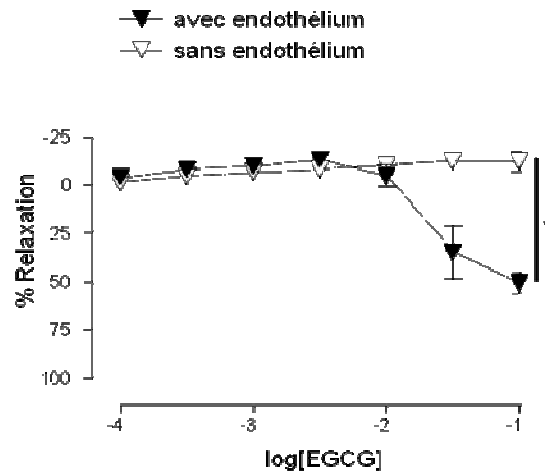
Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. L'analyse statistique a été réalisée avec le test de Student. Les valeurs de  $p < 0.05$  ont été considérées comme significatives.

### 3. Résultats

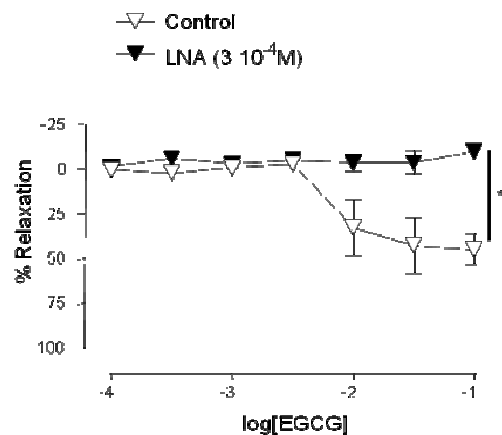
L'application de concentrations croissantes de l'extrait de polyphénol du thé vert sur la réponse contractile induite par la phényléphrine dans l'aorte thoracique des rats entraîne une inhibition graduelle du tonus vasculaire sur les vaisseaux pourvus d'endothélium alors qu'aucune relaxation n'est observée sur ceux qui en sont dépourvus (Figure 1).

La relaxation induite par l'extrait de thé vert est totalement inhibée en présence de LNA, un inhibiteur compétitif de la NO synthase endothéliale, l'enzyme responsable de la synthèse du monoxyde d'azote (NO) (Figure 2). Ces résultats permettent de conclure que le thé vert à travers son polyphénol majeur l'EGCG, entraîne une relaxation endothélium-

dépendante de l'aorte de rat qui est médiée par le NO.

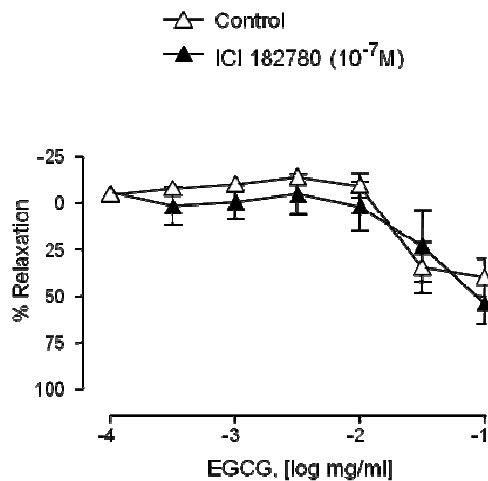


**Figure 1 :** Effet de l'absence de l'endothélium dans les relaxations vasculaires induites par l'extrait d'EGCG au niveau de l'aorte des rats. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type.  $n=5$  ; \* $p < 0.05$ .



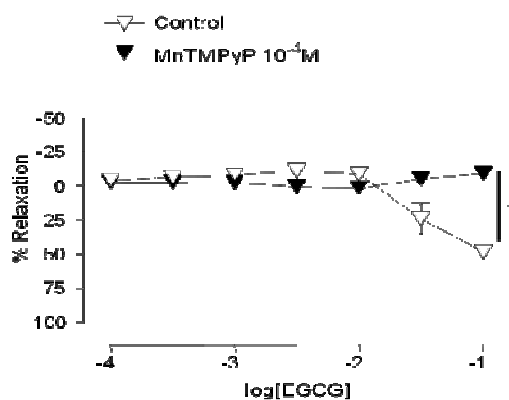
**Figure 2 :** Effet de l'inhibition de la NO synthase par la LNA dans les relaxations vasculaires induites par l'extrait d'EGCG au niveau de l'aorte des rats. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type.  $n=5$  ; \* $p < 0.05$ .

Les polyphénols végétaux en particulier du thé noir ont été rapportés comme dotés de propriétés phytoestrogènes (Anter et al. [5] ; Klinge et al. [6]). Pour vérifier une éventuelle propriété phytoestrogène du thé vert, nous avons testé un antagoniste des récepteurs aux œstrogènes, le ICI 182780. La présence de ce dernier n'a pas affecté la relaxation endothélium-dépendante induite par l'extrait de thé vert (Figure 3).



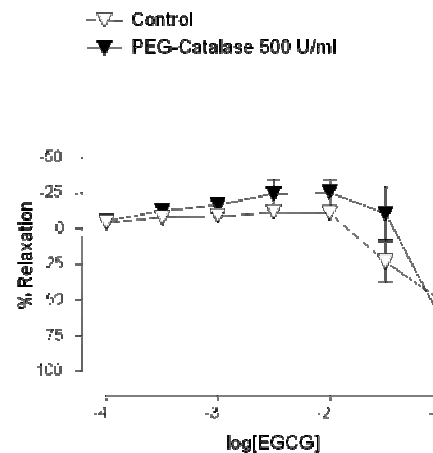
**Figure 3 :** Effet d'un antagoniste des récepteurs aux œstrogènes (ICI 182780) dans les relaxations vasculaires induites par l'extrait d'EGCG au niveau de l'aorte des rats. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type.  $n=5$  ;  $*p < 0.05$ .

Pour vérifier l'influence des espèces réactives de l'oxygène dans les relaxations induites par l'extrait de thé, nous avons testé des modulateurs de ces espèces. L'effet du MnTMPyP, un analogue perméant membranaire de la SOD, qui catalyse la réaction de dismutation des anions superoxydes en  $H_2O_2$ , a été étudiée. Le traitement des anneaux d'aorte avec le MnTMPyP abolit totalement la relaxation aux polyphénols du thé vert (Figure 4).



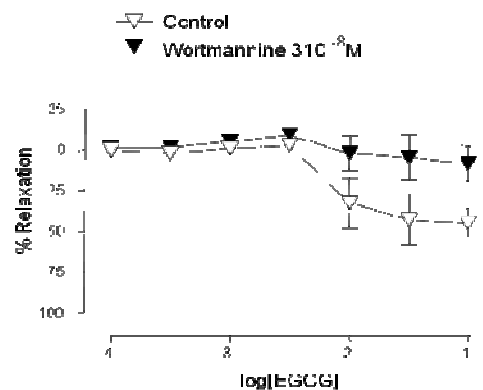
**Figure 4 :** Effet d'un antioxydant, inhibiteur de la production d'anions superoxydes (MnTMPyP) dans les relaxations vasculaires induites par l'extrait d'EGCG au niveau de l'aorte des rats. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type.  $n=5$  ;  $*p < 0.05$ .

Par contre la présence de PEG-catalase (un analogue perméant membranaire de la catalase), qui transforme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau ( $H_2O$ ), n'affecte pas la relaxation endothélium-dépendante induite par le thé vert (Figure 5).



**Figure 5 :** Effet d'un antioxydant, inhibiteur de la production de peroxydes d'hydrogène (PEG-Catalase) dans les relaxations vasculaires induites par l'extrait d'EGCG au niveau de l'aorte des rats. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type.  $n=5$  ;  $*p < 0.05$ .

Pour étudier l'implication de la voie PI3-kinase sur les relaxations induites par l'extrait de polyphénols du thé vert, nous avons mis en présence la wortmannine un inhibiteur de PI3-kinase. L'incubation des anneaux d'aorte avec la wortmannine, inhibe significativement la relaxation induite par l'extrait de polyphénols du thé vert (Figure 6).



**Figure 6 :** Effet d'un inhibiteur de PI3-kinase (Wortmannine) dans les relaxations vasculaires induites par l'extrait d'EGCG au niveau de l'aorte des rats. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type.

#### 4. Discussion

Les résultats de notre étude montrent que l'EGCG, polyphénol majeur du thé vert, entraîne une relaxation importante du vaisseau, et que cette relaxation est endothélium-dépendante, c'est-à-dire qu'elle exige la présence d'un endothélium fonctionnel. L'endothélium est connu pour son rôle de sécrétion de facteurs vasorelaxants en tête desquels, nous avons le NO. Cette étude révèle que les relaxations endothélium-dépendantes induites par le thé, sont médiées par le NO, car l'inhibition de sa synthèse par la présence de LNA bloque totalement la relaxation. Ces données sont en parfaite corrélation avec celles rapportées par d'autres auteurs. En effet, plusieurs études ont démontré que l'action vasculaire des polyphénols végétaux comme ceux du vin rouge est liée à leurs propriétés à stimuler la production de NO en activant la NO synthase endothéliale (Ndiaye et al. [7] ; Wallerath et al. [8]). Le NO diffuse dans la cellule musculaire lisse, active la Guanylate cyclase qui transforme le guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc), et c'est l'augmentation du GMPc qui est responsable de la relaxation du muscle lisse vasculaire (Stoclet et al. [9] ; Archer et al. [10]).

Les résultats de notre étude ont montré que l'inhibition des récepteurs aux œstrogènes par le ICI 182780, n'affectait pas la relaxation induite par l'extrait de thé vert. Ce résultat surprenant va à l'encontre de certaines données de la littérature faisant état de propriétés phytoestrogènes des polyphénols du thé noir (Anter et al. [5]). Ces résultats corroborent pourtant des données obtenues avec un extrait de polyphénols du vin rouge, qui ont également montré que la présence de ICI 182780 n'avait aucun effet sur leur action vasodilatatrice (données non présentées ici). Cette différence peut s'expliquer en

partie par une différence de composition en polyphénols entre le thé noir d'une part et le thé vert et le vin rouge d'autre part.

Nos résultats ont montré également que la relaxation endothélium et NO-dépendante obtenue avec le thé impliquait un rôle des espèces réactives de l'oxygène. En effet, en présence de l'antioxydant MnTMPyP qui catalyse la dismutation des anions superoxydes et s'oppose donc à leur présence, la relaxation était totalement abolie. Cette donnée est assez originale car suggère une activité pro-oxydante des polyphénols du thé vert dans certaines conditions. Or de travaux de recherches menés sur les polyphénols végétaux démontrent plutôt une action anti-oxydante de ces derniers (Stupans et al. [11] ; Serafini et al. [12] ; Robak et al. [13]). Ces données sont venues confirmer des résultats antérieurement obtenus dans notre laboratoire, démontrant que l'activation de la NO synthase par les polyphénols du vin rouge était médiée par la présence d'espèces réactives de l'oxygène (Ndiaye et al. [7] ; Ndiaye et al. [14] ; Ndiaye et al. [15]). Le mécanisme oxydatif induit par les polyphénols semble essentiellement intracellulaire (Ndiaye et al. [14]). L'autre originalité dans cette étude est la non affectation des relaxations obtenues, par la présence d'un autre anti-oxydant à savoir la PEG-Catalase, qui s'oppose à la présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette donnée montre que les anions superoxydes sont les seules espèces réactives de l'oxygène impliqués dans les effets vasculaires du thé vert. Il est maintenant bien établi que les espèces réactives de l'oxygène sont considérées comme des médiateurs physiologiques lorsqu'ils sont produits en faible quantité. Elles sont, en effet, capables d'activer des voies de signalisation cellulaire sensibles au potentiel rédox telles que la voie de la

Src-kinase et de la PI3-kinase/Akt (Yoshizumi et al. [16] ; Ushio-Fukai et al. [17]). Plusieurs études ont montré l'implication de ces kinases dans l'activation de la eNOS par phosphorylation de la sérine 1177 (Haynes et al. [18] ; Jin et al. [19] ; Haynes et al. [20]). C'est dans cette optique que nous avons testé les effets de la wortmannine, un inhibiteur de PI3-kinase, sur la relaxation induite par l'extrait de thé. Les résultats indiquent que la wortmannine est capable d'inhiber la relaxation induite par l'extrait de thé vert suggérant l'implication de la voie PI3-kinase dans l'effet vasorelaxant de l'extrait. Ces résultats sont en conformité avec beaucoup d'autres données de la littérature qui ont mis en évidence le rôle de la voie PI3-kinase dans les effets vasculaires des polyphénols végétaux comme ceux du vin rouge (Ndiaye et al. [14]). Les polyphénols entraîneraient la formation intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène qui vont activer la Src-kinase qui elle-même active la voie PI3-kinase/Akt, responsable de la phosphorylation de la protéine Akt. La protéine Akt, une fois activée, va pouvoir entraîner l'activation de la NO synthase endothéliale par phosphorylation sur la sérine 1177 menant à la formation de NO. Le NO va ensuite diffuser à travers la membrane plasmique de la cellule endothéliale vers la cellule musculaire lisse vasculaire où il va stimuler la guanylyl cyclase aboutissant à la formation de GMP cyclique responsable de la relaxation (Ndiaye et al. [14] ; Anselm et al. [21]). Si les résultats de cette étude ont montré l'implication de PI3-kinase dans la cascade de signalisation qui mène à la relaxation du vaisseau par production de NO, des données préliminaires non exposées ici avaient montré que la présence de PP2 (4-amino-5-(4-chlorophényl)-7-(t-butyl) pyrazolo[3,4-d]pyrimidine), un inhibiteur de Src-

kinase ne permettait pas d'inhiber les relaxations à l'extrait de thé. Cela suggère l'existence d'une voie de signalisation parallèle impliquant PI3-kinase mais ne passant pas par Src-kinase. Des études ultérieures permettront de mieux mettre en évidence cette voie.

## 5. Conclusion

Cette étude nous a permis de montrer une propriété intéressante du thé vert à savoir un effet vasodilatateur. Cette propriété vient s'ajouter à plusieurs autres attribuées au thé qui en font une boisson intéressante dans la recherche de molécules biologiquement actives contre un certain nombre de pathologies comme les maladies cardiovasculaires en tête desquelles nous avons l'hypertension artérielle. En effet, l'action vasodilatatrice démontrée dans cette étude suggère une propriété préventive du thé dans la survenue de l'hypertension artérielle où la vasoconstriction semble jouer un rôle important dans l'initiation et le développement. Cette étude peut susciter un espoir réel dans des pays comme le Sénégal où les maladies cardiovasculaires constituent un véritable problème de santé publique et où la consommation du thé (noir surtout) a acquis presque une dimension culturelle.

## 6. Références

- [1] Renaud S., de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992; 339, 1523-1526.
- [2] Andriambeloson E., Magnier C., Haan-Archipoff G., Lobstein A., Anton R., Beretz A., Stoclet J.C., Andriantsitohaina, R. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic

- aorta. *J Nutr.* 1998; 128, 2324-2333.
- [3] Fitzpatrick, D.F., Hirschfield S.L., Coffey R.G. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol.* 1993; 265, H774-778.
- [4] Isbrucker R.A., Bausch J., Edwards J.A., Wolz E. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 1: genotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44, 626-635.
- [5] Anter E., Chen K., Shapira O.M., Karas R.H., Keaney J.F. p38 mitogen-activated protein kinase activates eNOS in endothelial cells by an estrogen receptor alpha-dependent pathway in response to black tea polyphenols. *Circ Res.* 2005; 96, 1072-1078.
- [6] Klinge C.M., Blankenship K.A., Risinger K.E., Bhatnagar S., Noisin E.L., Sumanasekera, W.K., Zhao L., Brey D.M., Keynton R.S. Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2005; 280, 7460-7468.
- [7] Ndiaye M., Chataigneau T., Chataigneau M., Schini-Kerth V.B. Red wine polyphenols induce EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries through the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway. *Br J Pharmacol.* 2004; 142, 1131-1136.
- [8] Wallerath T., Deckert G., Ternes T., Anderson H., Li H., Witte K., Forstermann U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002; 106, 1652-1658.
- [9] Stoclet J.C., Kleschyov A., Andriambelason E., Diebolt M., Andriantsitohaina R. Endothelial NO release caused by red wine polyphenols. *J Physiol Pharmacol.* 1999; 50, 535-540.
- [10] Archer S.L., Huang, J.M., Hampl V., Nelson D.P., Shultz P.J., Weir E.K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91, 7583-7587.
- [11] Stupans I., Kirlich A., Tuck K.L., Hayball P.J. Comparison of radical scavenging effect, inhibition of microsomal oxygen free radical generation, and serum lipoprotein oxidation of several natural antioxidants. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2002; 50, 2464-2469.
- [12] Serafini M., Maiani G., Ferro-Luzzi A. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr.* 1998; 128, 1003-1007.
- [13] Robak J., Gryglewski R.J. Bioactivity of flavonoids. *Polish journal of pharmacology.* 1996; 48, 555-564.
- [14] Ndiaye M., Chataigneau M., Lobysheva I., Chataigneau T., Schini-Kerth V.B. Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated

- porcine coronary artery. *Faseb J.* 2005; 19, 455-457.
- [15] Ndiaye M., Chataigneau T., Andriantsitohaina R., Stoclet J.C., Schini-Kerth V.B. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 ; 310, 371-377.
- [16] Yoshizumi M., Abe J., Haendeler J., Huang Q., Berk B.C. Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2000; 275(16):11706-12.
- [17] Ushio-Fukai M., Alexander R.W., Akers M., Yin Q., Fujio Y., Walsh K., Griendling K.K. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1999; 274(32):22699-704.
- [18] Haynes M.P., Li L., Sinha D., Russell K.S., Hisamoto K., Baron R., Collinge M., Sessa W.C., Bender J.R. Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J Biol Chem.* 2003; 278, 2118-2123.
- [19] Jin Z.G., Ueba H., Tanimoto T., Lungu A.O., Frame M.D., Berk B.C. Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res.* 2003; 93, 354-363.
- [20] Haynes M.P., Sinha D., Russell K.S., Collinge M., Fulton D., Morales-Ruiz M., Sessa W.C., Bender J.R. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res.* 2000 ; 87, 677-682.
- [21] Anselm E., Chataigneau M., Ndiaye M., Chataigneau T., Schini-Kerth V.B. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. *Cardiovasc Res.* 2007; 73, 404-413.