

Université de Montréal

ÉTUDE DE LA DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE DES MICROVAISSEAUX SOUS-  
ENDOCARDIQUES DANS UN MODÈLE D'HYPERTROPHIE VENTRICULAIRE  
GAUCHE CHEZ LE PORC

Par  
**MARIE-EVE GENDRON**

Département de Pharmacologie  
Université de Montréal  
Faculté de médecine

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

Mars, 2004

© Marie-Eve Gendron, 2004



W

4

058

2004

v. 152

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

---

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude de la dysfonction endothéliale des microvaisseaux sous-endocardiques dans un modèle d'hypertrophie ventriculaire gauche chez le porc

présenté par :  
Marie-Eve Gendron

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Denis Deblois	Président-rapporteur
Louis P. Perrault	Directeur de recherche
Éric Thorin	Codirecteur
Daniel Lamontagne	Membre du jury

---

## Résumé (français)

L'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) est associée à une dysfonction endothéliale des artères coronaires épigardiques et à une ischémie sous-endocardique. L'impact d'une HVG sur les artères coronaires de résistance sous-endocardiques n'est pas encore connu. L'objectif de la présente étude était de caractériser les mécanismes responsables de la dilatation dépendante de l'endothélium et de déterminer l'impact de l'HVG sur celle-ci. Pour réaliser ce projet, une sténose aortique a été créée chez des porcs, induisant une HVG après deux mois de cerclage aortique. Les artères coronaires de résistance sous-endocardiques ont été isolées et pressurisées à 100 mm Hg. Le diamètre interne des artères a été déterminé sous des conditions sans débit et à pression constante. Des courbes concentration-réponse à la bradykinine (BK), au UK-14,304 (UK, agoniste  $\alpha_2$ -adrénergique) et au nitroprussiate de sodium (SNP) ont été construites. À partir des vaisseaux provenant des porcs témoins, la BK et le UK ont induit une dilatation dépendante de l'endothélium. La BK a induit une dilatation complète après l'inhibition de la NO synthase endothéliale par le N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA, 10  $\mu$ M), alors que la dilatation induite par le UK a été réduite de moitié ( $P < 0.05$ ). Cela suggère que le NO et l'EDHF contribuent différemment à la dilatation produite par la stimulation des récepteurs à la BK et du UK. En conditions dépolarisantes mimées par un milieu extracellulaire riche en ions K<sup>+</sup> (solution physiologique de 40 mM KCl), la BK a induit une dilatation complète, alors que celle induite par le UK a été abolie. Ces résultats suggèrent que le NO provoque une dilatation coronarienne impliquant un mécanisme d'hyperpolarisation en présence de UK seulement. L'inhibition des canaux K<sub>ATP</sub> par la glibenclamide (Glib, 0.1  $\mu$ M) a réduit ( $P < 0.05$ ) la dilatation  $\alpha_2$ -adrénergique à un niveau similaire à celui obtenu en présence de L-NNA. La combinaison Glib/L-NNA n'a pas produit d'effet inhibiteur supplémentaire. Dans les microvaisseaux coronaires isolés à partir des porcs présentant une HVG, la dilatation induite par le UK a été réduite à 25±4% de la dilatation maximale ( $E_{max}$ ) comparé à 79±6% dans les artères témoins. De plus, la dilatation induite  $\alpha_2$ -adrénergique a été insensible au L-NNA dans l'HVG, alors qu'elle a été réduite ( $P < 0.05$ ) à 35±6% chez les témoins. Par

---

opposition, les dilatations induites par la BK et le SNP n'ont pas été altérées dans l'HVG. En résumé, le NO et l'EDHF contribuent aux dilatations dépendantes de l'endothélium induites par le UK et la BK dans les artères de résistance sous-endocardiques isolées et pressurisées. La dilatation  $\alpha_2$ -adrénergique est dépendante du NO, dont la libération est tributaire de l'activation des canaux  $K_{ATP}$  endothéliaux. Précisément, l'hyperpolarisation des cellules endothéliales favorise l'entrée du calcium, le signal d'activation de la NO synthase. Cette composante endothéliale est supprimée dans l'HVG. La dilatation induite par la BK dépendante du NO est indépendante de l'activation des canaux  $K_{ATP}$  et est insensible à l'HVG. Nos résultats suggèrent donc que les voies intracellulaires activées par le UK et la BK qui mènent à une dilatation dépendante du NO, sont différentes dans les petites artères coronaires. Enfin, l'HVG altère sélectivement la production du NO impliquant l'activation des canaux  $K_{ATP}$  endothéliaux.

**Mots clés:** Endothélium; artérioles coronaires; HVG; NO; hyperpolarisation; canaux  $K_{ATP}$ ; agoniste  $\alpha_2$ -adrénergique

---

## Résumé (anglais)

Left ventricular hypertrophy (LVH) is associated with an endothelial dysfunction of large conductance coronary arteries and subendocardial ischemia. The influence of LVH in resistance subendocardial coronary arteries is unknown. The aim of this study was to characterize the mechanisms leading to endothelial dilation and its faith in LVH. To this aim, an aortic stenosis was induced in pigs leading to established LVH after two months. Subendocardial resistance coronary arteries were isolated and pressurized at 100 mm Hg. Online vessel diameter was recorded in no flow conditions and at constant pressure. Concentration response-curves to bradykinin (BK), UK-14,304 (UK,  $\alpha_2$ -adrenoreceptor agonist) and sodium nitroprusside (SNP) were obtained. In vessels isolated from control animals, BK and UK induced an endothelium-dependent dilation. Whereas vascular dilation induced by BK was complete after NO synthase inhibition by N<sup>w</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA, 10  $\mu$ M), UK-induced dilation was reduced by half ( $P < 0.05$ ). Hence, both NO and EDHF contribute to agonist-induced dilation but their relative contribution differs between BK and UK. Under depolarized conditions using high extracellular K<sup>+</sup> (40 mM KCl physiological solution), BK-induced dilation was maintained whereas that induced by UK was prevented. This suggests that NO induces coronary dilation through an hyperpolarizing mechanism when exposed to UK but not BK. Inhibition of K<sub>ATP</sub> channels with glibenclamide (Glib, 0.1  $\mu$ M) reduced ( $P < 0.05$ ) UK-induced dilation to a similar extent as L-NNA and combination of Glib and L-NNA had no further inhibitory effect on UK-induced dilation. In coronary microvessels isolated from swine with LVH, UK-induced dilation was reduced to 25 $\pm$ 4% of the maximal dilation ( $E_{max}$ ) compared to 79 $\pm$ 6% in arteries isolated from control animals. In addition, UK-induced dilation was insensitive to L-NNA in LVH, but reduced ( $P < 0.05$ ) to 35 $\pm$ 6% in controls. In contrast, neither BK- nor SNP-induced dilation were impaired in coronary arteries isolated from pigs with LVH. In summary, both NO and EDHF contribute to UK- and BK-induced endothelium-dependent dilation of isolated and pressurized subendocardial resistance arteries. UK-induced NO-dependent dilation, however, is mediated by activation of endothelial K<sub>ATP</sub> channels. Hyperpolarization

---

of endothelial cells leads to an increase in intracellular calcium, which activates the endothelial NO synthase. This component is deleted in LVH. In contrast, BK-induced NO-dependent dilation is independent of  $K_{ATP}$  channel activation and insensitive to LVH. Our findings suggest that UK and BK pathways leading to NO-mediated dilation are different in small coronary arteries and that LVH selectively affects NO-mediated endothelial  $K_{ATP}$  channel-dependent dilation.

**Key words:** Endothelium; coronary arterioles; LVH; NO; hyperpolarization;  $K_{ATP}$  channels;  $\alpha_2$ -adrenergic agonist



---

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé (français).....	3
Résumé (anglais).....	5
LISTE DES TABLES.....	10
LISTE DES FIGURES .....	11
REMERCIEMENTS .....	16
INTRODUCTION.....	17
1. L'endothélium vasculaire.....	18
2. Facteurs endothéliaux vasoactifs.....	19
2.1 Facteurs vasorelaxants dérivés de l'endothélium .....	19
2.1.1 Monoxyde d'azote (NO).....	19
2.1.1.1 La découverte du NO.....	19
Les études de Furchgott et Zawadzki.....	19
À la découverte de l'EDRF .....	20
2.1.1.2 La nature du NO.....	21
La formation du NO.....	21
Les mécanismes de la relaxation induite par le NO.....	22
2.1.1.3 Les rôles du NO .....	24
Les effets vasodilatateurs du NO.....	24
Les effets antiplaquettaires du NO.....	25
Les effets antiprolifératifs du NO .....	25
Les effets antiadhésifs du NO.....	26
Les effets antioxydants du NO .....	27
2.1.2 Prostacycline (PGI <sub>2</sub> ).....	28
2.1.3 Facteur hyperpolarisant (EDHF).....	28
2.2 Facteurs contractants dérivés de l'endothélium .....	30

---

2.2.1 L'endothéline .....	30
2.2.2. Les métabolites de l'acide arachidonique.....	31
3. La dysfonction endothéliale .....	31
3.1 Méthodes d'évaluation de la fonction endothéliale .....	33
3.2 Les interventions pour renverser la dysfonction endothéliale.....	34
3.2.1 L'exercice .....	34
3.2.2 Diète faible en gras.....	35
3.2.3 Les antioxydants .....	35
3.2.4 Les statines : thérapie par la réduction des lipides.....	36
3.2.5 Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ANG II) et les bloqueurs des récepteurs à l'ANG II.....	36
3.2.6 Traitement aux estrogènes.....	37
4. Les pathologies cardiovasculaires .....	38
4.1 L'hypertrophie ventriculaire gauche.....	40
5. La circulation coronarienne.....	43
5.1 La microcirculation coronarienne.....	43
5.1.1 Définition et classification des microvaisseaux.....	43
5.1.2 Rôle de la microcirculation.....	44
5.1.2.1 Réponses aux forces physiques.....	44
Le tonus myogénique .....	45
La dilatation induite par le débit .....	47
5.1.2.2 Contrôle par les facteurs métaboliques.....	49
5.1.2.3 Contrôle par les facteurs neurohumoraux.....	49
5.1.3 Les pathologies associées à la microcirculation .....	50
L'hypertension.....	50
L'hypercholestérolémie.....	51
Le diabète .....	52
6. Le modèle expérimental.....	52
Limites du modèle .....	56
7. L'approche expérimentale.....	56
8. Hypothèses et buts.....	58

---

---

MATERIEL ET METHODES .....	60
9. La chirurgie .....	61
9.1 Prélèvements des préparations .....	61
9.1.1 Prélèvement du cœur .....	61
9.1.2 Prélèvement des artérioles sous-endocardiques.....	62
9.2 Montage de l'artériole dans l'artériographe .....	62
9.3 Le dispositif expérimental : l'artériographe .....	63
9.4 Protocole sommaire d'une courbe concentration-réponse .....	65
9.5 Solution physiologiques .....	66
9.5.1 Solution Physiologique Saline (PSS) .....	66
9.5.2 Solution hyperpotassique.....	66
8.5.3 Solution sans calcium.....	67
9.6 Réactifs.....	67
ARTICLE .....	68
Accord des coauteurs.....	69
DISCUSSION .....	96
LES SOURCES DOCUMENTAIRES .....	105

---

## LISTE DES TABLES

### INTRODUCTION

<b>Table 1 :</b> Caractéristiques des différents isoformes des NOS.....	22
<b>Table 2 :</b> Caractéristiques des différents isoformes de l'endothéline.....	31
<b>Table 3 :</b> Données échocardiographiques du modèle expérimental.....	54
<b>Table 4 :</b> Données hémodynamiques du modèle expérimental.....	55
<b>Table 5 :</b> Données morphologiques du modèle expérimental.....	55

### ARTICLE

<b>Table 1 :</b> Myogenic tone (% $D_{max}$ ) of pressurised (100 mm Hg) coronary endocardial arteries in the absence (PSS) or in the presence of pre-treatment with N $\omega$ -nitro-L-arginine (+ L-NNA, 10 $\mu$ mol l <sup>-1</sup> ), glibenclamide (Glib, 1 $\mu$ mol l <sup>-1</sup> ), 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one (ODQ, 10 $\mu$ mol l <sup>-1</sup> ) or a combination of L-NNA, apamin (Apa, 1 $\mu$ mol l <sup>-1</sup> ) and charybdotoxin (Chtx, 0.1 $\mu$ mol l <sup>-1</sup> ).....	91
<b>Table 2 :</b> Pharmacological parameters for UK-14,304-induced dilation of pressurised coronary endocardial arteries. Vascular sensitivity ( $pD_2$ ) and maximal dilation ( $E_{max}$ ) to the $\alpha_2$ -AR agonist in arteries isolated from control pigs and pigs with left ventricular hypertrophy (LVH) following 2 months of aortic banding.....	92
<b>Table 3 :</b> Pharmacological parameters for bradykinin (BK)- and sodium nitroprusside (SNP)-induced dilation of pressurised coronary endocardial arteries. Vascular sensitivity ( $pD_2$ ) and maximal dilation ( $E_{max}$ ) in arteries isolated from control pigs and pigs with left ventricular hypertrophy (LVH) following 2 months of aortic banding.....	93

---

## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION

<b>Figure 1</b> : Les mécanismes de relaxation induite par le NO dépendants du GMP cyclique.....	24
<b>Figure 2</b> : Les effets antiprolifératifs du NO.....	26
<b>Figure 3</b> : Les effets antioxydants du NO.....	27
<b>Figure 4</b> : Les mécanismes d'action possibles de l'EDHF.....	29
<b>Figure 5</b> : La dysfonction endothéliale.....	32
<b>Figure 6</b> : Mécanismes de contraction et de compensation du tonus myogénique.....	47
<b>Figure 7</b> : La dilatation induite par le débit.....	48
<b>Figure 8</b> : Contrôle du tonus par les facteurs neurohumoraux.....	50
<b>Figure 9</b> : Schéma de l'artériographe.....	64
<b>Figure 10</b> : Représentation d'une courbe dose-réponse.....	66

### ARTICLE

<b>Figure 1</b> : UK-14,304-induced dilation of isolated and pressurised endocardial coronary arteries isolated from (A) control and (B) LVH pigs. Experiments were performed in the absence (PSS) or presence of a depolarising solution (+ K <sup>+</sup> , 40 mmol l <sup>-1</sup> KCl PSS), N $\omega$ -nitro-L-arginine (+ L-NNA, 10 $\mu$ mol l <sup>-1</sup> ), glibenclamide (Glib, 1 $\mu$ mol l <sup>-1</sup> ) or a combination of L-NNA and Glibenclamide or L-NNA and Apamin (1 $\mu$ mol l <sup>-1</sup> ) + Charybdotoxin (0.1 $\mu$ mol l <sup>-1</sup> ). Data are mean $\pm$ SEM of 6 to 7 independent experiments. All solutions contained indomethacin *: P<0.05 compared to PSS and with K <sup>+</sup> ; †: P<0.05 compared to all groups; ¶ : P<0.05 compared to PSS Control (A).....	95
--	----

### DISCUSSION

<b>Figure 12</b> : Mécanisme d'action du NO impliquant les canaux K <sub>ATP</sub> endothéliaux.....	99
--	----

---

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

- 5-HT : Sérotonine  
AA : Acide arachidonique  
ACE : Angiotensin converting enzyme  
ACh : Acétylcholine  
ADMA : Asymmetric dimethyl arginine  
AMPc : Adénosine monophosphate  
ANG II : Angiotensin II  
ATP : Adénosine triphosphate  
BH<sub>4</sub> : Tétrahydrobioptérine  
BK : Bradykinine  
Ca<sup>2+</sup> : Calcium  
CGRP : Récepteur couplé aux protéines G  
DAG : Diacylgérol  
E : Épaisseur  
ecSOD : Superoxyde dismutase extracellulaire  
EDCF : Endothelium-derived contracting factor  
EDHF : Endothelium-derived hyperpolarizing factor  
EDRF : Endothelium-derived relaxing factor  
EET : Acides époxyeicosatriénoïques  
eNOS, NOS III: NO synthase endothéliale  
ET-1 : Endothéline  
ET<sub>A</sub> : Récepteur ET<sub>A</sub> de l'endothéline (muscle lisse)  
ET<sub>B</sub> : Récepteur ET<sub>B</sub> de l'endothéline (muscle lisse et endothélium)  
FAD : Flavin adénine nucléotide  
FMD : Flow-mediated dilation  
FMN : Flavine mononucléotide  
gap junction : Jonction serrée  
GCs : Guanylate cyclase soluble  
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique  
GTP : Guanosine triphosphate

---

HVG : Hypertrophie ventriculaire gauche  
ICAM : Intercellular adhesion molecule ICAM-)  
IK<sub>ca</sub> : Canal potassique à conductance intermédiaire  
IL-6 : Interleukine-6  
iNOS, NOS II: NO synthase inductible  
IP : Récepteur de la prostacycline  
IP<sub>3</sub> : Inositol triphosphate  
IRAG : Inositol trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate  
K<sub>ATP</sub> : Canal potassique dépendant de l'ATP  
K<sub>ca</sub> : Canal potassique dépendant du calcium  
K<sub>ir</sub> : Canal potassique à rectification entrante  
K<sub>v</sub> : Canal potassique dépendant du voltage  
kDa : kilo Dalton  
LDL : Lipoprotéine de faible densité  
L-NNA : N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine  
MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1  
Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase : Pompe sodium/potassium ATPase  
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit  
nNOS, NOS I: NO synthase neuronale  
NOS : NO synthase  
NPY : Neuropeptide Y  
ODQ : 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one  
P450 : Cytochrome P450  
PDE III : cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase  
PDGF : Platelet-derived growth factor  
PGI<sub>2</sub> : Prostacycline  
PKA : cAMP-dependent protein kinase  
PKC : Protéine kinase C  
PKGs : Kinases dépendantes du GMPC  
PLC : Phospholipase C  
PSS : Physiological saline solution

---

R : Rayon

récepteur B2 : Récepteur de la bradykinine

SERCA : Sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

shear stress : Forces de cisaillement

SHR : Spontaneously hypertensive rat

$\text{SK}_{\text{ca}}$  : Canal potassique dépendant du calcium à petite conductance

SNP : Nitroprussiate de sodium

SOD : Superoxide dismutase

$\text{TGF}\beta$ -1 : Tumor growth factor

$\text{TNF}\alpha$  : Tumor necrosis factor

UK-14304 : Agoniste  $\alpha_2$ -adrénergique

VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule



---

*Se donner du mal pour les petites choses,  
c'est parvenir aux grandes,  
avec le temps*

*Samuel Beckett*

*À mes parents, Marie-Claude et Alain  
ainsi que mon copain Alexandre*

---

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier Dr Louis P Perrault pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour le temps qu'il consacre à la recherche fondamentale malgré son horaire chargé dû à sa carrière de chirurgien cardiaque.

Je voudrais également remercier Dr Éric Thorin pour ses conseils, son enseignement, son écoute, sa confiance et sa rigueur scientifique. J'ai grandement apprécié le support qu'il m'a porté tout au long de ma maîtrise et je suis fière de continuer mes études graduées à ses côtés.

Je voudrais remercier Nathalie, ma voisine de travail de tous les jours, pour m'avoir appris différentes techniques et avec qui j'ai eu des discussions de toutes sortes. Un merci tout spécial pour...être aussi maniaque que moi du ménage !

Marie-Pierre, cette amie et technicienne fantastique, a sans contredit rendu ma maîtrise très agréable. Merci Marie pour ton sourire, ton amitié, ton expertise, tes conseils et ton écoute et surtout pour m'avoir fait découvrir Harry Potter... à bientôt !

Malgré le fait que Fanny, ma consœur de maîtrise, soit présentement loin de nous tous, je tiens à souligner l'amitié que je lui porte. Nous avons passé de bons moments ensemble que je n'oublierai jamais et j'espère que tout va pour le mieux dans ton petit coin de Belgique.

Je voudrais aussi remercier mes amis et collègues de travail, Guillaume, Stéphane, Nada et Stéphanie avec qui j'ai ri parfois de tout, parfois de rien et parfois de ma naïveté... Je vous apprécie pour vos personnalités respectives et tiens à vous dire que l'atmosphère du laboratoire est chaleureuse et unique en votre présence. Vous n'avez pas fini de me voir !

Par-dessus tout je voudrais sincèrement remercier ma famille, mon père, ma mère, mon frère et mon copain (et oui tu fais partie de ma famille !). Je vous remercie pour votre amour et d'avoir été présent sans compter lors des moments heureux et plus difficiles. Je vous adore tous et je vous estime beaucoup.

***INTRODUCTION***

### 1. L'endothélium vasculaire

Malgré sa simple structure en monocouche, l'endothélium est responsable d'une multitude de fonctions. L'endothélium sain contribue en effet à entretenir localement le tonus vasomoteur et à maintenir une surface non thrombogène ; il agit comme barrière sélective, en contrôlant la perméabilité et le transport des solutés et des macromolécules pour permettre le métabolisme de nombreux facteurs circulants. Il permet également de contrôler la prolifération des cellules du muscle vasculaire lisse sous-jacentes, et de réguler l'adhésion et l'extravasation des neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes. Ces propriétés sont dues à la capacité des cellules endothéliales à réagir aux stimuli humoraux et hémodynamiques. Trois mécanismes fondamentaux expliquent ces propriétés : la sécrétion des facteurs endothéliaux ; l'expression à la surface de la membrane cellulaire de protéines de liaison, de molécules adhérentes et d'enzymes de conversion ainsi que les changements de forme (étirement des cellules endothéliales).

Chez le mammifère, l'endothélium agit comme un médiateur dans la relaxation et la contraction des artères et des veines. Les contractions dites dépendantes de l'endothélium sont induites *via* la libération, par les cellules endothéliales, de facteurs vasocontractants (EDCF ; *Endothelium-Derived Contracting Factor*); ces derniers comprennent l'anion superoxyde, les endoperoxydes, la thromboxane A<sub>2</sub> et l'endothéline. D'autre part, les relaxations dites dépendantes de l'endothélium, sont dues à la libération, par les cellules endothéliales, de facteurs vasodilatateurs puissants (EDRF; *Endothelium-Derived Relaxing Factor*)<sup>1</sup>. Parmi ces substances, le facteur endothélial le mieux caractérisé est le monoxyde d'azote (NO). Dans un certain nombre de vaisseaux sanguins animaux et dans les artères coronaires humaines, les cellules endothéliales libèrent également une substance qui provoque l'hyperpolarisation de la membrane cellulaire et conséquemment une vasorelaxation, ce facteur est appelé EDHF (*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*)<sup>2</sup>.

## 2. Facteurs endothéliaux vasoactifs

Les cellules endothéliales qui tapissent la paroi interne des vaisseaux sanguins disposent d'un rôle très important quant au contrôle du tonus vasculaire et de l'homéostasie vasculaire. Plusieurs de ces effets sont induits par des changements au niveau de la génération et de la libération de facteurs endothéliaux vasoactifs. *In vivo*, les cellules endothéliales sont constamment stimulées par le débit sanguin (*shear stress*). C'est l'intensité de cette stimulation qui détermine les niveaux de production des facteurs endothéliaux et d'expression des enzymes responsables de leur production<sup>3</sup>.

### 2.1 Facteurs vasorelaxants dérivés de l'endothélium

#### 2.1.1 Monoxyde d'azote (NO)

##### 2.1.1.1 La découverte du NO

#### Les études de Furchgott et Zawadzki

C'est vers la fin des années 1970 que Robert Furchgott commence à étudier l'effet de l'acétylcholine sur la réactivité vasculaire et fait la découverte du NO<sup>4</sup>. À cette époque, l'étude d'artères isolées se faisait sur des préparations dont l'adventice et l'endothélium étaient retirés, afin d'obtenir uniquement le muscle lisse. De cette façon, l'acétylcholine avait pour effet d'induire une contraction. Un jour, la technicienne du laboratoire omit de retirer l'endothélium de l'aorte de lapin qui devait être étudiée, et l'acétylcholine provoqua une relaxation<sup>5</sup>. Il fut rapidement établi que la relaxation induite par l'acétylcholine était dépendante de l'endothélium. Elle était bloquée par l'atropine, suggérant que l'acétylcholine se liait à son récepteur muscarinique au niveau de la cellule endothéliale. L'hypothèse était que cette liaison induisait la production d'une substance inconnue qui pourrait diffuser vers le muscle

lisse vasculaire et induire une relaxation. Cette substance fut appelée EDRF (*Endothelium-Derived Relaxing Factor*), une abréviation aujourd'hui utilisée de façon plus générale.

### **À la découverte de l'EDRF**

La communauté scientifique fut rapidement intéressée à démystifier la nature réelle de l'EDRF. Il était connu que l'endothélium libérait plusieurs substances comme les prostaglandines et les kinines<sup>6,7</sup>. Il fut alors proposé qu'une prostaglandine vasodilatatrice comme la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) pourrait être un candidat potentiel. En effet, l'endothélium pourrait produire de la PGI<sub>2</sub>, laquelle diffuserait vers le muscle lisse sous-jacent pour induire la relaxation. Cependant, l'utilisation d'un inhibiteur de la production de PGI<sub>2</sub> ne changeait en rien la relaxation par l'EDRF<sup>8</sup>.

Dans les années 1980, plusieurs études furent réalisées afin de caractériser l'EDRF. À ce moment, plusieurs groupes étaient intéressés au rôle des nucléotides cycliques (AMPc, GMPc) dans la relaxation du muscle lisse vasculaire. Il était connu que les nitrovasodilatateurs comme le nitroprussiate de sodium et la trinitro-glycérine induisaient leur vasorelaxation par une augmentation de GMPc<sup>9</sup>. Il était également connu que le NO, libéré de manière spontanée de ces nitrovasodilatateurs, pouvait augmenter les niveaux de GMPc<sup>10</sup>. L'utilisation de différents inhibiteurs comme le bleu de méthylène, un inhibiteur de la guanylate cyclase soluble, et la méthémoglobine, un piègeur du NO, a aidé à identifier la nature de l'EDRF<sup>11</sup>. La courte demie vie de l'EDRF fut également déterminée. De plus, il fut établi que la demi-vie de l'EDRF pouvait être considérablement augmentée par l'ajout de superoxide dismutase, un métaboliseur des anions superoxides, indiquant que l'EDRF pouvait être inactivé par les radicaux libres<sup>11</sup>.

Toutes ces similarités entre les propriétés du NO et celles de l'EDRF furent enfin reconnues en 1986<sup>12</sup>. C'est en 1987 que deux laboratoires, les groupes de Ignarro et Moncada, publient les évidences que le NO est l'EDRF<sup>13,14</sup>.

### 2.1.1.2 La nature du NO

Le NO est un radical libre diatomique. Il est également le seul radical connu formé de façon endogène et reconnu aussi comme messenger de signalisation. Le NO est de faible réactivité comparativement à d'autres radicaux libres tels que le superoxide et le radical hydroxyl. De plus, il est un gaz grandement diffusible ayant, à 37°C, un coefficient de diffusion de 1.4 fois celui de l'oxygène<sup>15</sup>.

### La formation du NO

Le NO est formé par les enzymes NO synthases (NOS), qui transforment la L-arginine en L-citrulline et NO. Les NO synthases sont largement distribuées dans le corps humain et possèdent plusieurs fonctions physiologiques primordiales. Celles-ci comprennent la régulation de la pression sanguine, les fonctions sexuelles (l'érection et l'éjaculation) et la contribution au bon fonctionnement du système nerveux central ainsi qu'au système immunitaire<sup>16,17,18</sup>. Il existe trois isoformes de l'enzyme NO synthase : la NO synthase inductible (iNOS ou NOS II), la NO synthase neuronale (nNOS ou NOS I) et la NO synthase endothéliale (eNOS ou NOS III) (Table 1). En ce qui concerne le système cardiovasculaire, l'isoforme le plus important est la eNOS. Au niveau de la cellule endothéliale, la eNOS est liée aux calveolae qui sont liées à la membrane cellulaire. La formation d'un complexe entre les calveolae et la eNOS, garde cette dernière inactive. Toutefois, l'activation de la eNOS, ou la rupture du complexe, peut se faire suite à la liaison d'un agoniste (ACh) à son récepteur ou suite à une stimulation induite par les forces de cisaillement (*shear stress*)<sup>19</sup>. Ceci engendre une augmentation du calcium intracellulaire, qui active la eNOS.

**Table 1** : Caractéristiques des différents isoformes des NOS

	<b>nNOS, NOS I (constitutive)</b>	<b>iNOS, NOS II (inductible)</b>	<b>eNOS, NOS III (constitutive)</b>
Localisation	intestin, cerveau	macrophage	endothélium
Poids moléculaire	160 kDa	130 kDa	134 kDa
Dépendance au calcium et à la calmoduline	dépendant du calcium (70-100 nM)	indépendant du calcium	dépendant du calcium (70-100 nM)
Dépendance aux cofacteurs NADPH, FAD, FMN, BH <sub>4</sub>	oui	oui	oui
Production de NO	faible	forte	faible
Stimuli	Agoniste	lipopolysaccharide, interféron $\gamma$ , interleukine-1, TNF- $\alpha$	débit sanguin ( <i>shear stress</i> ), agonistes (ACh, BK)
Fonction	neurotransmission	immunomodulation	régulation de la pression sanguine

### Les mécanismes de la relaxation induite par le NO

Une fois le NO formé par la eNOS au niveau des cellules endothéliales, celui-ci diffuse vers le muscle lisse vasculaire et active la guanylate cyclase soluble (GCs). Ceci engendre la production d'un second messenger, la guanosine monophosphate cyclique (GMPc). L'activation de cette enzyme est dépendante de la liaison du NO à l'hème de la GCs afin d'induire la forme nitrosylée de l'hème. Ceci a pour conséquence de changer la conformation de l'hème et ainsi de permettre la liaison du GTP afin de produire le GMPc<sup>20</sup>. Suite à l'activation de la GCs, le GMPc est formé ce qui active des kinases dépendantes du GMPc (PKG). Par la suite, différentes protéines sont phosphorylées, résultant en une diminution de la concentration de calcium intracellulaire et en une relaxation<sup>21</sup> (Figure 1). Tout d'abord, certains canaux potassiques peuvent être phosphorylés, ce qui entraîne une sortie des ions potassiques hors de la cellule musculaire lisse et une hyperpolarisation. L'hyperpolarisation a

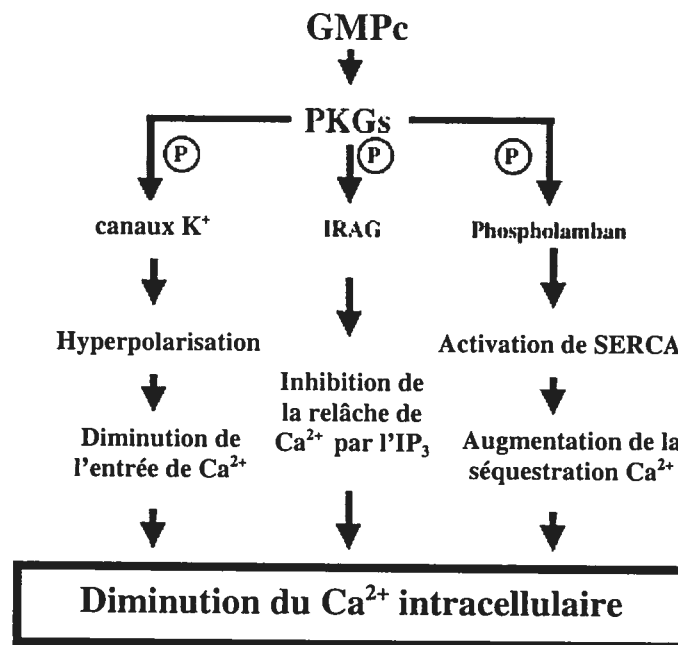


pour effet de réduire l'entrée de calcium dans la cellule musculaire lisse, provoquant une dilatation. Deuxièmement, la PKG peut phosphoryler l'*Inositol trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate* (IRAG) entraînant une inhibition de la relâche de calcium par l'*Inositol triphosphate* (IP<sub>3</sub>) et une relaxation. Finalement, la PKG peut phosphoryler le phospholamban situé au niveau du réticulum sarcoplasmique, ce qui permet l'activation de la pompe *Sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase* (SERCA) et l'augmentation du recaptage calcique dans le réticulum sarcoplasmique. Le calcium étant moins présent dans le cytoplasme, une dilatation s'en suit.

Dans certains lits vasculaires et dans certains modèles animaux, le NO peut directement induire une relaxation en activant des canaux potassiques dépendants du calcium situés sur le muscle lisse vasculaire<sup>22</sup>. L'activation de ces canaux provoque une hyperpolarisation et une relaxation subséquente. Cependant, il a été démontré que l'activation des **canaux potassiques dépendants de l'ATP** peut aussi induire une dilatation des vaisseaux sanguins. À ce jour, peu d'études d'ordre électrophysiologique ont été réalisées. Toutefois, les données pharmacologiques démontrent que ces canaux potassiques, composés de huit sous-unités, sont présents dans les artères et les artérioles de la plupart des espèces. Il est établi que le cromakalim, le levcromakalim, l'aprikalim, et le pinacidil induisent l'ouverture des canaux potassiques dépendants de l'ATP ainsi que la dilatation des vaisseaux sanguins. Cette dilatation est bloquée par l'utilisation de glibenclamide. Il a été démontré que ces canaux peuvent être présents au niveau de l'endothélium et du muscle lisse vasculaire. Lorsque les canaux potassiques dépendants de l'ATP sont situés sur l'endothélium vasculaire, ceux-ci participent à la dilatation en laissant sortir des ions potassiques favorisant un courant entrant d'ions calciques dans la cellule endothéliale. L'entrée de calcium permet l'activation de la NO synthase endothéliale pour former le NO. Cependant, lorsque les canaux potassiques dépendants de l'ATP situés sur le muscle lisse vasculaire sont impliqués, ceux-ci induisent également la dilatation par une hyperpolarisation. Toutefois, dans ce cas-ci l'activation des canaux est secondaire à la production de NO. Effectivement, lorsque le NO est généré celui-

ci diffuse vers le muscle lisse vasculaire et se lie à la GCs pour permettre la production de GMPc. Il existe deux possibilités d'activation des canaux situés sur le muscle lisse vasculaire. Le NO ou le GMPc peuvent activer les canaux potassiques dépendants de l'ATP sur le muscle lisse.

**Figure 1** : Les mécanismes de relaxation induite par le NO dépendants du GMP cyclique (d'après référence #21)



### 2.1.1.3 Les rôles du NO

#### Les effets vasodilatateurs du NO

La vasodilatation est l'effet le plus connu et documenté du NO dans le système cardiovasculaire. La production endogène du NO est responsable de la régulation de l'activité vasomotrice et de la pression sanguine locale. Plusieurs conditions caractérisées par une baisse de la biodisponibilité du NO sont associées à une augmentation de la synthèse d'endothéline-1, un puissant vasoconstricteur<sup>23</sup>. Des études pharmacologiques ont démontré que l'inhibition de la synthèse du NO endogène chez l'homme provoque une augmentation de la pression artérielle<sup>24</sup> et que

les souris *knockout* pour le gène de la eNOS développent de l'hypertension artérielle systémique<sup>25</sup>.

### **Les effets antiplaquettaires du NO**

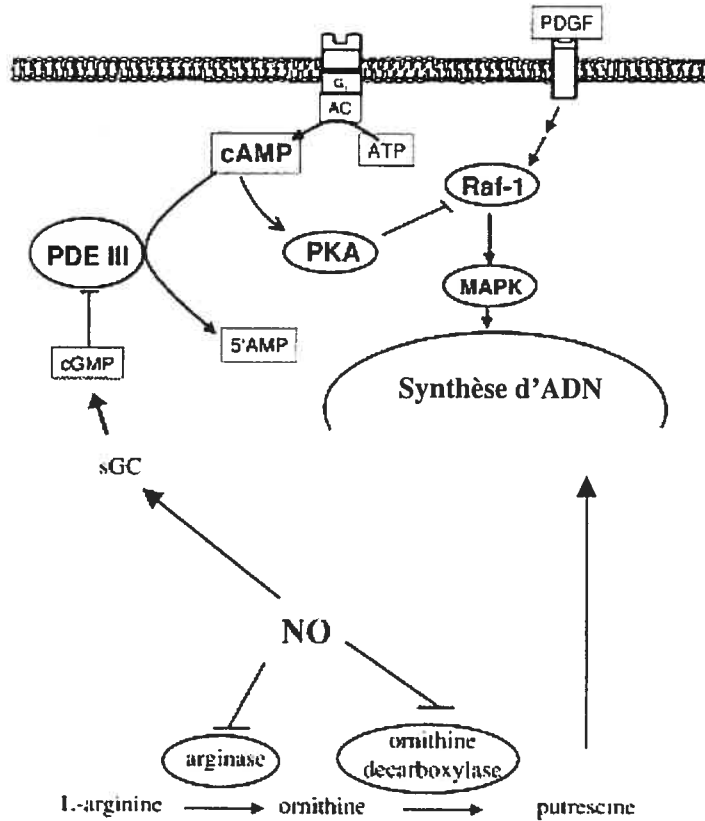
Les plaquettes exécutent un rôle important dans l'homéostasie vasculaire. L'agrégation plaquettaire et la formation de caillot homéostatique doivent être balancés afin de maintenir un débit sanguin adéquat et d'empêcher la formation de thrombi<sup>26</sup>. Le NO et les donneurs de NO (SNP) stimulent la production de GMPc dans les plaquettes humaines, provoquant l'activation d'une PKG et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire<sup>27,28</sup>. Il est connu que le NO induit son effet antiplaquettaire en diminuant la concentration de calcium dans les plaquettes<sup>29</sup>.

### **Les effets antiprolifératifs du NO**

Les maladies coronariennes<sup>30</sup> et la resténose<sup>31</sup> sont caractérisées par une augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses, ce qui diminue le calibre de la lumière des vaisseaux sanguins. Les cellules musculaires lisses qui ont proliférées subissent plusieurs changements comme la perte d'activité contractile, de myofibrilles et de protéines de la matrice. De plus, leur sensibilité aux facteurs de croissance (PDGF ; *Platelet-Derived Growth Factor*) est augmentée. Il fut démontré que le NO était capable d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses. Ceci est véridique pour le NO généré de manière endogène<sup>32</sup> et pour le NO provenant des donneurs de NO<sup>33</sup>, comme le nitroprussiate de sodium. Ceci contribue au fait que suite à une angioplastie, les souris *Knockout* pour le gène de la eNOS développent une hyperplasie intimale beaucoup plus prononcée que les souris de type sauvage<sup>34</sup>. Le mécanisme par lequel le NO induit son effet antiprolifératif n'est pas encore bien connu, plusieurs hypothèses sont proposées (Figure 2). Les effets antiprolifératifs du NO peuvent être dépendants ou indépendants de la formation de GMP cyclique. L'activation de la *cAMP-dependent protein kinase* (PKA) peut être induite par l'inhibition de la *cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase* (PDE III) par le GMP cyclique, qui a pour effet d'inhiber l'effet du PDGF sur la synthèse d'ADN *via* Raf-1

et les MAP kinases. Finalement, le NO inhibe directement la prolifération des cellules musculaires lisses en inhibant l'arginase et la décarboxylase ornithine qui sont responsables de la synthèse d'ADN.

**Figure 2 :** Les effets antiprolifératifs du NO (d'après référence #21)



**Les effets antiadhésifs du NO**

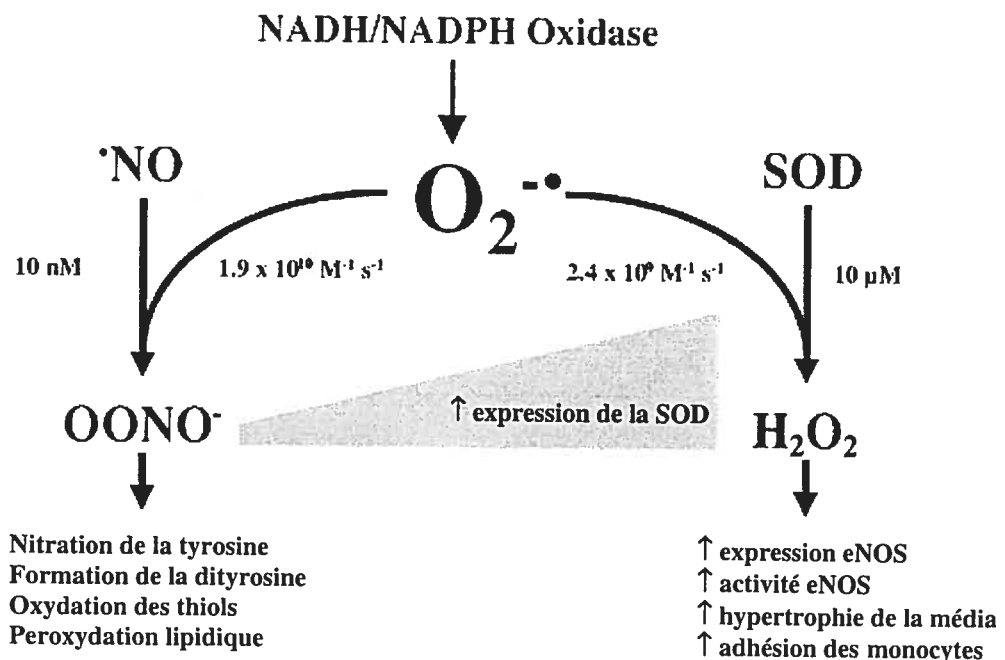
L'augmentation de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium est une caractéristique du développement de l'athérosclérose. L'adhésion des leucocytes est dépendante de l'expression des molécules d'adhésion (VCAM-1; *Vascular Cell Adhesion Molecule*, ICAM; *Intercellular Cell Adhesion Molecule*, MCP-1; *Monocyte chemoattractant Protein* et E-sélectine) à la surface des cellules endothéliales. L'extravasation des monocytes au travers de la paroi vasculaire est dommageable puisque ceux-ci augmentent les niveaux de stress oxydatif en relâchant de grandes quantités de radicaux libres<sup>30</sup>. Le NO est un médiateur endogène capable d'inhiber l'adhésion des leucocytes à l'endothélium<sup>35</sup>. Il fut démontré que les propriétés

antiadhésives du NO endogène sont attribuables à l'inhibition de l'expression des molécules d'adhésion et aux propriétés antioxydantes du NO ainsi qu'à l'inhibition de l'expression du NFκB<sup>36</sup>.

### Les effets antioxydants du NO

L'effet antioxydant le plus documenté du NO est que celui-ci empêche l'oxydation lipidique. En effet, le NO peut inhiber l'oxydation des acides gras, de la phosphatidylcholine et des lipoprotéines de faible densité (LDL). De plus, le NO peut réagir très rapidement avec le superoxyde pour former le peroxynitrite, qui est encore plus dommageable que le superoxyde lui-même. Cependant, la formation de peroxynitrite compétitionne avec la formation de peroxyde d'hydrogène, qui est catalysé par la superoxide dismutase (SOD) (Figure 3). Comme la concentration de SOD est beaucoup plus élevée que celle du NO, la formation de peroxynitrite est très faible<sup>37</sup>.

**Figure 3** : Les effets antioxydants du NO (d'après référence #21)



Il fut aussi démontré que le NO est un inducteur de la synthèse de la ferritine endothéliale<sup>38</sup>. La ferritine se lie aux ions libres du fer et ainsi réduit le dommage

cellulaire en prévenant la formation de superoxyde<sup>39</sup>. Finalement, le NO peut également induire l'activité de la superoxide dismutase extracellulaire (ecSOD)<sup>40</sup>, un antioxydant endogène.

### 2.1.2 Prostacycline (PGI<sub>2</sub>)

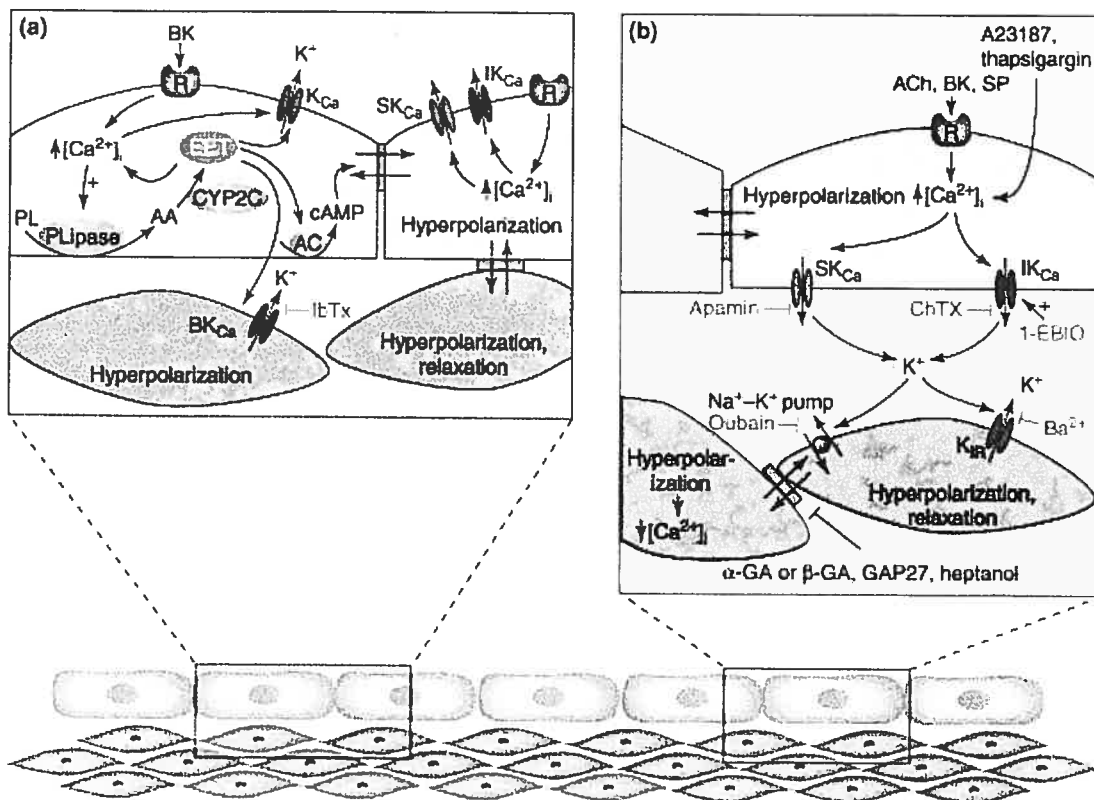
La prostacycline est le principal produit provenant du métabolisme de l'acide arachidonique (AA) dans l'endothélium. La prostacycline est un agent vasodilatateur, antithrombotique et antiplaquettaire. Son récepteur, l'IP, se situe sur le muscle lisse vasculaire. La prostacycline, un produit de la cyclooxygénase, est principalement formée au niveau de la cellule endothéliale, mais également dans la média et l'adventice en réponse aux forces de cisaillement, l'hypoxie et plusieurs médiateurs qui induisent également la relâche de NO. La prostacycline relaxe le muscle lisse en activant l'adénylate cyclase. Il s'en suit une augmentation des niveaux d'AMPc (3'-5'-adénosine monophosphate cyclique). Dans la plupart des lits vasculaires, l'effet de la prostacycline s'additionne à celui du NO. De plus, la prostacycline agit de manière synergique avec le NO pour inhiber l'agrégation plaquettaire<sup>41,42</sup>.

### 2.1.3 Facteur hyperpolarisant (EDHF)

Des études d'électrophysiologie ont démontré qu'il existe un facteur endothélial, distinct de la PGI<sub>2</sub> et du NO, capable d'induire une vasorelaxation: l'EDHF (*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*). Ce facteur diffusible produit une relaxation par un mécanisme d'hyperpolarisation<sup>43</sup>. La nature chimique de l'EDHF reste encore inconnue. Il a été démontré que les acides époxyeicosatriénoïques (EET) sont des produits dérivés de l'acide arachidonique provenant du métabolisme du cytochrome P450 ayant un rôle important dans la régulation de l'homéostasie vasculaire<sup>44</sup>. Effectivement, plusieurs groupes ont réussi à bloquer la relaxation dépendante de l'EDHF par des inhibiteurs du cytochrome P450 dans différents modèles expérimentaux: bovin<sup>45</sup>, porcine<sup>46</sup>, canine<sup>47</sup> et humaine<sup>48</sup>. L'EDHF pourrait également être un courant électrique qui se propagerait de

l'endothélium au muscle lisse vasculaire par l'intermédiaire de "gap junctions"(Figure 4 a)<sup>49</sup>. Une dernière hypothèse est que l'EDHF consiste en une accumulation d'ions potassiques au niveau de l'espace intercellulaire, entre les cellules endothéliales et musculaires lisses. Une légère augmentation de la concentration d'ions potassiques, induirait une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses en activant les canaux potassiques à courant entrant ( $K_{IR}$ ; *inward rectifier potassium channel*) et la pompe  $Na^+/K^+$  ATPase (Figure 4 b)<sup>50,51</sup>. Il est maintenant documenté que les réponses induites par l'EDHF mentionnées ci-dessus sont initiées par une augmentation du calcium intracellulaire endothélial et une activation subséquente des canaux  $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$ , provoquant une hyperpolarisation des cellules endothéliales<sup>52</sup>.

**Figure 4 :** Les mécanismes d'action possibles de l'EDHF (d'après référence #52)



Dans un seul type de vaisseau, les différents mécanismes de l'EDHF peuvent agir de façon exclusive, simultanée, séquentielle ou synergique. La contribution relative de différents mécanismes dépend de l'état d'activation du muscle lisse

vasculaire, de la densité des *gap junctions* et du niveau d'expression du P450 ainsi que des différents canaux ioniques. La contribution de l'EDHF à la relaxation varie en fonction du calibre de l'artère et est plus importante au niveau des artères de résistance<sup>53,54</sup>.

### 2.2 Facteurs contractants dérivés de l'endothélium

Il existe deux principaux facteurs vasocontractants dérivés de l'endothélium: l'endothéline et les métabolites de l'AA.

#### 2.2.1 L'endothéline

L'endothéline est un peptide de 21 acides aminés qui possède des propriétés vasoconstrictrices très puissantes. L'endothéline fut tout d'abord découverte comme étant uniquement un produit de l'endothélium<sup>55</sup>, mais il est maintenant connu que celle-ci est produite de façon ubiquitaire. L'endothéline-1 (ET-1), parmi les trois isoformes existants, est la principale forme d'endothéline produite par l'endothélium. L'ET-1 est relâchée par l'endothélium suite à différents types d'agents stimulants, comme l'hypoxie, l'angiotensine II, la vasopressine, la norépinéphrine, la bradykinine et le TGF $\beta$ -1. L'endothéline circulante dans le sang est de faible quantité puisque sa sécrétion semble principalement se faire du côté abluminal, c'est-à-dire en direction de l'intima et du muscle lisse vasculaire. Les récepteurs de l'endothéline sont les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub><sup>56,57</sup>. Le récepteur ET<sub>A</sub> se trouve sur les cellules musculaires lisses, d'autre part, le récepteur ET<sub>B</sub> est localisé sur les cellules musculaires lisses et endothéliales. La liaison de l'endothéline au récepteur ET<sub>B</sub> sur l'endothélium induit la libération de facteurs vasorelaxants, produisant ainsi la relaxation des vaisseaux sanguins. Cependant, comme l'endothéline possède une affinité plus grande pour les récepteurs situés sur le muscle lisse vasculaire, une vasoconstriction est habituellement induite<sup>58</sup>.



## INTRODUCTION

---

Il existe d'autres isoformes de l'endothéline, moins présents toutefois au niveau des vaisseaux sanguins. Leurs noms, caractéristiques et sites de production sont décrits dans le tableau suivant (Table 2).

**Table 2** : Caractéristiques des différents isoformes de l'endothéline

	ET-1	ET-2	ET-3
Localisation	endothélium, cerveau, rein, poumon, cœur (myocyte)	intestin, rein, glande surrénale	intestin, glande surrénale, cerveau
Chromosome	chromosome 6	chromosome 1	chromosome 20
Structure primaire	21 acides aminés	21 acides aminés	21 acides aminés

### 2.2.2. Les métabolites de l'acide arachidonique

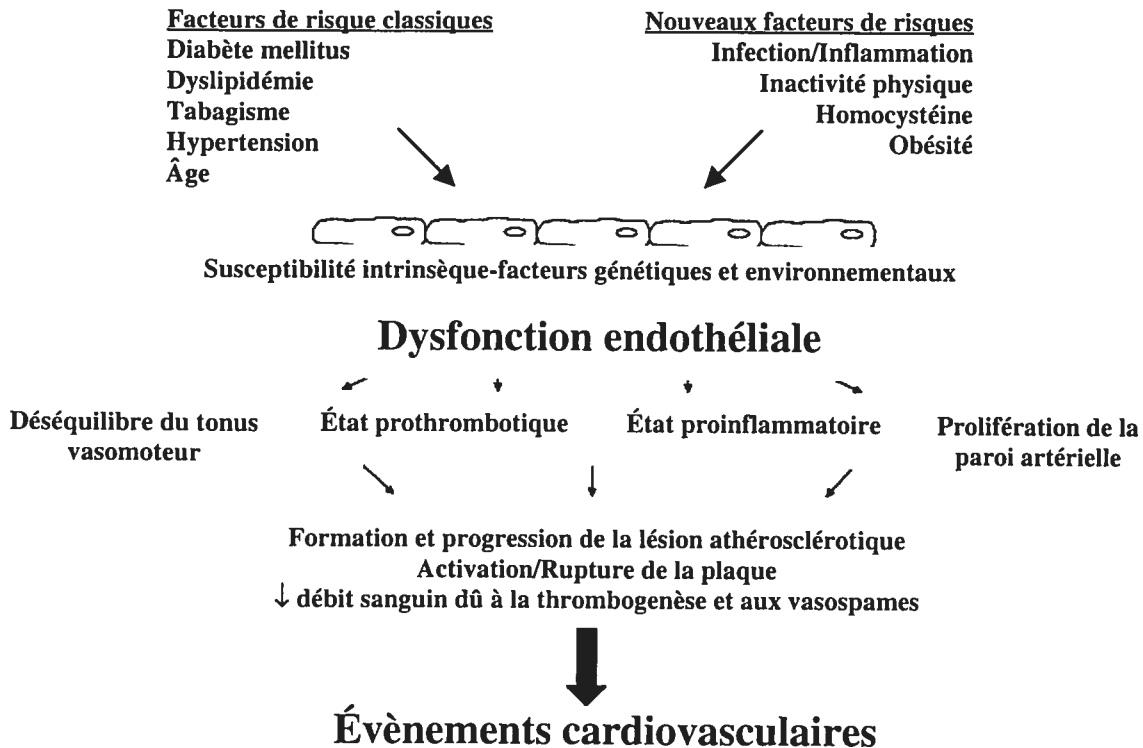
Un deuxième groupe de facteurs vasocontractants dérivés de l'endothélium provient du métabolisme de l'AA par la cyclooxygénase<sup>59</sup>. Ces facteurs comprennent la thromboxane A<sub>2</sub> et la prostaglandine H<sub>2</sub>. De plus, l'activité de la cyclooxygénase est une source d'anions superoxyde, qui peuvent induire une vasocontraction directement ou indirectement en inactivant le NO<sup>60</sup>.

## 3. La dysfonction endothéliale

En condition basale, l'endothélium consiste en une barrière relativement imperméable, qui relâche des substances vasoactives afin de maintenir une surface nonthrombogène, de réguler le tonus myogénique, de contrôler la réponse inflammatoire ainsi que pour inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses<sup>61</sup>.

En condition pathologique, des dommages physiques et biochimiques à l'endothélium peuvent survenir et ainsi altérer la production des médiateurs associés à un endothélium sain, comme le NO, résultant en une augmentation de la formation de thrombi, un tonus vasculaire altéré et une croissance des cellules musculaires lisses accrue. En effet, un événement caractéristique de l'apparition d'une dysfonction endothéliale est la diminution des niveaux de NO biodisponible. Ceci peut être dû à une diminution de la synthèse de NO ou à une augmentation de l'inactivation du NO par une augmentation des radicaux libres présents localement. Plusieurs facteurs de risque sont associés à une dysfonction endothéliale, on y retrouve l'hypercholestérolémie, le diabète, l'hyperhomocystéinémie et le tabagisme<sup>62</sup>. Tous ces facteurs de risque sont associés à une biodisponibilité diminuée du NO, démontrée par une réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine amoindrie (Figure 5)<sup>63</sup>.

**Figure 5** : La dysfonction endothéliale (d'après référence #62)



De plus, la dysfonction endothéliale est associée à une augmentation du stress oxydant induit par une élévation de la production de radicaux libres, en présence d'une faible activité antioxydante. Il existe plusieurs sources de radicaux libres : l'oxydase NAD(P)H, la xanthine oxydase et les NOS. La formation de peroxy-nitrite par le NO et les anions superoxydes produits par ces enzymes, inhibent les effets du NO (voir section 2.1.1.3).

La dysfonction endothéliale peut apparaître à plusieurs niveaux dans la cellule. En effet, les réponses peuvent être modifiées suite à un changement d'expression des récepteurs endothéliaux, une altération des voies de signalisation (protéine G, second messenger), une altération dans l'activité ou l'expression des enzymes responsables de la génération des médiateurs endothéliaux (NO synthase, enzyme de conversion de l'endothéline) ainsi qu'une altération de la réponse des cellules cibles (cellules musculaires lisses) suite à une stimulation par les médiateurs endothéliaux<sup>64</sup>.

### 3.1 Méthodes d'évaluation de la fonction endothéliale

Il existe plusieurs méthodes pour évaluer la fonction endothéliale que ce soit dans des modèles animaux ou chez des humains. Chez les animaux comme chez les humains, la fonction endothéliale peut être évaluée *in vitro* ou *in vivo*. Les dispositifs les plus souvent utilisés *in vitro* sont le myographe ou l'artériographe (voir section 7). Cependant, plusieurs méthodes *in vivo* ont été développées afin d'évaluer l'intégrité de la fonction de l'endothélium chez des patients souffrant de maladies cardiovasculaires.

Les premières études réalisées *in vivo* utilisaient l'angiographie quantitative coronarienne afin d'examiner les réponses vasomotrices des artères coronaires épiscopardiques suite à une infusion d'acétylcholine<sup>65</sup> ou à une augmentation du débit sanguin<sup>66</sup>.

Les méthodes dites invasives réalisées au niveau du bras comprennent l'infusion d'agonistes dépendants de l'endothélium dans l'artère brachiale et la mesure des réponses vasodilatatrices des vaisseaux de résistance en utilisant la pléthysmographie d'occlusion veineuse<sup>67</sup>. Ce type de procédure est intéressant puisqu'il permet d'établir des relations dose-réponse et d'utiliser des agonistes et des antagonistes spécifiques.

Il existe également plusieurs méthodes dites non-invasives. Celles-ci comprennent les mesures de la rigidité de la paroi artérielle, incluant la mesure de la vitesse de l'onde de pouls<sup>68</sup>. Plusieurs études restent à être réalisées afin de déterminer s'il existe véritablement une relation directe entre la rigidité de la paroi artérielle et l'état de la fonction endothéliale. Finalement, il est également possible d'évaluer la fonction endothéliale de manière non-invasive en examinant la dilatation dépendante de l'endothélium induite par le débit sanguin (FMD ; *Flow-Mediated Dilatation*) de l'artère brachiale à l'aide d'ultrasons<sup>69</sup>.

### **3.2 Les interventions pour renverser la dysfonction endothéliale**

Puisque la dysfonction endothéliale contribue à la pathogenèse des maladies cardiovasculaires, différentes approches pharmacologiques ou visant à modifier les habitudes de vie ont été élaborées afin de prévenir ou de renverser la dysfonction endothéliale et ainsi réduire les risques de développer de telles pathologies.

#### **3.2.1 L'exercice**

L'exercice physique permet de réduire le risque cardiovasculaire<sup>70</sup>. L'exercice fut démontré comme pouvant améliorer la fonction endothéliale chez des patients sains<sup>71</sup>, souffrant d'hypertension<sup>72</sup>, de défaillance cardiaque<sup>73</sup> ou de maladies coronariennes<sup>74</sup>. À l'opposé, un mode de vie sédentaire favorise l'obésité qui est associée au développement de la dysfonction endothéliale, à l'augmentation du stress oxydant et à une augmentation de l'expression de plusieurs marqueurs d'inflammation (ICAM-1, VCAM-1, IL-6 et TNF $\alpha$ ).

### 3.2.2 Diète faible en gras

Une seconde approche concerne une alimentation faible en gras et riche en fruits et légumes. Il semblerait que les effets bénéfiques d'une telle diète proviendraient de l'apport en flavanoïdes (effet anti-oxydant), qui seraient responsables de l'amélioration de la fonction endothéliale<sup>75</sup>. En revanche, de mauvaises habitudes alimentaires détériorent la fonction endothéliale. Plusieurs études suggèrent qu'une diète riche en matières grasses diminue la dilatation induite par le débit sanguin<sup>76</sup>. Cependant, le type de gras consommé est aussi important à considérer : par exemple, une diète riche en oméga-3 (huile de poisson) améliore la fonction endothéliale<sup>77</sup>.

### 3.2.3 Les antioxydants

La thérapie par les antioxydants a été aussi étudiée. Le stress oxydatif est en effet la principale cause de développement de la dysfonction endothéliale dans l'athérosclérose<sup>78</sup>. Des études ont été réalisées avec le probucol et la lovastatine, un antioxydant liposoluble et un inhibiteur de la HMGCoA, et révélé que cette double thérapie améliorerait la fonction endothéliale des patients souffrant de maladies coronariennes<sup>79</sup>. Cependant, les résultats concernant la vitamine E comme antioxydant sont controversés. Certaines études ont démontré que la vitamine E pouvait améliorer la fonction endothéliale<sup>80</sup> tandis que d'autres n'ont démontré aucun effet bénéfique<sup>81,82</sup>. La vitamine C (acide ascorbique), un antioxydant hydrosoluble, fut démontré efficace dans l'amélioration de la fonction endothéliale des patients atteints de maladies coronariennes. En effet, il est documenté qu'un faible niveau de vitamine C dans le plasma ou une diète faible en vitamine C augmentent les risques cardiovasculaires. Pour ajouter à la controverse, des études utilisant en combinaison, la vitamine C, la vitamine E et la bêta-carotène n'ont démontré aucun effet bénéfique<sup>83,84</sup>. Finalement, les antioxydants énumérés ci-dessus agissent tous par le même mécanisme, soit en piégeant les radicaux libres. Ainsi, une stratégie intéressante et plus efficace serait d'agir directement au niveau des enzymes

(NADPH oxidase, xanthine oxidase, NO synthase) responsables de la génération des radicaux libres.

### **3.2.4 Les statines : thérapie par la réduction des lipides**

Une autre approche courante est l'utilisation des statines, qui sont des inhibiteurs de l'enzyme réductase de l'HMGCoA, afin de réduire les niveaux de cholestérol. L'utilisation des statines dans plusieurs études a permis de réduire les risques cardiovasculaires<sup>85</sup> et de renverser la dysfonction endothéliale<sup>86,87,88</sup>. Les statines peuvent induire la régression des lésions athérosclérotiques, cependant leur rôle serait plus important au niveau de l'endothélium, de l'inflammation et de la composition des plaques<sup>89</sup>. Malgré le fait que les statines améliorent la fonction endothéliale principalement en réduisant les niveaux de cholestérol sanguin, des études *in vitro* ont démontré que les statines pouvaient induire plusieurs autres effets. Ainsi outre la réduction des niveaux de cholestérol, l'inhibition de l'enzyme réductase HMGCoA réduit les concentrations cellulaires d'intermédiaires biologiques actifs qui influencent le phénotype endothélial. Par ce mécanisme, les statines induisent directement l'expression, l'état de phosphorylation et l'activité de la NO synthase endothéliale<sup>90,91</sup>. De plus, la protéine réactive C réduit l'expression de la NO synthase<sup>92</sup>, suggérant que les statines peuvent protéger de manière spécifique contre les effets néfastes de l'inflammation sur l'arbre vasculaire en réduisant les niveaux de protéine réactive C.

### **3.2.5 Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ANG II) et les bloqueurs des récepteurs à l'ANG II**

L'utilisation des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II et les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II sont aussi populaires. En effet, des études cliniques de grande envergure ont clairement démontré que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'ANG II (*ACE inhibitors*) réduisent l'apparition des maladies cardiovasculaires chez les patients souffrant de maladies coronariennes et de diabète indépendamment de la réduction de la pression sanguine<sup>93</sup>. De plus, il a été démontré que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'ANG II amélioreraient la

fonction endothéliale<sup>94,95,96</sup>. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'ANG II augmentent la libération et les effets du NO provenant de l'endothélium vasculaire par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes. Par exemple, puisque l'ANG II augmente l'activité de la NADP oxydase (forme réduite)<sup>97</sup>, ceci amplifie la production de radicaux libres conduisant à l'inactivation du NO : les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'ANG II augmentent ainsi la biodisponibilité et les effets du NO. De plus, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'ANG II inhibent la dégradation de la bradykinine, une substance qui induit la production du NO. Finalement, il a été démontré que les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine amélioreraient également la fonction endothéliale et réduisaient l'expression des marqueurs endothéliaux d'inflammation (MCP-1 ; *Monocyte Chemoattractant protein-1*, ICAM-1; *Intercellular Adhesion Molecule-1*, TNF- $\alpha$  ; *Tumor necrosis factor*) et de stress oxydant (diminution des radicaux libres, augmentation de la SOD ; *Superoxide Dismutase*)<sup>98,99</sup>.

### 3.2.6 Traitement aux estrogènes

Les études chez les femmes post-ménopausées ont démontré que l'hormonothérapie par l'estrogène améliorait la dilatation dépendante de l'endothélium et réduisait les niveaux systémiques du *plasminogen activator inhibitor-1*<sup>100</sup>. Cependant, les effets des estrogènes sur la fonction endothéliale de patients souffrant de maladies cardiovasculaires sont moins bien connus. En fait, les études suggèrent que les estrogènes sont plus bénéfiques chez les femmes n'ayant aucune maladie cardiovasculaire<sup>101</sup>. Malgré les effets bénéfiques des estrogènes sur la fonction endothéliale, les études n'ont pu démontrer d'effets bénéfiques d'une thérapie combinant l'estrogène et la progestérone pour la prévention d'évènements cardiovasculaires<sup>102,103</sup>. Les explications précises de ces résultats sont incertaines. L'estrogène et la progestérone ont des effets cellulaires complexes et il serait possible que des effets pro-thrombotiques surpassent les effets bénéfiques sur la fonction endothéliale. De plus, il est possible que dans plusieurs cas les bienfaits de l'estrogène aient pu être confondus avec ceux de la thérapie à la progestérone

concomitante. Tous ces résultats démontrent bien que toutes les thérapies améliorant la fonction endothéliale ne réduisent pas implicitement les risques cardiovasculaires.

Quelques nouvelles thérapies sont proposées pour améliorer la fonction endothéliale. Tout d'abord, la L-arginine, le précurseur de la synthèse du NO, administrée chez des humains améliore la dilatation dépendante de l'endothélium<sup>104,105</sup>. Un supplément de tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), un co-facteur essentiel au bon fonctionnement de la NO synthase endothéliale, est également un nouvelle thérapie capable d'améliorer la fonction endothéliale<sup>106</sup>. Finalement, l'inhibition de la protéine kinase C et de la cyclooxygénase-2 (forme inductible) sont deux autres avenues intéressantes afin d'améliorer la fonction endothéliale<sup>107,108</sup>.

### 4. Les pathologies cardiovasculaires

Plusieurs facteurs de risques et pathologies cardiovasculaires sont associés à des altérations de l'endothélium vasculaire, c'est-à-dire, à une dysfonction endothéliale. Il est connu que la sévérité de la dysfonction endothéliale prédit le risque de développer une maladie cardiovasculaire. Plusieurs méthodes sont maintenant utilisées afin de réduire les facteurs de risque (section 3.2) en améliorant la condition de la fonction endothéliale.

Un grand nombre de maladies cardiovasculaires sont associées à une dysfonction endothéliale. Parmi celles-ci on retrouve la défaillance cardiaque, associée chez l'homme à une diminution de la production de NO au niveau des microvaisseaux du cœur<sup>109</sup> et des vaisseaux de l'avant bras<sup>110</sup>. Dans un modèle canin de défaillance cardiaque, les artérioles et les artères coronaires présentaient une diminution de la dilatation dépendante de l'endothélium à l'acétylcholine<sup>111</sup>.

L'athérosclérose (caractérisée par l'apparition de lésions macroscopiques sur les parois internes des vaisseaux) est également associée à une dysfonction de



l'endothélium vasculaire. L'athérosclérose affecte de manière hétérogène l'endothélium. En effet, l'athérosclérose ne se développe que dans les artères de gros calibre comme les artères coronaires, iliaques, rénales, mésentériques, les carotides et l'aorte. L'athérosclérose affecte non seulement la fonction de l'endothélium, mais également induit des changements morphologiques des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales, dont la surface devient supérieure à  $800 \mu\text{m}^2$ , développe avec l'évolution de la maladie plusieurs noyaux supplémentaires<sup>112</sup>. Plusieurs modifications reliées aux facteurs vasorelaxants dépendants de l'endothélium facilitent le développement des lésions athérosclérotiques. En effet, il existe une relation directement proportionnelle entre le degré d'athérosclérose et l'augmentation de l'activité chemoattractive pour les lymphocytes<sup>113</sup> ainsi que de la sécrétion d'endothéline<sup>114</sup>. Par ailleurs, une diminution de la formation de prostacycline dans les cellules humaines présentes au niveau des lésions athérosclérotiques est également observée<sup>115</sup>.

L'hypertension artérielle systémique affecte également la fonction endothéliale et la sévérité de la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension est proportionnelle au degré d'élévation de la pression sanguine<sup>116</sup>. En effet, la normalisation de la pression sanguine chez le rat, restaure la fonction endothéliale en huit semaines. Par ailleurs, la dilatation induite par l'acétylcholine est réduite au niveau de l'avant-bras chez les patients hypertendus. Cependant, la dilatation peut être partiellement rétablie en utilisant l'indométhacine, un inhibiteur de la production des prostanoïdes endogènes<sup>117,118</sup>. Donc, chez les patients hypertendus, l'augmentation des prostaglandines vasoconstrictrices réduirait les effets vasodilatateurs induits par l'acétylcholine. Toutefois, il n'est pas vraiment clair si l'endothélium vasculaire est réellement atteint aux stades précoces de l'hypertension<sup>119</sup> car plusieurs études suggèrent que la dysfonction endothéliale est une conséquence plutôt qu'une cause de l'hypertension.

### 4.1 L'hypertrophie ventriculaire gauche

L'hypertension artérielle systémique est un facteur de risque pour plusieurs maladies cardiovasculaires et est responsable d'environ 50% de la mortalité et de la morbidité associée aux maladies cardiovasculaires dans le monde<sup>120</sup>. L'hypertension artérielle systémique est la principale cause du développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG). L'HVG peut être induite par une surcharge de volume, une sténose aortique (surcharge de pression), l'hypertension essentielle ou encore par une coarctation de l'aorte (maladie congénitale qui consiste en une réduction du diamètre d'un court segment de l'aorte résultant en une augmentation de la pression artérielle dans la partie supérieure du corps).

Il existe deux principaux types d'hypertrophie : l'hypertrophie induite par une surcharge de volume ou de pression. Lors d'une surcharge volémique, le ventricule compense en modifiant la géométrie du ventricule et en augmentant le nombre de sarcomères en série provoquant ainsi une augmentation du volume d'éjection. Lors de la phase compensatrice, le ventricule se dilate et s'hypertrophie afin d'augmenter la performance cardiaque, pour maintenir une fonction normale. Cependant, en présence d'une surcharge de volume importante ou de longue durée, il survient une défaillance cardiaque avec une diminution rapide de la contractilité myocardique.

Lors d'une surcharge de pression, immédiatement suite à l'imposition de la charge de pression, le ventricule gauche travaille plus qu'il ne devrait pour une même masse cardiaque. Ainsi, le cœur travaillant davantage, il se dilate. Par la suite, une hypertrophie se développe. Lors de la phase compensatrice, la fonction contractile revient à un niveau normal. Ensuite, le diamètre des myocytes augmente et des altérations dans l'organisation cellulaire apparaissent. Les myofibrilles se lysent, le nombre de lysosomes augmente, le réticulum sarcoplasmique est dysfonctionnel et les cellules musculaires cardiaques sont remplacées par du tissu fibreux. La densité des capillaires et la réserve coronarienne diminuent ce qui induit une ischémie du myocarde, qui est plus sévère au niveau du sous-endocarde. Ces événements contribuent à l'altération de la fonction cardiaque.

Il existe d'autres types d'HVG. Par exemple, une forme différente d'HVG est présente chez les athlètes. Cependant, ce type d'hypertrophie est dite physiologique et n'est dommageable qu'en présence de pathologies associées. L'hypertrophie physiologique est caractérisée par des cardiomyocytes plus longs, ce qui entraîne une hypertrophie eccentric (l'épaisseur de la paroi reste la même et le volume de la chambre cardiaque augmente). Comme l'intégrité des cardiomyocytes reste intacte (réserve de Starling) et que le volume du ventricule augmente, le volume d'éjection est plus grand chez les athlètes (plus grande performance). De plus, il existe une angiogenèse plus importante dans l'hypertrophie physiologique, permettant une meilleure perfusion du muscle cardiaque.

Une hypertrophie peut également survenir suite à un infarctus du myocarde. En effet, suite à un infarctus les myocytes s'hypertrophient en augmentant leur diamètre (surcharge de pression) et leur longueur (surcharge de volume).

Tel que décrit, l'HVG est la principale adaptation morphologique du cœur en réponse à une augmentation de la post-charge. L'HVG, plus souvent induite par une surcharge de pression, est associée à plusieurs changements hémodynamiques, cellulaires et ultra-structuraux, dont une réserve coronarienne vasculaire anormale<sup>121,122</sup>, une perfusion du sous-endocarde déficiente et une apparition de fibrose<sup>123,124</sup>. L'HVG est également liée à des anomalies dans la plupart des organelles cytoplasmiques<sup>125</sup>, ainsi qu'à des changements de la composition cellulaire<sup>126</sup>. Le réticulum endoplasmique devient dysfonctionnel, le nombre de récepteurs à l'angiotensine II est augmenté, les mécanismes d'apoptose sont enclenchés, le collagène est augmenté et sa dégradation est diminuée.

De plus, l'hypertrophie ventriculaire primaire (cardiomyopathie hypertrophique) ou secondaire à l'hypertension artérielle ou à une sténose aortique sont associées à une réserve coronaire vasodilatatrice diminuée liée à une dysfonction endothéliale microvasculaire.

Les patients hypertendus présentant une hypertrophie ventriculaire gauche possèdent dix fois plus de chance de développer une défaillance cardiaque que les patients hypertendus sans HVG<sup>127</sup>. L'HVG est donc un facteur de risque important dans la genèse des pathologies cardiovasculaires.

Les mécanismes menant à l'HVG suite à une surcharge de pression sont maintenant bien connus. Toutefois, les mécanismes impliqués dans la transition de l'hypertrophie cardiaque vers la défaillance cardiaque sont encore nébuleux. Dans la première phase de l'hypertrophie, l'épaisseur des parois du ventricule augmente due à l'hypertrophie des myocytes par un alignement parallèle des sarcomères. Cependant, le diamètre du ventricule gauche en fin de diastole reste le même et est même parfois réduit<sup>128</sup>. Ceci augmente donc le rapport épaisseur (E) de la paroi du ventricule sur le rayon de la chambre cardiaque (R)  $(E/R)^{125}$ . En plus de l'accroissement des myocytes cardiaques, l'HVG est caractérisée par une activation des fibroblastes cardiaques, des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales. En effet, le niveau de croissance ainsi que le degré du métabolisme des cellules non myocytaires indiquent la présence d'HVG pathologique<sup>129</sup>.

L'interstitium est également altéré lors du développement de l'HVG. Le collagène au niveau du myocarde augmente dû à l'activation des fibroblastes interstitiels. Cette accumulation de fibrose altère les propriétés élastiques passives du myocarde et la capacité vasodilatatrice des artères intramyocardiques ainsi que la fonction systolique (à un stade plus avancé)<sup>125</sup>. Les mécanismes responsables de l'accumulation de collagène induisant l'apparition de fibrose ne sont pas bien connus. La prolifération des fibroblastes responsables de la génération du collagène, l'augmentation de l'activité des fibroblastes locaux et une activité collagénase réduite pourraient être responsables de l'accumulation de fibrose au niveau du myocarde<sup>130</sup>. L'hypoxie représenterait un autre stimulus susceptible de conduire à l'HVG et à l'apparition de fibrose<sup>131,132</sup>.

## 5. La circulation coronarienne

La circulation coronarienne est composée de vaisseaux de gros et de petit calibre. Les gros vaisseaux sont dits de « conductance » et incluent les artères coronaires épicaudiques, soient l'artère circonflexe, l'artère interventriculaire antérieure et l'artère coronaire droite. Les vaisseaux de petit calibre constituent la microcirculation. Il existe un système de classification des microvaisseaux, qui est élaboré dans la section suivante.

### 5.1 La microcirculation coronarienne

#### 5.1.1 Définition et classification des microvaisseaux

La microcirculation est composée de plusieurs types de segments dont les artérioles, les petites artères et les veinules. À cause de cette hétérogénéité, il est parfois difficile d'identifier quel type de segments est étudié. La transition d'une artère à une artériole est graduelle sans qu'aucune démarcation précise n'existe entre les deux types. Une classification précise basée sur le diamètre des vaisseaux est donc requise afin de pouvoir s'assurer d'une uniformité dans les études réalisées afin de pouvoir comparer les données. Ainsi, les « microvaisseaux » sont définis généralement comme ceux de calibre inférieur à 300 µm de diamètre interne. Les microvaisseaux en amont des capillaires (composés uniquement de cellules endothéliales) sont appelés « microvaisseaux artériels » alors que ceux originaires des capillaires sont appelés « microvaisseaux veineux » ou « veinule »<sup>133</sup>. Les microvaisseaux artériels sont formés de trois couches. La couche qui compose la surface luminale du vaisseau est l'intima. La couche suivante est la média composée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses disposées de façon circonférentielle. Finalement, la dernière couche est l'adventice, composée d'éléments fibreux et de fibroblastes. Malgré le fait que les microvaisseaux artériels possèdent tous la même composition générale, il existe des différences physiologiques et pharmacologiques majeures entre les microvaisseaux artériels de

calibre supérieur ou inférieur à 100-150  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, il est donc important de faire la distinction entre ces deux sous-types de microvaisseaux. Les microvaisseaux artériels inférieurs à 100-150  $\mu\text{m}$  de diamètre interne sont appelés « artérioles » et possèdent une à quatre couches de cellules musculaires lisses. Par contre, les microvaisseaux artériels supérieurs à 100-150  $\mu\text{m}$  de diamètre interne sont appelés « petites artères ou artères musculaires » et possèdent quatre à six couches de cellules musculaires lisses<sup>131</sup>.

Une autre classification des microvaisseaux est basée sur les caractéristiques transmurales. Ils peuvent être identifiés selon leur localisation au niveau du sous-endocarde ou en sous-épocardique. Les premiers deux tiers du myocarde (sous-épicode) sont perfusés par des artères provenant des artères de conductance épocardiques. Le dernier tiers du myocarde en sous-endocarde est perfusé par des artères épocardiques, pénétrant complètement les deux premiers tiers du myocarde pour perfuser uniquement le sous-endocarde<sup>134</sup> et desquelles de petites branches émergent pour former un plexus artériel sous-endocardique.

### **5.1.2 Rôle de la microcirculation**

La microcirculation, qui comprend les artérioles et les petites artères, est responsable de la régulation du débit sanguin par des changements locaux de tonus vasculaire. En effet, le débit sanguin est déterminé par plusieurs facteurs dont des facteurs intrinsèques à la paroi vasculaire, des facteurs métaboliques locaux et des facteurs neurohumoraux.

#### **5.1.2.1 Réponses aux forces physiques**

La paroi vasculaire des vaisseaux sanguins se voit constamment imposée deux types de forces physiques. La première est une force perpendiculaire qui provient de la pression sanguine. Cette force étire la paroi des vaisseaux dans le sens de la largeur. La deuxième force provient du débit sanguin et est appelée « force de cisaillement » (*shear stress*). Les vaisseaux possèdent des moyens intrinsèques pour

contrôler et maintenir l'homéostasie locale face aux stress que ces forces exercent. Deux types principaux de contrôle existent : la réponse myogénique et la dilatation induite par le débit. Le système de contrôle par le tonus myogénique est enclenché par des changements de pression sanguine. Suite à une augmentation de la pression intraluminale, le vaisseau répond en se contractant afin de normaliser la tension dans la paroi et *vice versa*. Le contrôle par la dilatation induite par le débit fonctionne de façon à ce que le diamètre du vaisseau change afin que les forces de cisaillement (déterminées par la vitesse du débit à une viscosité sanguine constante) soient maintenues constantes.

### **Le tonus myogénique**

Le contrôle myogénique est principalement indépendant de l'endothélium<sup>135</sup> et semble jouer un rôle critique dans la détermination du tonus basal et dans le maintien à un niveau physiologique de la pression intraluminale des vaisseaux situés en aval<sup>136</sup>. La contraction en réponse à une augmentation de la pression intraluminale induit une réduction de la tension au niveau de la paroi et protège ainsi les microvaisseaux contre des dommages vasculaires aigus. D'autre part, la dilatation en réponse à une diminution de la pression sanguine empêche les vaisseaux de s'effondrer.

Il a été démontré que l'amplitude de la réponse myogénique était dépendante de la grosseur du vaisseau, puisqu'une réponse myogénique est observée dans des artérioles coronaires de porc de moins de 100  $\mu\text{m}$ <sup>137</sup>, mais pas dans celles dont le diamètre dépassait 150  $\mu\text{m}$ <sup>138</sup>. La réponse myogénique est maximale dans les artérioles intermédiaires de 50-80  $\mu\text{m}$ <sup>139</sup>. Ces observations indiquent que les artérioles intermédiaires sont les principales responsables de la régulation de la pression des vaisseaux en aval (site où se font les échanges).

En plus de varier en fonction de la taille des vaisseaux, le tonus myogénique est également influencé par les propriétés transmurales des artérioles coronaires. La réponse myogénique est plus importante dans les microvaisseaux sous-épicaux que sous-endocardiaux. Ceci peut s'expliquer par des différences dans la nature

biochimique des cellules musculaires lisses de chacun des types de microvaisseaux. Ces différences transmuraux pourraient également expliquer la résistance relative du sous-épicaide à l'ischémie induite par une réduction de la pression de perfusion. Cette protection serait due à une réponse myogénique plus grande et à une réserve dilatatrice plus importante<sup>140</sup>.

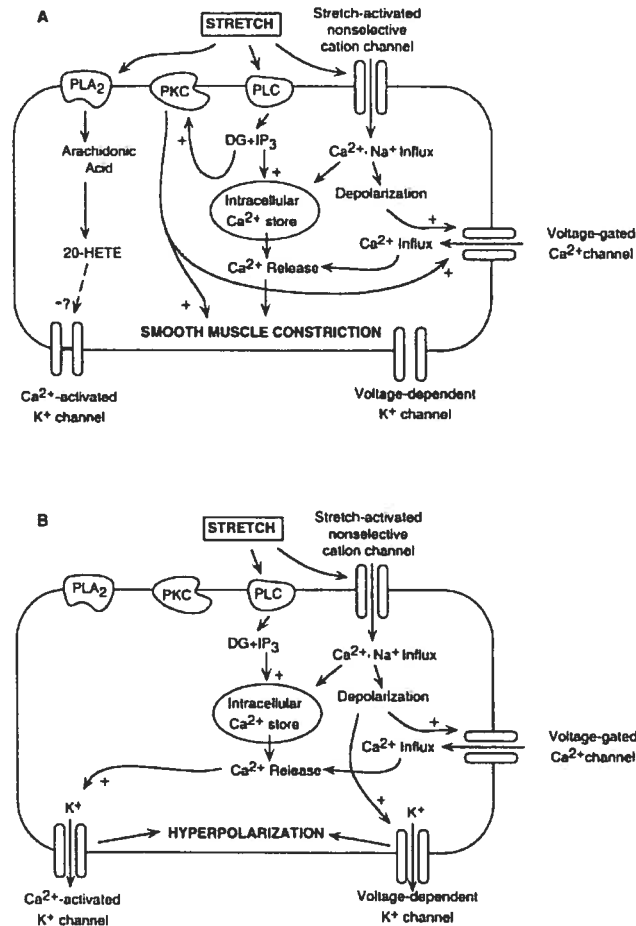
Le mécanisme d'action du tonus myogénique est encore incertain. Toutefois, un mécanisme de contraction et un mécanisme de compensation ont été suggérés (Figure 6). Des mesures du calcium intracellulaire dans les artéioles ont démontré qu'une augmentation soutenue du calcium intracellulaire était responsable de la réponse myogénique<sup>141</sup> et que la dépolarisation des cellules musculaires lisses et l'entrée subséquente de calcium par des canaux calciques dépendant du voltage jouaient un rôle important dans cette réponse<sup>142</sup>. Le fait que les petites artéioles possèdent un tonus myogénique plus grand que les artères de plus gros calibre pourrait s'expliquer par la densité du courant calcique de type L inversement proportionnelle au diamètre du vaisseau<sup>143</sup>.

Les protéines responsables de la détection de la pression intravasculaire (stimulus) ne sont pas connues. Cependant, un **canal cationique non-sélectif** sensible à l'étirement a été identifié dans les cellules musculaires lisses des artères coronaires<sup>144</sup>. Ce canal induit une dépolarisation qui permet l'entrée massive de calcium dans la cellule pour induire la réponse myogénique. La **phospholipase C** (PLC) est un autre candidat potentiel de la réponse myogénique. Une augmentation en inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et diacylgcérol (DAG) a été démontré suite à un changement de pression intraluminale dans les artères rénales de chien<sup>145</sup>. Cependant le mécanisme d'activation de la PLC par la pression n'est pas encore clair. La **protéine kinase C** (PKC) semble aussi impliquée dans le contrôle du tonus myogénique, car l'utilisation d'un bloqueur de la PKC, la calphostine C, inhibe la réponse myogénique<sup>146</sup>. De plus, un **métabolite de l'acide arachidonique** semble impliqué dans le maintien et l'initiation du tonus myogénique en inhibant les canaux potassiques dépendants du calcium (K<sub>Ca</sub>)<sup>147</sup>. Finalement, une transduction mécanique



par la matrice extracellulaire et le cytosquelette pourrait être une autre voie de signalisation qui contribuerait au contrôle du tonus myogénique<sup>148</sup>.

**Figure 6** : Mécanismes de contraction et de compensation du tonus myogénique (d'après référence #133)



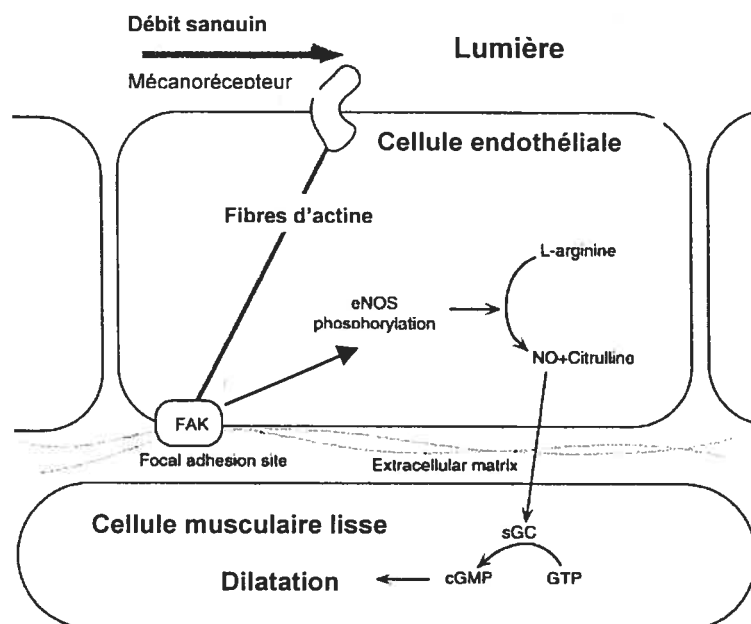
### La dilatation induite par le débit

La dilatation induite par le débit joue de nombreux rôles importants à plusieurs niveaux. Premièrement, ce mécanisme de contrôle protège la paroi des vaisseaux contre des lésions dues à la friction. De plus, la dilatation par le débit permet de réduire l'hétérogénéité de la distribution du débit coronarien. Finalement, par ce mécanisme, les changements rapides de pression intraluminaire peuvent être tamponnés.

Contrairement aux réponses de tonus myogénique, la dilatation induite par le débit est dépendante de l'endothélium. En effet, le NO et la prostacycline semblent être les deux facteurs vasorelaxants dérivés de l'endothélium les plus importants dans cette réponse.

Les mécanismes par lesquels la dilatation induite par le débit est engendrée ont été grandement étudiés (Figure 7). Premièrement, le niveau du débit est perçu par l'endothélium par l'intermédiaire de mécanorécepteurs encore inconnus. Plusieurs candidats ont été énoncés. Parmi ceux-ci nous retrouvons des protéines membranaires et leurs dérivés glycosylés. La transmission du signal mécanique induit des changements de potentiel membranaire, l'activation de protéines G, l'activation de tyrosine kinase, la phosphorylation de plusieurs protéines et l'activation de facteurs de transcription<sup>149</sup>. Dans les microvaisseaux coronariens, les forces de cisaillement sont transmises par des fibres d'actine à un site d'adhésion focal situé du côté abluminal de l'endothélium (entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses). À ce site, des kinases tyrosine solubles phosphorylent des protéines qui à leur tour phosphorylent la eNOS. Cependant, les mécanismes peuvent différer d'une taille de vaisseau à l'autre et d'un lit vasculaire à l'autre<sup>147</sup>.

**Figure 7** : La dilatation induite par le débit (d'après référence #133)



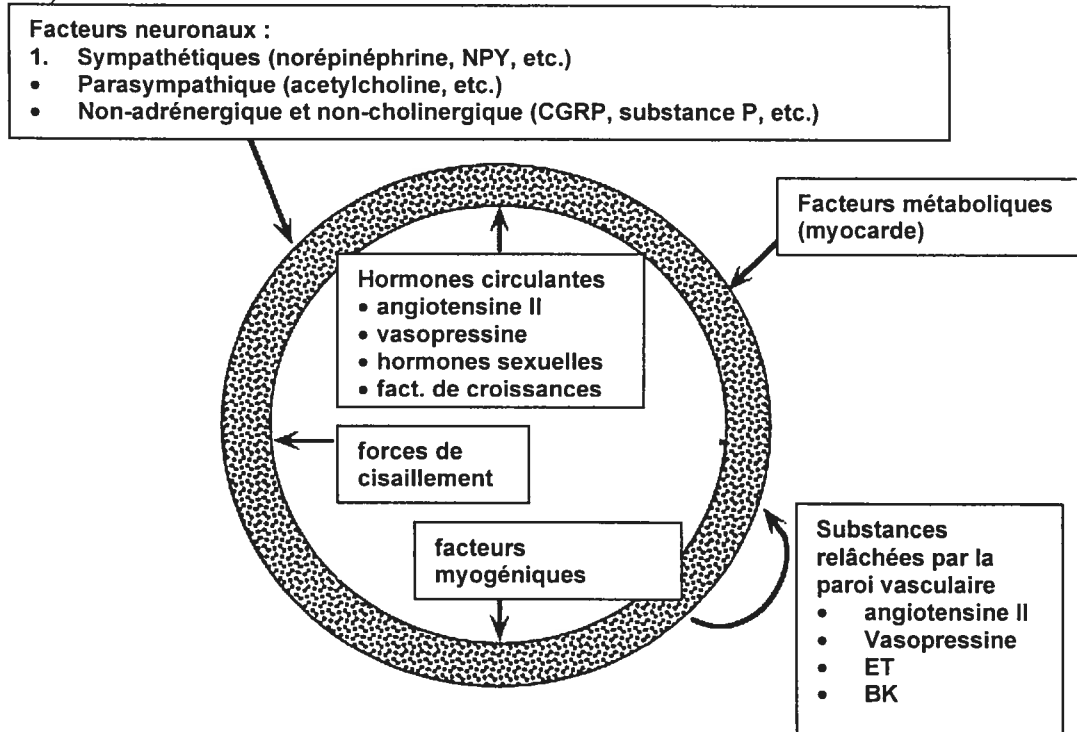
### 5.1.2.2 Contrôle par les facteurs métaboliques

Le débit sanguin peut également être régulé par des facteurs métaboliques tels que l'adénosine, les canaux potassiques dépendants de l'ATP ( $K_{ATP}$ ) et la voie du NO. Lorsque l'activité métabolique du cœur et la consommation d'oxygène augmentent, la relâche de métabolites augmente également ce qui induit une dilatation et en conséquence une réduction de la résistance artérielle accompagnée d'une augmentation du débit sanguin. Les microvaisseaux sont d'ailleurs davantage sensibles aux facteurs métaboliques que les vaisseaux de gros calibre.

### 5.1.2.3 Contrôle par les facteurs neurohumoraux

Le débit sanguin, donc le contrôle de l'apport en nutriments et en oxygène du myocarde, peut également être contrôlé par l'intermédiaire des systèmes nerveux sympathique et parasympathique ainsi que nerfs non-adrénergiques et non-cholinergiques. En effet, les neurotransmetteurs libérés par les tissus nerveux et plusieurs substances humorales affectent le tonus vasculaire. Les neurotransmetteurs et les co-transmetteurs incluent la norépinéphrine, l'acétylcholine (ACh), le neuropeptide Y (NPY) et la substance P. Les hormones circulantes comme la vasopressine, l'angiotensine II, les hormones sexuelles et les hormones de croissance affectent également le tonus vasculaire. Les substances provenant des thrombi comme la sérotonine (5-HT), l'adénosine diphosphate et le thromboxane peuvent tout autant influencer le tonus vasculaire ainsi que plusieurs autres substances libérées par la paroi vasculaire (angiotensine II, vasopressine, endothéline, bradykinine) (Figure 8). Les études *in vivo* réalisées sur des microvaisseaux ont démontré que le contrôle du tonus vasculaire par les facteurs neurohumoraux était hétérogène et indépendant de la taille du vaisseau étudié.

**Figure 8** : Contrôle du tonus par les facteurs neurohumoraux (d'après référence #133)



### 5.1.3 Les pathologies associées à la microcirculation

#### L'hypertension

L'hypertension induit des changements structurels et fonctionnels des microvaisseaux. En effet, l'épaisseur de la paroi vasculaire et plus précisément de la média des artérioles augmente considérablement comparativement à la lumière du vaisseau<sup>150</sup>. Ceci engendre une augmentation du rapport paroi/lumière. De plus, la densité artériolaire diminue et il y a apparition de fibrose périvasculaire<sup>151,152</sup>. Malgré le fait que ces changements structurels sont en premier lieu des mécanismes de défense et d'adaptation, ils deviennent également des facteurs importants dans la réduction de la capacité vasodilatatrice. Finalement, l'hypertension est associée à une dysfonction de l'autorégulation coronarienne et à une diminution de l'hyperémie réactive<sup>153</sup>. Plusieurs évidences suggèrent que l'hypertension est associée à une dysfonction de l'endothélium vasculaire. Des données démontrent que la dysfonction endothéliale débute tout d'abord au niveau des artères de gros calibre et par la suite,

lorsqu'une hypertrophie ventriculaire gauche survient, l'endothélium microvasculaire devient dysfonctionnelle <sup>154</sup>.

Dans l'hypertension, le niveau d'expression de la eNOS est un sujet de controverse. Certains groupes rapportent une augmentation de son activité dans le cœur et dans les artères mésentériques chez le rat hypertendu (SHR)<sup>155</sup>, alors qu'une expression réduite, démontrée par des études d'immunohistochimie, est rapportée par d'autres<sup>156</sup>. Plusieurs études utilisant des antioxydants indiquent que le stress oxydatif est sans aucun doute impliqué dans l'évolution de la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension. Tout comme pour l'hypercholestérolémie, des niveaux accrus d'*asymmetric dimethyl arginine* (ADMA) pourraient aussi contribuer à la dysfonction endothéliale dans l'hypertension<sup>157</sup>.

### **L'hypercholestérolémie**

L'hypercholestérolémie se manifeste différemment dans les vaisseaux de conductance et dans la microcirculation. En présence de niveaux élevés de cholestérol, contrairement aux vaisseaux de grande taille, la paroi des microvaisseaux ne se recouvre pas de plaques athérosclérotiques. La fonction de l'endothélium vasculaire est cependant altérée<sup>158,159</sup>. Il a été démontré dans des modèles animaux et chez l'humain, que la fonction endothéliale pouvait être corrigée complètement ou partiellement en normalisant les niveaux plasmatiques de cholestérol<sup>160,161</sup>. Les mécanismes responsables de la dysfonction endothéliale au niveau de la microcirculation semblent être reliés à l'EDHF et à la voie du NO.

Une diminution de la biodisponibilité du substrat (L-arginine) responsable de la formation du NO, une réduction de l'expression de la NO synthase endothéliale, une altération du signal de transduction et une augmentation de la dégradation du NO sont, en autres, des mécanismes plausibles qui expliquerait une diminution de l'action globale du NO. Il a été démontré qu'un supplément en L-arginine pouvait améliorer la fonction endothéliale. Des niveaux élevés en ADMA, un inhibiteur compétitif endogène de la NO synthase endothéliale, ont été détectés chez des lapins

hypercholestérolémiques<sup>162</sup>. Des altérations au niveau des protéines G, responsables de la transduction du signal, ont été rapportées dans différents lits microvasculaires. L'expression de la protéine G<sub>i</sub> est inhibée par l'accumulation de lipides et par la présence de lipoprotéines de faible densité (LDL) oxydées. Une dysfonction au niveau des récepteurs peut également compromettre l'intégrité du signal de transduction. Un autre mécanisme responsable de la diminution de l'action du NO réside en l'augmentation de la formation de complexes eNOS-calvéoline<sup>163</sup>. La calvéoline a pour effet d'inhiber l'activité de la eNOS et de réduire la formation de NO. Finalement, la dégradation du NO par l'anion superoxide pourrait également contribuer à la dysfonction endothéliale. Une augmentation du stress oxydatif a été démontrée au niveau des artères de conductance en présence d'hypercholestérolémie. Un phénomène semblable pourrait être présent dans la microcirculation.

### **Le diabète**

Le diabète produit des changements structuraux dans la microcirculation, dont un épaississement de la paroi vasculaire, l'apparition de fibrose périvasculaire et d'anévrysmes capillaires, ainsi qu'une diminution de la densité capillaire<sup>164,165</sup>. Ces changements causent une réduction de la réserve coronarienne maximale. Dans un modèle canin de diabète, la dilatation microvasculaire est abolie en réponse à une diminution de la pression de perfusion<sup>166</sup>. De plus, une diminution de la dilatation coronarienne induite par le débit est observée dans certains modèles animaux de diabète<sup>167</sup> et chez l'humain<sup>168</sup>. Une augmentation de la production de prostanoïdes vasoconstricteurs (thromboxane) et de radicaux libres serait à l'origine d'une telle dysfonction endothéliale.

## **6. Le modèle expérimental**

Le modèle de sténose aortique chez le porc est utilisé depuis plusieurs années au sein de notre laboratoire afin d'étudier l'impact de l'hypertrophie ventriculaire gauche sur la fonction endothéliale coronarienne. Plus de 200 chirurgies ont été réalisées. Le modèle de sténose aortique fut également étudié dans d'autres espèces animales comme le chien<sup>169</sup> et le lapin<sup>170</sup>.

Plusieurs études ont été réalisées afin d'évaluer la validité du modèle. Tout d'abord, des études échocardiographiques transthoraciques ont été effectuées avant la chirurgie, une semaine, deux semaines et deux mois après la chirurgie afin d'étudier la progression de l'hypertrophie induit par le cerclage aortique. Après deux mois de cerclage aortique, il y a une diminution statistiquement significative de la fraction de raccourcissement de l'oreillette gauche (contraction auriculaire moindre) et une augmentation significative de l'épaisseur du septum interventriculaire ainsi que de la paroi postérieure du ventricule gauche (Table 3). Des études hémodynamiques ont démontré que les pressions diastoliques ainsi que télédiastoliques du ventricule gauche sont augmentées après deux mois de cerclage aortique et que le rapport  $dP/dT$  (indice de contraction du ventricule gauche) est diminué (Table 4). Les pressions de systole restent inchangées après deux mois de cerclage aortique. Toutes ces données sont similaires à celles publiées pour des patients atteints d'hypertrophie ventriculaire gauche<sup>171,172,173</sup>. Des études morphologiques ont également été réalisées. Après deux mois de cerclage aortique, le rapport masse du cœur sur la masse corporel (g/kg) est augmenté de 21 % comparativement au groupe contrôle. Ceci est également vrai pour le rapport masse du ventricule gauche sur la masse corporel (g/kg) (Table 5).

## INTRODUCTION

---

**TABLE 3** : Données échocardiographiques du modèle expérimental (d'après référence #174)

	Control	Sham	2-month banding
Left atrium FAS (cm <sup>2</sup> )	31.8 ± 1.1	34.1 ± 0.7	28.5 ± 1.7
Left atrium FS (%)	22.3 ± 1.7	21.7 ± 0.4	15.2 ± 1.3*
Left ventricle FS (%)	39.8 ± 2.4	41.7 ± 2.2	37.3 ± 2.5
Left ventricle EF (%)	56.5 ± 2.0	57.5 ± 1.0	58.8 ± 3.0
Left ventricle IVS (g)	0.82 ± 0.04	0.85 ± 0.05	1.01 ± 0.03*
Left ventricle PW (g)	0.83 ± 0.06	0.80 ± 0.03	0.95 ± 0.03*

Data are presented as mean ± SEM.

\*p < 0.05 versus all groups.

FAS, fractional area shortening; FS, fractional shortening; EF, ejection fraction; IVS, interventricular septum; PW, Posterior wall.



## INTRODUCTION

**TABLE 4:** Données hémodynamiques du modèle expérimental (d'après référence #174)

	Basal	1 month	2 months
LV systolic pressure (mmHg)	110.2 ± 7.3	108.2 ± 7.8	107.3 ± 9.6
LV diastolic pressure (mmHg)	16.3 ± 3.6	7.9 ± 1.5	23.0 ± 2.9*
LV end-diastolic pressure (mmHg)	16.7 ± 3.8	22.0 ± 2.9	32.7 ± 1.5*
LAD systolic pressure (mmHg)	85.4 ± 11.9	92.7 ± 9.7	84.3 ± 9.8
LAD diastolic pressure (mmHg)	52.0 ± 11.6	50.8 ± 6.2	35.0 ± 5.0
LCx systolic pressure (mmHg)	76.0 ± 9.4	91.7 ± 9.6	89.7 ± 6.2
LCx diastolic pressure (mmHg)	48.6 ± 7.6	50.7 ± 4.4	41.7 ± 1.7
RC systolic pressure (mmHg)	91.4 ± 9.1	90.3 ± 11.8	91.3 ± 4.7
RC diastolic pressure (mmHg)	62.8 ± 9.2	50.0 ± 8.0	48.3 ± 10.9
LV + dP/dt (mmHg/s)	1910.0 ± 303.9	1323.8 ± 374.1	1076.7 ± 90.6
LV - dP/dt (mmHg/s)	1980.0 ± 255.7	1265.8 ± 208.3*	1186.7 ± 150.6*

Data are presented as mean ± SEM.

\*p < 0.05 versus basal.

LV, left ventricle; LAD, left anterior descending; LCx, left circumflex; RC, right coronary.

**TABLE 5 :** Données morphologiques du modèle expérimental (d'après référence #174)

	Body W (kg)	Heart W (kg)	LV W (kg)	LV W/Body W (g/kg)	Heart W/Body W (g/kg)
Control	35.8 ± 1.8	167.1 ± 10.6	119.6 ± 6.8	3.35 ± 0.21	4.68 ± 0.22
Sham	36.1 ± 1.2	177.0 ± 11.7	122.0 ± 8.1	3.39 ± 0.28	4.93 ± 0.27
2-month banding	31.3 ± 1.8	194.0 ± 12.3*	141.0 ± 0.8*	4.59 ± 0.25*	6.21 ± 0.86*

Data are presented as mean ± SEM.

\*p < 0.05 versus all groups.

LV, left ventricular; W, weight.

Basé sur ce modèle de surcharge de pression chronique, il a été montré que suite à deux mois de cerclage aortique une dysfonction endothéliale des artères coronaires était présente<sup>174</sup>.

### **Limites du modèle**

Pour le moment, seules des études s'étalant sur une période de deux mois ont été effectuées, ceci est suffisant pour étudier les altérations au niveau de la fonction endothéliale ; cependant cette durée ne couvre que la phase compensatrice de l'hypertrophie. Il serait donc intéressant de réaliser des expériences sur une période plus longue, afin d'étudier l'évolution de la dysfonction endothéliale jusqu'à un point pouvant mener à l'insuffisance cardiaque. Une autre limite réside en l'utilisation d'un cerclage aortique expérimental au niveau de l'aorte ascendante afin d'induire l'hypertrophie, qui est normalement induite par l'hypertension systémique ou une sténose de la valve aortique. Cependant, les études ont démontré qu'il n'y a aucune modification de pression de perfusion coronarienne suite au cerclage au-dessus des ostias coronariens. Finalement, l'augmentation de la fibrose périvasculaire et la compression des vaisseaux par l'hypertrophie pourraient compromettre la capacité vasodilatatrice des vaisseaux.

## **7. L'approche expérimentale**

Les études de réactivité vasculaire utilisant des préparations artérielles isolées ont été largement utilisées depuis plusieurs dizaines d'années et ont permis de nombreuses avancées dans les domaines de la physiologie et de la pharmacologie vasculaire.

Dans le cas des vaisseaux de gros calibre ( $> 500 \mu\text{m}$ ), les expériences sont réalisés à partir d'anneaux<sup>175</sup>. La préparation est placée entre deux crochets et étirée. L'un des crochets est relié à un capteur de tension lui-même associé à un système

d'enregistrement (système de chambre d'organe). Ainsi, la réactivité vasculaire est évaluée en enregistrant les variations de contraction isométrique.

Par la suite, la chambre d'organe classique a été miniaturisée avec la mise au point du myographe où deux filaments de tungsten remplace les crochets<sup>176</sup>. Cette méthode permet d'étudier la réactivité des artères de résistance (100 à 300  $\mu\text{m}$ ).

Les segments des vaisseaux sont traversés par deux fils dont l'un est relié à un capteur de tension et l'autre fixe. Un désavantage de cette technique est que la morphologie du vaisseau étudié n'est pas conservée. Comme pour les chambres d'organes, une fois étirées, les artères ont une allure aplatie dû au fait que les artères sont mises sous tension dans le sens de la largeur. Cette répartition non homogène de la tension est sans doute responsable de l'absence de tonus myogénique dans ces conditions. Cette approche est cependant excellente pour les études pharmacologiques.

C'est par la suite que l'artériographe a été développé<sup>177</sup>. Ce système, comme celui du myographe permet l'étude des propriétés vasoconstrictrices et vasodilatatrices de petits vaisseaux. Dans ce système, chaque extrémité de l'artère est installée sur une micropipette de verre. Les micropipettes sont installées en regard l'une de l'autre, et l'ensemble est relié à un dispositif assurant l'instauration d'une pression constante dans le vaisseau. Ce système permet de mesurer à la fois l'épaisseur des parois et de déterminer le diamètre interne du vaisseau. L'artériographe possède plusieurs avantages qui le distingue du myographe. Tout d'abord, contrairement au myographe, la forme de l'artère est conservée (identique à ce que l'on retrouve *in vivo*). De plus, l'artériographe instaurant une pression transmurale permet de réaliser des études de variation du diamètre en fonction de changements de pression (tonus myogénique). Par ailleurs, le vaisseau peut être étiré afin de compenser la rétraction due à la dissection ce qui permet à l'artère d'avoir une conformation proche de celle qu'elle possède *in vivo*. Finalement, des agents

pharmacologiques peuvent être mis directement dans le milieu extraluminal (directement dans la cuve) ou être perfusés dans le vaisseau en instaurant un débit.

Il faut également préciser que lorsque l'on compare la réponse contractile induite par certains agonistes, les artères montées dans l'artériographe présentent une sensibilité plus importante par rapport aux vaisseaux montés dans le myographe. Une telle différence serait reliée à un état de dépolarisation plus important lorsque la technique de l'artériographe est utilisée.

### **8. Hypothèses et buts**

L'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) est la principale adaptation morphologique du cœur en réponse à une augmentation de la post-charge. L'HVG est présente chez 23% des hommes et 33% des femmes âgés au-delà de 59 ans<sup>178</sup>. L'HVG est caractérisée par une augmentation de la masse myocardique, qui requiert une augmentation du débit sanguin afin de maintenir sa fonction. Ainsi, la compression de l'arbre microvasculaire et le manque en oxygène pouvant mener à une ischémie du myocarde<sup>179,180,181</sup> peuvent induire une dysfonction de la réactivité microvasculaire.

L'endothélium vasculaire est la première cible des facteurs de risque cardiovasculaire. La dysfonction endothéliale, une signature des maladies cardiovasculaires, est caractérisée par une fonction vasodilatatrice réduite. Le plus souvent, cette diminution de la fonction vasodilatatrice est associée à une production réduite de NO et/ou une augmentation de la production de radicaux libres qui piègent le NO dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses.<sup>182</sup> Chez des patients atteints d'HVG et d'hypertension, il a été montré que la vasodilatation dépendante de l'endothélium était réduite<sup>183,184,185</sup>. Nous avons récemment démontré que les dilatations dépendantes de l'endothélium des artères coronaires épicaudiques sont altérées suites à deux mois de cerclage aortique chez le porc<sup>186</sup>. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une telle dysfonction endothéliale pouvait également survenir dans les artères de résistance sous-endocardiques.

Les objectifs de cette présente étude étaient de tout d'abord étudier *in vitro* les mécanismes par lequel le NO induisait la dilatation des artères coronaires de résistance sous-endocardiques isolées et pressurisées suite à une stimulation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques et des récepteurs à la bradykinine, qui sont respectivement couplés aux protéines  $G_i$  et  $G_{q/11}$ . Le deuxième objectif était de quantifier la dilatation dépendante du NO d'artérioles sous-endocardiques chez des porcs sains et des porcs présentant une HVG induite par deux mois de cerclage aortique.

***MATERIEL ET METHODES***

## **9. La chirurgie**

La chirurgie est réalisée sur des porcs Landrace (environ 25 kg). Deux groupes expérimentaux sont formés : un groupe témoin, qui consiste en des porcs sacrifiés par exsanguination sans avoir eu de chirurgie et un groupe avec HVG, qui consiste en des porcs soumis à un cerclage aortique pour une période de 60 jours.

Brièvement, les porcs sont anesthésiés et un cathéter est inséré dans la veine auriculaire pour toute infusion intraveineuse lors de la chirurgie. Un cathéter est également inséré dans l'artère fémorale afin d'enregistrer la pression artérielle et pour recueillir des échantillons sanguins. Une thoracotomie antéro-latérale gauche est réalisée entre la deuxième et la troisième côte. L'aorte ascendante et l'artère pulmonaire sont délicatement séparées et dégagées de tout tissu conjonctif. Un ruban ombilical est placé 3 cm au-dessus des ostia coronariens et est progressivement serré afin d'obtenir un gradient systolique de 15 mm Hg (évalué en mesurant la pression artérielle systémique à un endroit éloigné du cerclage aortique). Le péricarde est ensuite refermé ainsi que les multiples couches de muscle.

### **9.1 Prélèvements des préparations**

#### **9.1.1 Prélèvement du cœur**

Les porcs reçoivent tout d'abord une sédation à la kétamine et zylazine par voie intramusculaire, par la suite ils sont pesés et anesthésiés à l'halothane par inhalation. L'animal est par la suite couché sur le dos. Une sternotomie est ensuite réalisée afin de dégager la cage thoracique et d'exposer le cœur. Le péricarde est ouvert pour en libérer le cœur. L'aorte ascendante et descendante ainsi que les veines pulmonaires sont rapidement sectionnées. Par la suite, le cœur est immergé dans une solution physiologique saline (PSS; Physiological Salt Solution) maintenue à 4°C. La paroi du ventricule gauche est isolée et transférée dans un Pétri contenant également une solution physiologique saline de 4°C.

### 9.1.2 Prélèvement des artérioles sous-endocardiques

Sous le microscope, les branches des artères coronaires sont repérées. Les branches secondaires et tertiaires sont ensuite disséquées. La première difficulté est le nettoyage de la préparation. La dissection consiste à retirer avec précaution le tissu myocardique et conjonctif qui entoure l'artériole, ceci afin de complètement la dégager. La deuxième difficulté est d'obtenir un segment à la fois suffisamment long et exempt de collatérales. Il faut que l'artère possède une longueur minimale de 3 mm afin qu'il soit possible d'obtenir une réactivité vasculaire optimale. Il faut aussi que l'artère ne possède aucune collatérale, afin d'éviter tout problème de fuite lorsque le vaisseau est pressurisé.

Afin d'éviter des problèmes de variabilité entre les résultats, il est important de prélever les artères toujours dans la même région du ventricule gauche.

### 9.2 Montage de l'artériole dans l'artériographe

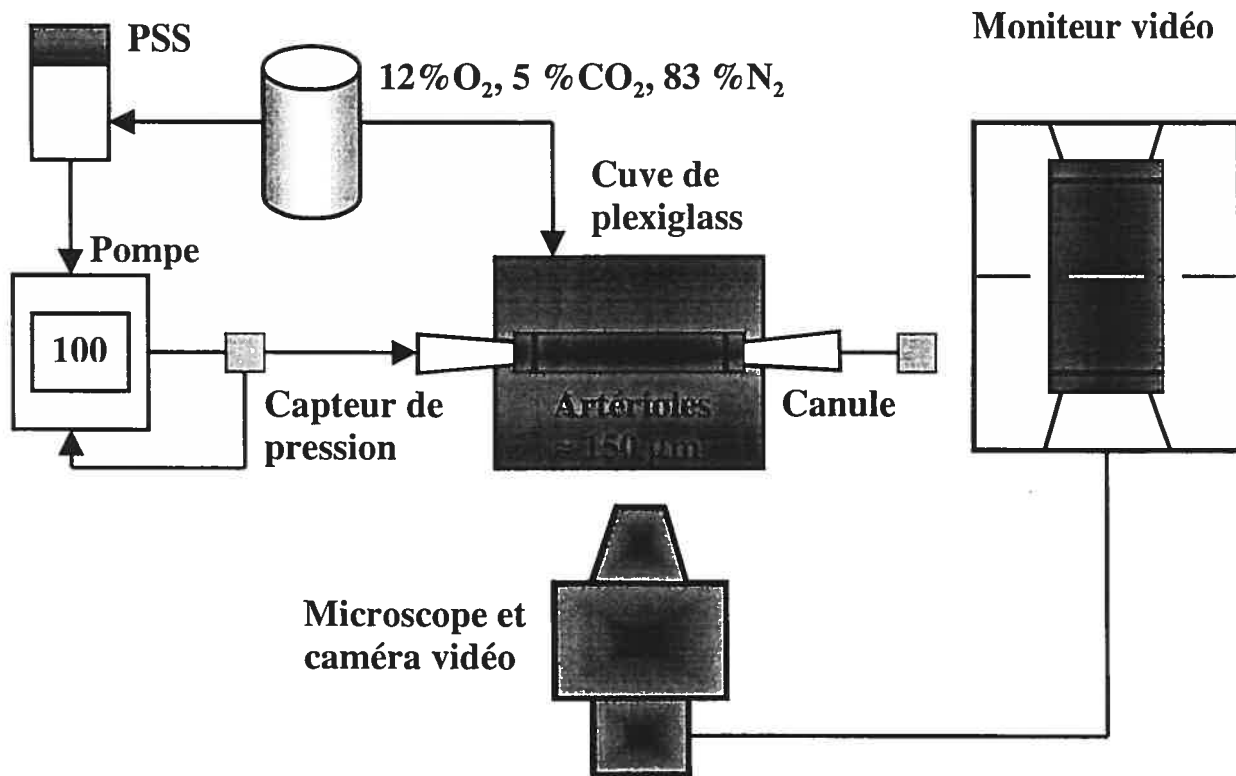
Une fois que l'artère est isolée et prélevée, celle-ci est transférée dans la cuve (remplie de PSS) de l'artériographe munie de deux canules de verre placées en regard l'une de l'autre. Premièrement, une extrémité du vaisseau est délicatement saisie par les pinces et installée sur la canule d'entrée (pipette proximale). Le vaisseau est ensuite ligaturé avec un fil de suture. À l'aide d'un débit, le sang résiduel présent dans la lumière du vaisseau est chassé. Ensuite, l'autre extrémité du vaisseau est ligaturée sur la pipette de sortie (pipette distale). À l'aide d'un micromanipulateur, les canules sont légèrement éloignées l'une de l'autre afin d'étirer l'artère longitudinalement pour obtenir une longueur optimale du vaisseau. Un débit est finalement instauré dans l'artère pour qu'elle soit pressurisée à 100 mm Hg (pression à laquelle l'artère développe un tonus myogénique). Si la pression de l'artère ne peut être maintenue à 100 mm Hg, ceci indique la présence d'une fuite au niveau du système ou du vaisseau comme tel.



### 9.3 Le dispositif expérimental : l'artériographe

L'artériographe est un dispositif qui permet d'étudier les propriétés contractiles des petits vaisseaux (Figure 9). L'artériographe est composé de deux cuves de plexiglass qui peuvent recevoir chacune une préparation. Chaque cuve comprend deux canules de verre placées en regard l'une de l'autre ayant un diamètre de 150 à 200  $\mu\text{m}$  à leur plus petite extrémité. La pipette d'entrée est mobile puisqu'elle est associée au micromanipulateur, par contre la pipette de sortie est fixe.

Le système comprend également deux circuits : extraluminal et intraluminal. Le circuit extraluminal concerne tout ce qui est à l'extérieur du vaisseau, des pipettes et des tubulures composant le système. Chaque cuve est alimentée par une solution physiologique saline oxygénée par un mélange gazeux (12 %  $\text{O}_2$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , 83%  $\text{N}_2$ ) et chauffée à 37°C. Le circuit intraluminal est constitué d'un module de contrôle de la pression intraluminale (Living System Instrumentation, Burlington, VT, USA) associé à un capteur de pression ( $P_1$ , en amont de la préparation) (Abbott System, USA) et une pompe péristaltique (Living System Instrumentation, Burlington, Vt, USA). La pompe est reliée à un réservoir de solution physiologique saline filtrée. Un deuxième capteur de pression ( $P_2$ , en aval de la préparation) est également installé après la pipette de sortie (pipette distale). Lors d'expériences sans débit (*no-flow*), afin d'éliminer la possibilité d'obtenir une dilatation induite par le débit (l'effet est dû uniquement aux agents pharmacologiques), le circuit intraluminal est obstrué par un bouchon placé après le capteur de pression placé en aval de la préparation. Dans ce cas, les pressions intraluminales sont égales à l'entrée et à la sortie du vaisseau.

**Figure 9** : Schéma de l'artériographe

En mode automatique, le module placé à l'entrée de la préparation permet de contrôler et de maintenir constante la pression intraluminale fixée par l'expérimentateur. Après montage du vaisseau sur les canules de verre, la pression intraluminale est augmentée via le module. Afin de vérifier la présence d'une fuite éventuelle, le module est placé en mode manuel, empêchant toute régulation automatique de la pression par la pompe péristaltique. En absence de fuite, la pression reste stable. Par contre, toute baisse de pression observée au niveau de l'affichage indique alors la présence d'une fuite. Il faut alors la localiser et la supprimer.

L'artériographe est également équipé d'un système vidéo. Le fond de la cuve de plexiglass est muni d'une fenêtre de verre très fine qui permet de visualiser le vaisseau à l'aide d'un microscope. La cuve est placée sur la platine d'un microscope

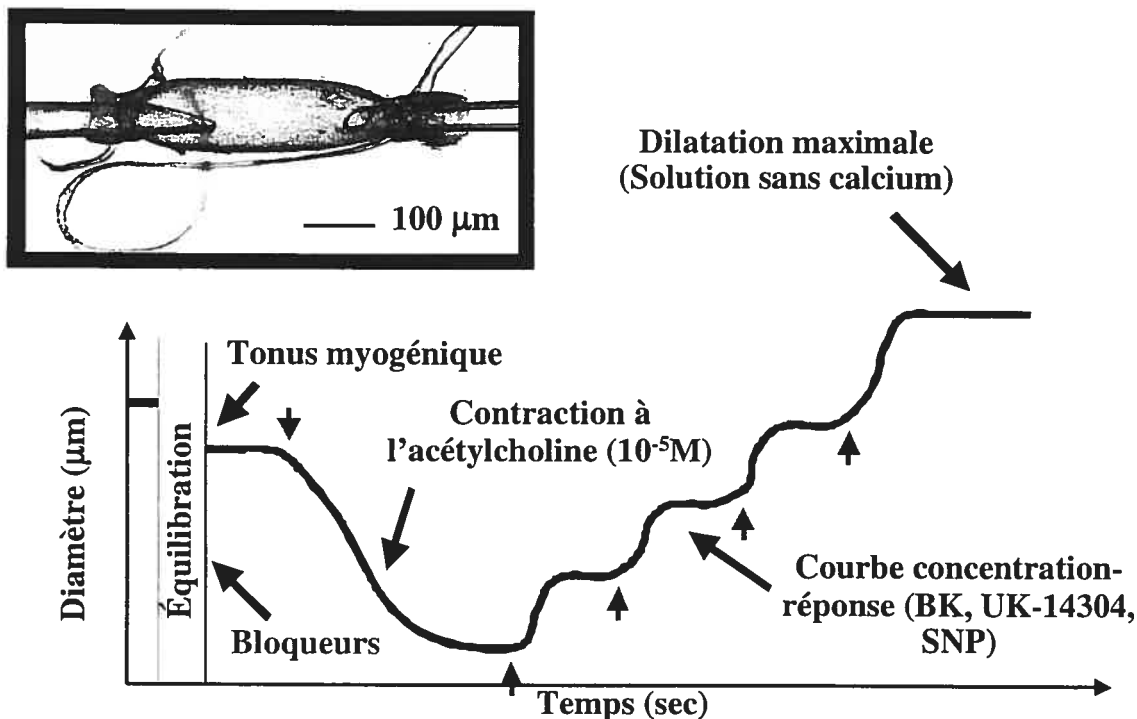
inversé (Nikon, TMS, Japan) qui est connecté à une caméra vidéo (Hitachi, CCTV camera, Japan). L'image obtenue par la caméra est visualisée sur un moniteur vidéo (Hitachi, Japan) qui est relié à un système électronique d'analyse vidéo (Living System Instrumentation, Burlington, VT, USA). Ce système d'analyse détecte les zones de forte densité optique. Le système possède deux fenêtres de dimension réglable associées chacune à un curseur mobile. Le curseur se positionne sur la zone de forte densité, qui est dans ce cas-ci la paroi du vaisseau. Chaque fenêtre est placée sur une épaisseur de paroi. L'analyse dans la première fenêtre se fera sur la première épaisseur de paroi, et la deuxième fenêtre permettra l'analyse de la deuxième épaisseur de paroi. Le système donne donc la distance entre les deux curseurs, qui représente la valeur du diamètre interne du vaisseau.

#### **9.4 Protocole sommaire d'une courbe concentration-réponse** (un protocole détaillé est fourni à la section « ARTICLE »)

Tout d'abord, la préparation équilibre pour une période de 50 minutes en présence ou absence des différents bloqueurs (L-NNA, indométhacine, ODO) (Figure 10). Suite à l'obtention du tonus myogénique, le vaisseau est contracté (acétylcholine ou solution hyperpotassique). Il est important de noter que les artérioles de porc contracte à l'acétylcholine, puisque les récepteurs muscariniques qu'elles possèdent se situent seulement au niveau du muscle lisse vasculaire. Lorsque la contraction est stable, la première concentration d'agoniste (UK-14,304 ; agoniste  $\alpha_2$ -adrénergique, bradykinine ; agoniste des récepteurs B2 ou SNP ; donneur exogène de NO) est appliquée. Après l'obtention d'un nouvel état stable, la seconde concentration est ajoutée et ainsi de suite. Lorsque le protocole est terminé, la préparation est lavée en changeant le milieu par du PSS. Finalement, à la toute fin du protocole le diamètre maximal (diamètre de référence) est déterminé par l'utilisation d'une solution sans calcium. En effet, la solution sans calcium supprime toute possibilité d'entrée de calcium dans la cellule musculaire lisse empêchant toute activité contractile. Pour chaque concentration, la variation de diamètre interne est déterminée. La dilatation (augmentation du diamètre) est exprimée en pourcentage de la dilatation maximale et

la contraction (réduction du diamètre) induite par le tonus ou un agent contracteur est exprimée en valeur absolue du diamètre de référence.

**Figure 10** : Représentation d'une courbe concentration-réponse



## 9.5 Solution physiologiques

### 9.5.1 Solution Physiologique Saline (PSS)

Sa composition est la suivante ( $\text{mmol l}^{-1}$ ): NaCl 130 ; KCl 4.7 ;  $\text{CaCl}_2$  1.6 ;  $\text{MgSO}_4$  1.17 ;  $\text{NaHCO}_3$  14.9 ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.18 ; EDTA 0.026 ; glucose 10. Cette solution est tamponnée à un pH de 7,4 et est utilisée pour les circuits intraluminal et extraluminal.

### 9.5.2 Solution hyperpotassique

Cette solution à une composition identique à celle de la solution physiologique saline, mais dans laquelle le NaCl est remplacé par du KCl de façon

équimolaire. Lors de nos expériences, nous avons utilisé une solution contenant 40 mM de KCl.

### 8.5.3 Solution sans calcium

Cette solution est constituée par la solution physiologique saline mais d'une part est dépourvue de calcium et d'autre part, un chélateur de calcium est rajouté (EGTA, 3 mM) afin d'éliminer toute trace éventuelle de calcium présente dans le milieu.

### 9.6 Réactifs

Les produits utilisés sont les suivants : l'acétylcholine, la bradykinine, le UK-14,304, le nitroprussiate de sodium, l'indométhacine, le N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA), l'1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one (ODQ), la glibenclamide, l'apamine et la charybdotoxin. Tous les produits ont été obtenus de Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri. L'acétylcholine, la bradykinine, le UK-14,304, le nitroprussiate de sodium, le L-NNA, l'ODQ, l'apamine et la charybdotoxin ont été dissout dans de l'eau ultrapure distillée. La glibenclamide a été dissoute dans du DMSO pour obtenir une solution *stock* (10 mmol l<sup>-1</sup>) et par la suite dans le PSS afin d'obtenir une dilution finale (0.1 μmol l<sup>-1</sup>). Finalement, l'indométhacine a été dissoute dans l'éthanol pour obtenir une solution *stock* (10 mmol l<sup>-1</sup>). Les solutions *stock* ont été gardées à -20°C et les dilutions ont été préparées quotidiennement.

***ARTICLE***

## Accord des coauteurs

### 1. Identification de l'étudiant

Marie-Eve Gendron,  
2-520-1-0, Maîtrise en pharmacologie

### 2. Description de l'article

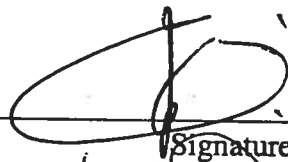
Auteurs : Marie-Eve Gendron, Eric Thorin, Louis P. Perrault  
Titre : Loss of NO-mediated,  $K_{ATP}$  channel-dependent dilation of endocardial  
resistance coronary arteries in pigs with left ventricular hypertrophy  
Revue à laquelle l'article est soumis: British Journal of Pharmacology  
Date de soumission de l'article : 14 janvier 2004  
Statut de l'article : **accepté** (voir lettre ci-jointe)

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

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Marie-Eve Gendron inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Étude de la dysfonction endothéliale des microvaisseaux sous-endocardiques dans un modèle d'hypertrophie ventriculaire gauche chez le porc.

Éric Thorin

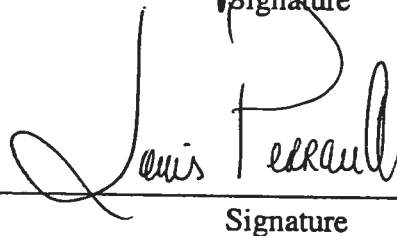
Coauteur

  
Signature

27. 8. 2004  
Date

Louis P. Perrault

Coauteur

  
Signature

04 / 14  
Date

**Date:** Wed, 2 Jun 2004 12:39:26 -0400

**De:** Marie-Ève Gendron [REDACTED]

**À:** [REDACTED]

**Objet:** Re: 2004BJP0374FP Decision Letter

> 19th May 2004

> Dear Dr. Thorin,

> Your paper has been seen by an editor and 4 expert referees. I am pleased  
> to say that, subject to satisfactory revision, it is considered to be  
> acceptable by the British Journal of Pharmacology. I enclose reports from  
> 3 of those referees that set out a number of points which will need your  
> attention before we can consider the submission further. I would urge you  
> to give these points your careful attention, as our policy is not to allow  
> more than one revision of a manuscript.

> I hope that you will be prepared to make the necessary amendments and  
> submit a revised manuscript within four weeks. This should be accompanied  
> by a statement of how you have responded to the criticisms raised,  
> preferably numbered point by point.

> Before your paper can be sent to the Production Department, we require a  
> completed Licence to Publish form. Please use the link below to access the  
> form. Print and complete the form and return it to us by post as soon as  
> possible.

> [http://mts-bjp.nature.com/letters/bjp\\_copyright.pdf](http://mts-bjp.nature.com/letters/bjp_copyright.pdf)

> Colour artwork is free only in the online version of the Journal. If your  
> paper contains colour artwork, please click the link below and complete the  
> Color Authorisation Form. This form must be posted back to us along with  
> your Licence to Publish form.

> [http://mts-bjp.nature.com/letters/Color\\_Artwork\\_Form.pdf](http://mts-bjp.nature.com/letters/Color_Artwork_Form.pdf)

> In the event that you are submitting colour figures for the hard copy of  
> the Journal, please note that due to the expense of colour reproduction it  
> is necessary for a charge to be made for colour artwork. The price is  
> approximately £450 for one figure only. A saving can sometimes be made by  
> grouping figures together, ie when a figure is made up of several parts  
> such as 'a, b & c', however this can only be calculated once the publisher  
> receives the artwork. Alternatively there is no charge for black and white  
> reproduction.

> The enclosed link will take you directly to the relevant web page to  
> re-submit your manuscript. Please read the author instructions carefully  
> prior to re-submission.

> <

> <http://mts-bjp.nature.com/cgi-bin/main.plex?el=A6B4CUK3A5Fgf4I5A95UiEZOF7jixhEFFdaL8rkwZ>

> >

>

>



>  
> Thank you for submitting your work to the British Journal of Pharmacology.  
>  
> Yours sincerely,

> Paul Hellewell  
> Senior Editor

>  
>  
>  
>  
>  
> BJP Editorial Office  
> 16 Angel Gate  
> 326 City Road  
> London  
> EC1V 2SG

>  
> Phone: +44 (0) 207 239 0180  
> Fax: +44 (0) 207 239 0181  
> Email: bjp@bps.ac.uk  
> Website: www.brjpharmacol.org

>  
> This email and any files transmitted with it are confidential and are  
> intended solely for the use of the individual or entity to whom they are  
> addressed. They should not be used by anyone who is not the original  
> intended recipient. If you have received this e-mail in error please  
> inform the sender and delete it from your mailbox or any other storage  
> mechanism. The views expressed in this e-mail and any files transmitted  
> with it are those of the individual not the Society.  
> Internet communications may not be secure and the British Pharmacological  
> Society is not responsible for their abuse by third parties nor for any  
> alteration or corruption in transmission. All e-mails sent to or from this  
> address may be subject to review by authorised personnel of the Society.  
> No contracts may be concluded on behalf of the British Pharmacological  
> Society by means of e-mail communication. British Pharmacological Society  
> Registered in England and Wales with registered number 2877400. Registered  
> Office 16 AngelGate, City Road, London EC1V 2SG. Registered Charity No.  
> 1030623.

**Loss of endothelial  $K_{ATP}$  channel-dependent, NO-mediated dilation  
of endocardial resistance coronary arteries in pigs with left  
ventricular hypertrophy**

Marie-Ève Gendron, Eric Thorin\*, Louis P. Perrault

Department of Surgery and Research Center, Institut de Cardiologie de Montréal,  
5000, rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada.

\* To whom correspondence should be addressed:

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



Running title: Endothelial dysfunction in LVH

Statut de l'article : **accepté**

**Abstract**

1. The influence of left ventricular hypertrophy (LVH) on the endothelial function of resistance endocardial arteries is not well established. The aim of this study was to characterise the mechanisms responsible for UK-14,304 ( $\alpha_2$ -adrenoreceptor agonist)-induced endothelium-dependent dilation in pig endocardial arteries isolated from hearts with or without LVH.
2. LVH was induced by aortic banding 2 months before determining endothelial function. Following euthanasia, hearts were harvested and endocardial resistance arteries isolated and pressurised to 100 mm Hg in no-flow conditions. Vessels were pre-constricted with acetylcholine (Ach) or high external  $K^+$  (40 mmol  $l^{-1}$  KCl). Results are expressed as mean $\pm$ SEM.
3. UK-14,304 induced a maximal dilation representing  $79\pm 6\%$  (n=8) of the maximal diameter. NO synthase (L-NNA, 10  $\mu$ mol  $l^{-1}$ , n=7) or guanylate cyclase (ODQ, 10  $\mu$ mol  $l^{-1}$ , n=4) inhibition reduced ( $P<0.05$ ) UK-14,304-dependent dilation to  $35\pm 6\%$  and  $18\pm 7\%$ , respectively. Apamin and charybdotoxin reduced ( $P<0.05$ ) to  $39\pm 8\%$  (n=4) the dilation induced by UK-14,304. In depolarised conditions, however, this dilation was prevented ( $P<0.05$ ).
4. In the presence of glibenclamide (Glib, 1  $\mu$ mol  $l^{-1}$ ), a  $K_{ATP}$  channel blocker, either alone ( $35\pm 10\%$ , n=5) or in combination with L-NNA ( $34\pm 9\%$ , n=4), UK-14,304-induced dilation was equally reduced ( $P<0.05$ ).
5. In LVH, UK-14,304-induced maximal dilation was markedly reduced ( $25 \pm 4\%$ ,  $P<0.05$ ) compared to control; it was insensitive to L-NNA ( $21\pm 5\%$ ) but prevented either by the combination of L-NNA, apamin and charybdotoxin, or by 40 mmol  $l^{-1}$  KCl.
6. Activation of endothelial  $\alpha_2$ -adrenoreceptor induces an endothelium-dependent dilation of pig endocardial resistance arteries. This dilation is in part dependent on NO, the release of which appears to be dependent on the activation of endothelial  $K_{ATP}$  channels. This mechanism is blunted in LVH, leading to a profound reduction in UK-14,304-dependent dilation.

**Key words:** Endothelium; coronary arterioles; LVH; NO; hyperpolarisation;  $K_{ATP}$  channels;  $\alpha_2$ -adrenergic receptor agonist.

**Abbreviations:** Ach, acetylcholine; Apa, apamin; BK, bradykinin;  $K_{Ca}$ ,  $Ca^{2+}$ -sensitive  $K^+$  channel; Chtx, charybdotoxin; EDHF, endothelium derived hyperpolarizing factor;  $E_{max}$ , maximal dilation; Glib, glibenclamide; indo, indomethacin;  $K_{ATP}$ , ATP-sensitive  $K^+$  channels; L-NNA, N $\omega$ -nitro-L-arginine; LVH, left ventricular hypertrophy; MT, myogenic tone; NO, nitric oxide; ODQ, 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3a]quinoxaline-1-one; PGI<sub>2</sub>, prostacyclin; PSS, physiological salt solution; SNP, sodium nitroprusside.

## Introduction

Left ventricular hypertrophy (LVH) is the main morphological adaptive change of the heart in response to a chronic increase in pressure. LVH is a common clinical finding affecting 23% of men and 33% of women over the age of 59 (Savage *et al.*, 1987). LVH is characterised by an increased myocardial mass, which requires an increase in coronary blood flow to maintain function. Compression of the microvasculature and lack of blood supply, however, may be associated with myocardial ischemia (Pichard *et al.*, 1981; Marcus *et al.*, 1982; Opherk *et al.*, 1984). In patients with LVH, arteriolar density was found to be identical to that of healthy controls, whereas arteriolar medial area and peri-arteriolar collagen area were increased (Mundhenke *et al.*, 1997). Although such structural changes may partly account for the impaired coronary reserve in LVH (Kozakova *et al.*, 2000; Rajappan *et al.*, 2002; Rajappan *et al.*, 2003), additional vascular changes must be involved.

Endothelial dysfunction, a common feature of vascular diseases, is characterised by a reduced dilatory capacity (Taniyama & Griendling, 2003). Endothelium-dependent dilation is reduced in patients with LVH, in addition to coronary flow reserve, whereas the minimum coronary resistance is increased (Treasure *et al.*, 1992; Treasure *et al.*, 1993; Egashira *et al.*, 1995; Houghton *et al.*, 1998; Di Bello *et al.*, 2002; Kozakova *et al.*, 2000; Rajappan *et al.*, 2002; Houghton *et al.*, 2003; Rajappan *et al.*, 2003). As previously shown in human (Houghton *et al.*, 1998), we reported in pigs that the endothelium-dependent relaxation of large epicardial coronary arteries was impaired in LVH following 2 months of aortic banding (Malo *et al.*, 2003). Although free radicals are implicated in all cardiovascular diseases (for review, Taniyama & Griendling, 2003), the cellular mechanisms leading this dysfunction are unclear. In addition, it is unclear whether the endothelial microvascular function is similarly altered. Our previous data (Thorin, 2001) and those of others (Thollon *et al.*, 1999) demonstrate that cardiovascular diseases do not alter endothelial function in general, but affect particular receptor systems. To address this issue, we have investigated the mechanisms of action of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor ( $\alpha_2$ -AR)-mediated NO-dependent dilation of pressurised endocardial resistance arteries isolated from healthy pigs and

pigs with LVH. The results demonstrate that NO production is not impaired in LVH; however,  $\alpha_2$ -AR coupling leading to NO release is blunted.

## **Methods**

### Animals

Seventy 2 month-old male Landrace swine ( $25 \pm 3$  kg) were maintained and tested in accordance with the recommendations of the guidelines on the care and use of laboratory animals issued by the Canadian Council on Animal Research and the guidelines of the Animal Care, and were approved by the local committee. Two experimental groups were studied : a control group, which consisted of swine sacrificed by exsanguination without aortic banding and a LVH group, with aortic banding for a period of 60 days before sacrifice.

### Surgical procedure

Induction of LVH was performed by aortic banding as previously described (Malo *et al.*, 2003). Briefly, anaesthesia was induced by intramuscular injection of ketamine ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and xylazine ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ ). It was supported by halothane 1% v/v during artificial ventilation with an  $\text{O}_2$  / air mixture. Arterial blood gases were monitored. Acidosis was balanced with 8.4% sodium. A catheter was placed in an auricular vein for intravenous infusion during operation. A femoral catheter was placed to monitor arterial pressure and for arterial blood sampling. A left thoracotomy was performed in the third intercostal space. The ascending aorta and the pulmonary vein were carefully separated. An umbilical tape was placed 3 cm above the coronary ostia of the aorta, gently constricted to obtain a negative systolic gradient of 15 mm Hg (measured by monitoring the systemic arterial pressure distally to the banding site) and then tied. The pericardium was loosely closed and the chest was closed in multiple layers.

### Sacrifice and coronary microvessels harvesting

Four month-old sham swine (Control, 40±2 kg) and LVH (42±2 kg) swine with 60 days of aortic banding were anaesthetised using the same approach as for the surgical procedure. After exsanguination, the thorax was reopened through a median sternotomy to excise the heart, which was immediately placed in cold (4°C) Physiological Salt Solution (PSS) of the following composition (mmol l<sup>-1</sup>): NaCl 130 ; KCl 4.7 ; CaCl<sub>2</sub> 1.6 ; MgSO<sub>4</sub> 1.17 ; NaHCO<sub>3</sub> 14.9 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18 ; EDTA 0.026 ; glucose 10 ; and oxygenated with 12% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> / 83% N<sub>2</sub> (pH 7.4). Hearts were weighed and a section of the left ventricle was isolated and placed in a Petri dish containing cold PSS supplemented with indomethacin (10 µmol l<sup>-1</sup>, cyclooxygenase inhibitor). Subendocardial coronary microvessels (100-250 µm in external diameter) were dissected out from the anterior free wall of the left ventricle.

### Morphometric analysis

Subendocardial arterioles (100 – 250 µm external diameter) were dissected with a myocardial block, fixed in formalin 10% and cut transversely. Slices were stained with Verhoeff. Total vessel area and lumen area were determined by digital planimetry using a video microscope linked to a computer and a customised software (Scion image 1.6, Frederick, Maryland). Wall area was determined by subtraction of the lumen area from the total area. In order to obtain comparable data at variable diameters, the wall to lumen ratio was calculated.

### Coronary microvessels studies

Vessels were placed in a 2 mL plexiglass organ chamber containing oxygenated PSS warmed at 37°C, cannulated with dual glass micropipettes, and secured with 10-0 nylon mono-filaments sutures as previously described (Véquaud & Thorin, 2001). Vessels were pressurised to 100 mm Hg in a no-flow state. This internal pressure was selected based on preliminary experiments demonstrating that within a range of 80 to 120 mm Hg, myogenic responses were optimal in the two groups of vessels. Myogenic tone (n=7) represented 18±3%, 20±4% and 19±4% at 80, 100 and 120 mm Hg in the control group, and 11±4%, 14±4% and 17±4% at 80,

100 and 120 mm Hg in the LVH group. With an inverted microscope connected to a video camera, the vessel image was projected onto a black and white monitor. A video dimension analyzer (Living Systems Instrumentation, Burlington, VT, USA) was used to acquire online internal lumen diameter. Vessels were allowed to equilibrate in the organ chamber for 50-60 minutes before initiation of the experimental protocols.

### Study protocols

After equilibration, the arterial segments were constricted by extraluminal addition of acetylcholine (Ach;  $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), which induced a reduction in diameter representing 75% of the maximal diameter, *i.e.*  $44 \pm 5 \mu\text{m}$  from  $188 \pm 10 \mu\text{m}$  in control and  $50 \pm 5 \mu\text{m}$  from  $205 \pm 5 \mu\text{m}$  in LVH vessels. When the contraction was stable, only one cumulative concentration-response curve was obtained, either to UK-14,304 ( $1 \text{ pmol l}^{-1}$  to  $0.3 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), to bradykinin (BK;  $1 \text{ fmol l}^{-1}$  to  $0.3 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), or to sodium nitroprusside (SNP;  $1 \text{ nmol l}^{-1}$  to  $0.3 \text{ mmol l}^{-1}$ ). All drugs were applied extraluminally. At the end of the protocol, the maximal diameter ( $D_{\text{max}}$ ) was determined by changing the PSS to a  $\text{Ca}^{2+}$ -free PSS containing SNP ( $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) and EGTA (ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid,  $1 \text{ mmol l}^{-1}$ ).

In another series of experiments, vessels were constricted by a  $40 \text{ mmol l}^{-1}$  KCl-PSS depolarising solution added to the organ chamber. Depolarisation induced a reduction in diameter representing 75% of the maximal diameter, *i.e.*  $49 \pm 7 \mu\text{m}$  from  $199 \pm 14 \mu\text{m}$  in control and  $60 \pm 10 \mu\text{m}$  from  $222 \pm 8 \mu\text{m}$  in LVH vessels. Once again, only one dose-response curve was obtained to one agonist and  $D_{\text{max}}$  to complete the protocol.

All experiments were performed in the presence of indomethacin ( $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ ). Inhibitors were added in the bath (extraluminally) after the equilibration period and 20 min before initiation of the experiment (dilation to one agonist on Ach-induced constriction). NO formation was inhibited by N $\omega$ -nitro-L-arginine (L-NNA;  $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), an inhibitor of NO synthase. Cyclic GMP formation was inhibited by 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one (ODQ,  $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), an inhibitor of the soluble guanylate cyclase. Glibenclamide ( $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) was used to block ATP-



dependent potassium channels ( $K_{ATP}$ ). Finally, to further confirm the involvement of a putative EDHF, apamin ( $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) and charybdotoxin ( $0.1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) were used to block calcium-activated potassium channels ( $K_{Ca}$ ), the small conductance  $K_{Ca}$  ( $SK_{Ca}$ ) and the intermediate conductance  $K_{Ca}$  ( $IK_{Ca}$ ) / big conductance  $K_{Ca}$  ( $BK_{Ca}$ ), respectively.

### Drugs

Acetylcholine, bradykinin, UK-14,304, sodium nitroprusside, indomethacin, N $\omega$ -nitro-L-arginine, 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3a]quinoxaline-1-one (ODQ), glibenclamide, apamin and charybdotoxin were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri. All drugs were dissolved in ultrapure distilled water except for glibenclamide, which was dissolved in DMSO as a stock solution ( $10 \text{ mmol l}^{-1}$ ) and dissolved in PSS to obtain the final dilution ( $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), and indomethacin, which was dissolved in ethanol as a stock solution ( $10 \text{ mmol l}^{-1}$ ). Stock solutions were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Dilutions were prepared daily.

### Data analysis

In every case,  $n$  refers to the number of animals used in each protocol. Half-maximum effective concentration ( $EC_{50}$ ) of each drug was measured from each individual concentration-response curve using a logistic curve-fitting program (Allfit, Dr DeLéan, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada). The  $pD_2$  value, the negative log of the  $EC_{50}$ , was obtained. Continuous variables are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). For each protocol, basal diameter in no-flow condition was determined at the end of the 50 minutes equilibration period. Myogenic tone, which is a reduction in diameter induced by an increase in luminal pressure, was measured and expressed as percentage of the  $D_{\text{max}}$ . Agonist-induced dilation is expressed as a percentage of the  $D_{\text{max}}$ . ANOVA were performed to compare concentration-response curves. Differences were considered to be statistically significant when the  $P$  value was  $<0.05$  (Scheffe's  $F$  test).

## Results

### Baseline parameters

Sixty days of aortic banding led to an increase ( $P<0.05$ ) in heart to body weight ratio ( $6.8\pm 0.9$  g/kg) compared to the control group ( $5.7\pm 1.3$  g/kg). The hemodynamic characteristics of LVH in this model have been published (Malo *et al.*, 2003). Briefly, left diastolic and end-diastolic intraventricular pressures were increased and relaxation of the left ventricle was impaired. In addition, morphometric and hemodynamic parameters did not differ between control and sham-operated animals (Malo *et al.*, 2003).

The wall to lumen ratio of resistance arteries (100 to 250  $\mu\text{m}$  external diameter) increased from  $1.5\pm 0.1$  ( $n=6$ ) in control vessels to  $2.3\pm 0.3$  ( $n=8$ ) in LVH.

Isolated and pressurised endocardial arteries developed myogenic tone (Table 1). This reduction in diameter induced by the intraluminal pressure was not different between the two groups. Whereas pharmacological inhibition of the NO synthase had no influence on the myogenic tone of arteries isolated from control hearts, it increased myogenic tone ( $P<0.05$ ) in vessels isolated from LVH hearts. In contrast, blockade of  $K_{\text{ATP}}$  channel with glibenclamide increased ( $P<0.05$ ) myogenic tone in control but not LVH vessels. Guanylate cyclase inhibition with ODQ augmented myogenic tone more ( $P<0.05$ ) in arteries from control than LVH hearts, whereas dual inhibition of the NO pathway and the  $K_{\text{Ca}}$  channels increased myogenic tone similarly in both groups (Table 1). In vessels isolated from control pigs, apamin and charybdotoxin alone increased myogenic tone to  $57 \pm 8\%$  of  $D_{\text{max}}$  ( $n=4$ ).

### UK-14,304 induced dilation

The  $\alpha_2$ -AR agonist UK-14,304 induced an endothelium-dependent dilation of pressurised coronary microvessels. This dilation (Table 2), however, was reduced ( $P<0.001$ ) in the LVH group compared to the control group (Figure 1). It was insensitive to L-NNA in the LVH group, whereas addition of L-NNA impaired ( $P<0.001$ ) the maximal dilation of control arteries. The guanylate cyclase inhibitor ODQ reduced ( $P < 0.05$ ) the dilation of control vessels to a level comparable to that induced by L-NNA (Table 2).

Under depolarised conditions (high external  $K^+$ ), UK-14,304-induced dilation was abolished in both groups. Since L-NNA only partially prevented UK-14,304-induced dilation, this suggested to us that a hyperpolarising mechanism accounted for NO-mediated dilation (Figure 1A). To test this hypothesis, UK-14,304-induced dilation was reproduced in the presence of glibenclamide ( $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ). As shown in Table 1, glibenclamide mimicked the effects of L-NNA, which were not additive to those of L-NNA (Figure 1A).

To confirm the involvement of a putative EDHF in the L-NNA- and indomethacin-resistant dilation induced by UK-14,304, apamin ( $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) and charibdotoxin ( $0.1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) were added to the organ bath. In the presence of the two  $K_{Ca}$  channel inhibitors, UK-14,304-induced dilation was reduced by half in arteries isolated from control hearts (Table 2). In combination with L-NNA, UK-14,304-induced dilation was prevented in both groups (Table 2).

#### Bradykinin-induced dilation

BK-induced dilation was similar in the control and LVH group (Table 3). In the presence of high external  $K^+$ , the concentration-response curve to BK was shifted to the right, whereas the maximal dilation induced by BK was slightly reduced in the control ( $P < 0.05$ ) but not LVH group. In the presence of L-NNA, BK-induced dilation was unaltered and similar in both groups. Addition of ODQ in the presence of both indomethacin and  $40 \text{ mmol l}^{-1} K^+$ -PSS abolished the dilation to BK in both groups (Table 3). Glibenclamide did not affect BK-induced dilation (Table 3).

#### Endothelium-independent dilation

SNP-induced, endothelium-independent dilation was similar in control and LVH coronary microvessels (Table 3). In depolarised conditions, vascular sensitivity and potency of SNP were not altered. ODQ, however, abolished ( $P < 0.001$ ) the dilatory response to SNP in arteries isolated from both groups (Table 3). Glibenclamide had no influence on the vascular potency and efficacy of SNP (Table 3).

**Discussion**

The objectives of this study were to investigate the mechanisms of action of NO-induced dilation of pressurised coronary endocardial resistance arteries of healthy pigs and pigs with LVH induced by 2 months of aortic banding. Our data suggest that NO-induced dilation depends on endothelial  $K_{ATP}$ -channels opening when stimulated by an  $\alpha_2$ -AR agonist. In LVH, this mechanism is blunted and not compensated by a secondary endothelium-dependent pathway. We also found that endothelium-dependent dilation to BK and endothelium-independent dilation to SNP do not depend on  $K_{ATP}$ -channels opening, and are not affected by LVH.

Addition of L-NNA, in the presence of indomethacin, reduced by  $\approx 50\%$  the maximal dilation to UK-14,304 in arteries isolated from control pigs. On the other hand, combined inhibition of  $IK_{Ca}$  and  $BK_{Ca}$  with apamin and charybdotoxin reduced by  $\approx 50\%$  the maximal dilation to UK-14,304. Hence, both NO and an apamin- and charybdotoxin-sensitive factor, presumably EDHF (Edwards *et al.*, 1998; Thollon *et al.*, 2002), contribute to UK-14,304-induced dilation in arterioles isolated from control animals. Interestingly, however, 40 mmol  $l^{-1}$  KCl-PSS alone abolished the UK-14,304-induced dilation. This full block obtained in depolarising conditions suggested to us that a  $K^+$ -dependent mechanism contributed to UK-14304-mediated, NO-dependent dilation.

It has been demonstrated that NO can interact directly with different  $K^+$  channels such as ATP-sensitive  $K^+$  channels ( $K_{ATP}$ ),  $BK_{Ca}$  and the voltage-gated  $K^+$  channel ( $K_v$ ) (Bolotina *et al.*, 1994; Miyoshi *et al.*, 1994; Yuan *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997; Bychkov *et al.*, 1998). These effects depend upon both the type of blood vessel and the species studied. For instance, NO can directly activate  $K_{Ca}$  in smooth muscle cell membrane patches (inside-out configuration) isolated from the rabbit aorta in the absence of cGMP (Bolotina *et al.*, 1994). Others have reported that adenosine can open endothelial  $K_{ATP}$  channels through activation of a *pertussis* toxin-sensitive  $G_i$  protein. The endothelial hyperpolarisation increases the inward driving force for  $Ca^{2+}$ , which leads to the production and release of NO (Hein *et al.*, 1999). Similarly to adenosine, endothelial  $\alpha_2$ -AR couple to  $G_i$  proteins and lead to vascular dilation (Véquaud & Thorin, 2001).

In order to verify that  $K_{ATP}$  channels are involved in  $\alpha_2$ -AR-dependent NO-induced dilation, we used glibenclamide. This reduced the maximal dilation as efficiently as L-NNA. Furthermore, combination of both L-NNA and glibenclamide did not further reduce the maximal dilation. This strongly supports the concept that L-NNA and glibenclamide blocked the same pathway. Hence,  $K_{ATP}$  channels are implicated in NO induced dilation. There are two alternative pathways: first, UK-14,304-dependent  $K_{ATP}$  channel activation leads to a rise in intracellular  $Ca^{2+}$  responsible for NOS activation (Hein *et al.*, 1999). Second, UK-14,304-dependent phospholipase C activation leads to the release of NO, which activates smooth muscle  $K_{ATP}$  channels through a cGMP-dependent mechanism (Murphy & Brayden, 1995). Our protocols did not allow for discrimination between the two pathways. However, the following results are suggestive of a direct  $\alpha_2$ -AR-dependent activation of endothelial  $K_{ATP}$  channels:

- High external  $K^+$  did not prevent BK-induced dilation of arterioles isolated from control pigs. This demonstrates that, in contrast to UK-14,304-induced dilation, 1) cGMP-dependent NO dilation (sensitive to ODQ) is able to fully compensate EDHF inhibition and 2) NO does not activate smooth muscle  $K_{ATP}$  channels to induce dilation as revealed by the lack of effect of glibenclamide on BK-induced dilation;

- As for BK, SNP-induced dilation was not affected under depolarising conditions with or without  $K_{ATP}$  channel inhibition. As expected, the dilation was prevented by ODQ, demonstrating that SNP-induced dilation is NO-mediated and cGMP-dependent.

Based on these findings, it is likely that  $\alpha_2$ -AR-dependent activation of endothelial  $K_{ATP}$  channels accounts for NO production and release. Upon reaching the smooth muscle, NO stimulates the soluble guanylate cyclase, which triggers dilation. It is unlikely indeed that NO targets smooth muscle  $K_{ATP}$  channels only when endothelial  $\alpha_2$ -AR are activated. Furthermore, and as discussed above, apamin and charybdotoxin reduced UK-14,304-induced dilation but did not abolish it. This is in agreement with the concept that endothelial  $K_{Ca}$  channels accounts for EDHF-mediated dilation (Edwards *et al.*, 1998; Thollon *et al.*, 2002), a mechanism distinct from  $K_{ATP}$  channel-dependent NO production (Hein *et al.*, 1999).

### Effect of LVH on UK-14,304 induced dilation

In arterioles isolated from pigs with LVH, the maximal dilation induced by UK-14,304 was severely impaired when compared to control. This endothelial dysfunction became apparent during  $\alpha_2$ -AR stimulation. No significant reduction in BK-induced dilation was observed. The lack of impairment of BK-mediated relaxation has been previously reported in pig coronary arteries 4 weeks post-angioplasty (Thollon *et al.*, 1999). Similarly, we previously reported that substance P-induced relaxation of coronary arteries from atherosclerotic patients was not reduced whereas Ach induced a contraction (Thorin, 2001). Hence, there is no global endothelial dysfunction in LVH, but rather an impairment of selected pathways.

Inhibition of NO synthase did not further reduce the dilation induced by UK-14,304, demonstrating that the  $\alpha_2$ -AR-dependent pathway leading to NO production is altered, probably sparing the EDHF pathway (L-NNA- and indomethacin-resistant component). We confirmed that the remaining dilation was only attributable to a putative EDHF since the dilation was sensitive to a depolarising solution or to the combination of apamin and charibdotoxin, two  $K_{Ca}$  channel blockers known to block this pathway (Adeagbo & Triggle, 1993; Beny & Schaad 2000; Brandes *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 1998; Véquaud & Thorin, 2001; Thollon *et al.*, 2002). The limitation of our approach is the absence of membrane potential determination to confirm that repolarisation of the smooth muscle is responsible for the apamin- and charibdotoxin-sensitive dilation.

The origin of this selective inhibition of the endothelial  $\alpha_2$ -AR pathway is unknown. In a previous study, we reported that  $\alpha_2$ -AR activation led to the release of NO through the activation of the PLC by the  $\beta\gamma$ -subunits of the  $G_i$  protein, whereas activation of a putative  $K^+$  current was linked to the  $\alpha_i$ -subunit (Véquaud & Thorin, 2001). It is known that in pathological conditions leading to endothelial dysfunction,  $G_i$  but not  $G_q$  proteins are dysfunctional (Perrault *et al.*, 1999). It is possible that in LVH, similar selective alterations occur.

Myogenic tone is a reduction in diameter induced by an increase in intraluminal pressure. Although myogenic in nature, this contraction is largely

influenced by the endothelium (Nguyen *et al.*, 1999), as revealed by the rise in myogenic tone after inhibition of both NO and EDHF production by L-NNA combined with apamin and charybdotoxin (Table 1). LVH, however, influenced myogenic tone regulation by the endothelium. In the presence of L-NNA, myogenic tone augmented, a result not observed in control vessels. This remains an observation for which more studies are required. Either the importance of constitutively released NO is augmented in LVH, or the rise in the production of an endothelium-derived constricting factor, such as endothelin-1, is unmasked by NO withdrawal (Nguyen *et al.*, 1999; Thorin *et al.*, 1999; Kinlay *et al.*, 2001). On the other hand, glibenclamide had no effect in vessels isolated from hearts with LVH, which supports the concept that these channels are malfunctioning in this pathological setting.

#### Clinical significance

Previous work by Bache's group demonstrated that, in comparison with normal hearts, hypertrophied hearts have increased reliance on opening of  $K_{ATP}$  channels to augment coronary blood flow during exercise (Melchert *et al.*, 1999). This study demonstrated that, contrary to the normal heart, adenosine was not mandatory for exercise-induced coronary dilation. In addition, Lavallée's group reported that the stimulation of endothelial  $\beta_2$ -AR involved the opening of  $K_{ATP}$  channels (Ming *et al.*, 1997). Our data suggest therefore that these mechanisms would be impaired in LVH.

In conclusion, our data suggest that endothelium-derived NO induces a dilation that primarily depends on the opening of endothelial  $K_{ATP}$ -channels when stimulated by UK-14,304, an  $\alpha_2$ -AR agonist. In LVH, this mechanism of action is blunted and not compensated by a secondary endothelium-dependent pathway. It remains to demonstrate the impact of this pathway on the regulation of the perfusion of the endocardium.

**Acknowledgements**

The authors are grateful for the technical assistance of Mr. O. Malo. This work has been supported in part by the Foundation of the Montreal Heart Institute, the Heart and Stroke Foundation of Quebec (E.T.) and the Canadian Institute for Health Research (E.T.). L. Perrault is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. E. Thorin is a scholar of the Heart and Stroke Foundation of Canada.



**References**

- Adeagbo, A.S.O. & Triggle, C.R. (1993). Varying extracellular [K<sup>+</sup>]: a functional approach to separating EDHF- and EDNO related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **21**, 423-429.
- Beny, J.L. & Schaad, O. (2000). An evaluation of potassium ions as endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.*, **131**, 965-973.
- Bishop, S.P., Powell, P.C., Hasebe, N., Shen, Y.T., Patrick, T.A., Hittinger, L. & Vatner, S.F. (1996). Coronary vascular morphology in pressure-overload left ventricular hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **28**, 141-154.
- Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J. & Cohen, R.A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, **368**, 850-853.
- Brandes, R.P., Behra, A., Lebherz, C., Boger, R.H., Bode-Boger, S.M., Phivthong-Ngam, L. & Mugge, A. (1997). N(G)-nitro-L-arginine- and indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the rabbit renal artery: effect of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **135**, 49-55.
- Busse, R. & Fleming, I. (2003). Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *Trends in Pharmacol. Sci.*, **24**, 24-29.
- Bychkov, R., Gollasch, M., Steinke, T., Ried, C., Luft, F.C. & Haller, H. (1998). Calcium-activated potassium channels and nitrate-induced vasodilation in human coronary arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 293-298.

- Di Bello, V., Pedrinelli, R., Giorgi, D., Bertini, A., Talini, E., Mengozzi, G., Palagi, C., Nardi, C., Dell'Omo, G., Paterni, M. & Mariani, M. (2002). Coronary microcirculation in essential hypertension: a quantitative myocardial contrast echocardiographic approach. *Eur. J. Echocardiogr.*, **3**, 117-127.
- Edwards, G., Dora, K.A., Gardener, M.J., Garland, C.J. & Weston, A.H. (1998). K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*, **396**, 269-272.
- Egashira, K., Suzuki, S., Hirooka, Y., Kai, H., Sugimachi, M., Imaizumi, T. & Takeshita, A. (1995). Impaired endothelium-dependent vasodilation of large epicardial and resistance coronary arteries in patients with essential hypertension. *Hypertension*, **25**, 201-206.
- Hein, T.W. & Kuo, L. (1999). cAMP-independent dilation of coronary arterioles to adenosine. Role of nitric oxide, G proteins, and K<sub>ATP</sub> channels. *Circ. Res.*, **85**, 634-642.
- Houghton, J.L., Davison, C.A., Kuhner, P.A., Torossov, M.T., Strogatz, D.S. & Carr, A.A. (1998). Heterogeneous vasomotor responses of coronary conduit and resistance vessels in hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **31**, 374-382.
- Houghton, J.L., Strogatz, D.S., Torosoff, M.T., Smith, V.E., Fein, S.A., Kuhner, P.A., Philbin, E.F. & Carr, A.A. (2003). African Americans with LVH demonstrate depressed sensitivity of the coronary microcirculation to stimulated relaxation. *Hypertension*, **42**, 269-276.
- Kinlay, S., Behrendt, D., Wainstein, M., Beltrame, J., Fang, J.C., Creager, M.A., Selwyn, A.P. & Ganz, P. (2001). Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation*, **104**, 1114-1118.

- Kozakova, M., Galetta, F., Gregorini, L., Bigalli, G., Franzoni, F., Giusti, C. & Palombo, C. (2000). Coronary vasodilator capacity and epicardial vessel remodeling in physiological and hypertensive hypertrophy. *Hypertension*, **36**, 343-349.
- Li, P.L., Zou, A.P. & Campbell, W.B. (1997). Regulation of potassium channels in coronary arterial smooth muscle by endothelium-derived vasodilators. *Hypertension*, **29**, 262-267.
- Malo, O., Carrier, M., Shi, Y.F., Tardif, J.C., Tanguay, F.F. & Perrault, L.P. (2003). Specific alterations of endothelial signal transduction pathways of porcine epicardial coronary arteries in left ventricular hypertrophy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **42**, 275-286.
- Marcus, M.L., Doty, D.B., Hiratzka, L.F., Wright, C.B. & Eastham, C.L. (1982). A mechanism for angina pectoris in patients with aortic stenosis and normal coronary arteries. *N. Engl. J. Med.*, **307**, 1362-1367.
- Melchert, P.J., Duncker, D.J., Traverse, J.H. & Bache, R.J. (1999). Role of  $K_{ATP}$  channels and adenosine in regulation of coronary blood flow in the hypertrophied left ventricle. *Am. J. Physiol.*, **277**, H617-H625.
- Ming, Z., Parent, R. & Lavalley, M. (1997).  $\beta_2$ -adrenergic dilation of resistance coronary vessels involves  $K_{ATP}$  channels and nitric oxide in conscious dogs. *Circulation*, **95**, 1568-1576.
- Miyoshi, H., Nakaya, Y. & Moritoki, H. (1994). Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K channel of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, **345**, 47-49.

- Mundhenke, M., Schwartzkopff, B. & Strauer, B.E. (1997). Structural analysis of arteriolar and myocardial remodelling in the subendocardial region of patients with hypertensive heart disease and hypertrophic cardiomyopathy. *Virchows Arch.*, **431**, 265–273.
- Murphy, M.E. & Brayden, J.E. (1995). Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J. Physiol.*, **486**, 47-58.
- Nguyen, T-D, Véquaud, P. & Thorin, E. (1999). Effects of endothelin receptor antagonists and nitric oxide on myogenic tone and  $\alpha$ -adrenergic-dependent contraction of rabbit resistance arteries. *Cardiovasc. Res.*, **43**, 755-761.
- Opherk, D., Mall, G., Zebe, H., Schwartz, F., Weihe, E., Manthey, J. & Kubler, W. (1984). Reduction of coronary reserve : a mechanism for angina pectoris in patients with arterial hypertension and normal coronary arteries. *Circulation*, **69**, 1-7.
- Peng, W., Hoidal, J.R. & Farrukh, I.S. (1996). Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel in pulmonary vascular smooth muscle cells : role of nitric oxide. *J. Appl. Physiol.*, **81**, 1264-1272.
- Perrault, L.P., Bidouard, J.P., Janiak, P., Villeneuve, N., Bruneval, P., Vilaine, J.P. & Vanhoutte, P.M. (1999). Impairment of G-protein-mediated signal transduction in the porcine coronary endothelium during rejection after heart transplantation. *Cardiovasc. Res.*, **43**, 457-470.
- Pichard, A.D., Gorlin, R., Smith, H., Ambrose, J. & Meller, J. (1981). Coronary flow studies in patients with left ventricular hypertrophy of the hypertensive type. Evidence for an impaired coronary vascular reserve. *Am. J. Cardiol.*, **47**, 547-553.

- Rajappan, K., Rimoldi, O.E., Camici, P.G., Bellenger, N.G., Pennell, D.J. & Sheridan, D.J. (2003). Functional changes in coronary microcirculation after valve replacement in patients with aortic stenosis. *Circulation*, **107**, 3170-3175.
- Rajappan, K., Rimoldi, O.E., Dutka, D.P., Ariff, B., Pennell, D.J., Sheridan, D.J. & Camici, P.G. (2002). Mechanisms of coronary microcirculatory dysfunction in patients with aortic stenosis and angiographically normal coronary arteries. *Circulation*, **105**, 470-476.
- Savage, D.D., Garrison, R.J., Kannel, W.B., Levy, D., Anderson, S.J., Stokes, J., Feinleib, M. & Castelli, W.P. (1987). The spectrum of left ventricular hypertrophy in a general population sample : the Framingham study. *Circulation*, **75** (Suppl A), 126-133.
- Taniyama, Y. & Griendling, K.K. (2003). Reactive oxygen species in the vasculature. Molecular and cellular mechanism. *Hypertension*, **23**, 8019-8029.
- Thollon, C., Bidouard, J.P., Cambarrat, C., Delescluse, I., Villeneuve, N., Vanhoutte, P.M. & Vilaine, J.P. (1999). Alteration of endothelium-dependent hyperpolarizations in porcine coronary arteries with regenerated endothelium. *Circ. Res.*, **84**, 371-377.
- Thollon, C., Fournet-Bourguignon, M.P., Saboureau, D., Lesage, L., Reure, H., Vanhoutte, P.M. & Vilaine, J.P. (2002). Consequences of reduced production of NO on vascular reactivity of porcine coronary arteries after angioplasty: importance of EDHF. *Br. J. Pharmacol.*, **136**, 1153-1161.
- Thorin, E., Parent, R., Ming, Z. & Lavallee, M. (1999). Contribution of endogenous endothelin to large epicardial coronary artery tone in dogs and humans. *Am. J. Physiol.*, **277**, H524-H532.

- Thorin, E. (2001). Different contribution of endothelial nitric oxide in the relaxation of human coronary arteries of ischemic and dilated cardiomyopathic hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **37**, 227-232.
- Treasure, C.B., Klien, J.L., Vit, J.A., Manoukian, S.V., Renwick, G.H., Selwyn, A.P., Ganz, P. & Alexander, R.W. (1993). Hypertension and left ventricular hypertrophy are associated with impaired endothelium mediated relaxation in human coronary resistance vessels. *Circulation*, **87**, 86-93.
- Treasure, C.B., Manoukian, S.V., Klien, J.L., Vita, J.A., Nabel, E.G., Renwick, G.H., Selwyn, A.P., Alexander, R.W. & Ganz, P. (1992). Epicardial coronary responses to acetylcholine are impaired in hypertensive patients. *Circ. Res.*, **71**, 777-781.
- Véquaud, P. & Thorin, E. (2001). Endothelial G protein beta-subunits trigger nitric oxide-but not endothelium-derived hyperpolarizing factor-dependent dilation in rabbit resistance arteries. *Circ. Res.*, **89**, 716-722.
- Yuan, X.Y., Tod, M.L., Rubin, L.J. & Blaustein, M.P. (1996). NO hyperpolarizes pulmonary artery smooth muscle cells and decreases the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration by activating voltage-gated  $K^+$  channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10489-10494.

**TABLE 1.** Myogenic tone (%  $D_{max}$ ) of pressurised (100 mm Hg) coronary endocardial arteries in the absence (PSS) or in the presence of pre-treatment with  $N\omega$ -nitro-L-arginine (+ L-NNA,  $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), glibenclamide (Glib,  $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one (ODQ,  $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) or a combination of L-NNA, apamin (Apa,  $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) and charybdotoxin (Chtx,  $0.1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ).

<b>Experimental conditions</b>	<i>Control</i>	<i>n</i>	<i>LVH</i>	<i>n</i>
PSS	$13 \pm 3$	23	$8 \pm 2$	17
+ L-NNA	$14 \pm 6$	7	$33 \pm 11^*$	5
+ Glib	$36 \pm 7^*$	9	$9 \pm 5^\dagger$	5
+ ODQ	$75 \pm 5^*$	10	$46 \pm 13^*\dagger$	6
+ L-NNA + Apa + Chtx	$63 \pm 25^*$	3	$51 \pm 14^*$	3

Data are mean $\pm$ SEM. All experiments were performed in the presence of indomethacin ( $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ ). \*  $P < 0.05$  compared to PSS; †  $P < 0.05$  compared to Control.

**TABLE 2.** Pharmacological parameters for UK-14,304-induced dilation of pressurised coronary endocardial arteries. Vascular sensitivity ( $pD_2$ ) and maximal dilation ( $E_{max}$ ) to the  $\alpha_2$ -AR agonist in arteries isolated from control pigs and pigs with left ventricular hypertrophy (LVH) following 2 months of aortic banding.

UK, 14 304	Control			LVH		
	$pD_2$	$E_{max}$ (%)	$n$	$pD_2$	$E_{max}$ (%)	$n$
PSS	10.1 ± 0.3	79 ± 6	8	10.0 ± 0.1	25 ± 4†	5
+ L-NNA	10.2 ± 0.3	35 ± 6*	7	9.8 ± 0.4	21 ± 5	5
+ 40 mmol l <sup>-1</sup> KCl	ND	0 ± 0*	5	ND	3 ± 1*	5
+ Glib	10.9 ± 0.7	35 ± 10*	5	----	----	
+ ODQ	9.9 ± 0.7	18 ± 7*	4	----	----	
+ Apa + Chtx	7.9 ± 0.2*	39 ± 8*	4	----	----	
+ L-NNA + Glib	9.6 ± 0.7	34 ± 9*	4	----	----	
+ L-NNA + Apa + Chtx	ND	3 ± 1*	3	ND	2 ± 1*	3

Data are mean±SEM. All experiments were performed in the presence of indomethacin (10  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>). In the absence of KCl-PSS, arterioles were pre-constricted with acetylcholine (10  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>). For drug concentrations, please refer to the section “*study protocols*”. \* P < 0.001 compared to PSS; † P < 0.001 compared to Control. ND: Not determined.



**TABLE 3.** Pharmacological parameters for bradykinin (BK)- and sodium nitroprusside (SNP)-induced dilation of pressurised coronary endocardial arteries. Vascular sensitivity ( $pD_2$ ) and maximal dilation ( $E_{max}$ ) in arteries isolated from control pigs and pigs with left ventricular hypertrophy (LVH) following 2 months of aortic banding.

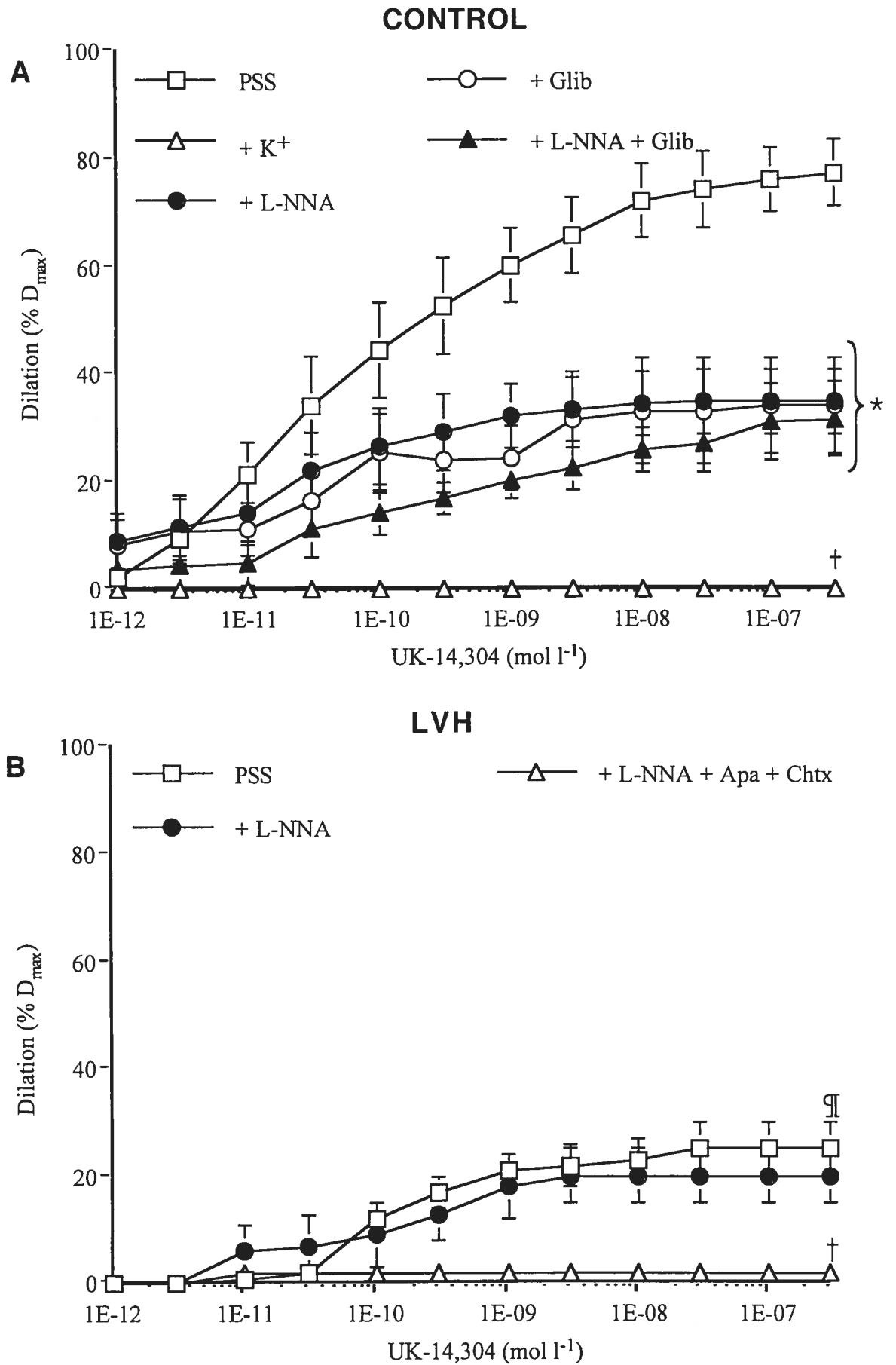
BK	Control			LVH		
	$pD_2$	$E_{max}$ (%)	$n$	$pD_2$	$E_{max}$ (%)	$n$
PSS	11.0 ± 0.3	97 ± 2	8	10.7 ± 0.7	101 ± 4	5
+ Glibenclamide	10.6 ± 0.4	96 ± 3	3	9.2 ± 0.1	96 ± 2	3
+ L-NNA	9.6 ± 0.4*	90 ± 4	5	9.5 ± 0.2	95 ± 4	5
+ 40 mmol l <sup>-1</sup> KCl	9.7 ± 0.2*	83 ± 4*	7	10.0 ± 0.3	93 ± 1	8
+ KCl + ODQ	ND	3 ± 2*	3	ND	2 ± 2*	3

SNP	Control			LVH		
	$pD_2$	$E_{max}$ (%)	$n$	$pD_2$	$E_{max}$ (%)	$n$
PSS	5.7 ± 0.3	83 ± 8	7	4.8 ± 0.3	66 ± 9	7
+ 40 mmol l <sup>-1</sup> KCl	5.1 ± 0.2	72 ± 4	8	4.6 ± 0.1	83 ± 10	5
+ Glib	5.5 ± 0.3	76 ± 11	4	4.5 ± 0.4	50 ± 3	5
+ ODQ	ND	4 ± 3*	3	ND	2 ± 2*	3

Data are mean±SEM. All experiments were performed in the presence of indomethacin (10  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>). In control conditions, arterioles were pre-constricted with acetylcholine (10  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>). For drug concentrations, please refer to the section “*study protocols*”. \* P < 0.001 compared to PSS. ND: Not determined.

**Figure 1.** UK-14,304-induced dilation of isolated and pressurised endocardial coronary arteries isolated from (A) control and (B) LVH pigs. Experiments were performed in the absence (PSS) or presence of a depolarising solution (+ K<sup>+</sup>, 40 mmol l<sup>-1</sup> KCl PSS), N $\omega$ -nitro-L-arginine (+ L-NNA, 10  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>), glibenclamide (Glib, 1  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>) or a combination of L-NNA and Glibenclamide or L-NNA and Apamin (1  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>) + Charybdotoxin (0.1  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>). Data are mean  $\pm$  SEM of 6 to 7 independent experiments. All solutions contained indomethacin \*: P<0.05 compared to PSS and with K<sup>+</sup>; †: P<0.05 compared to all groups; ¶ : P<0.05 compared to PSS Control (A).



***DISCUSSION***

Les objectifs de la présente étude étaient d'étudier les mécanismes d'action du NO dans les dilatations dépendantes et indépendantes de l'endothélium des artères de résistance sous-endocardiques de cœurs sains et de cœurs avec HVG induite par deux mois de cerclage aortique. Nous avons démontré que l'ouverture des canaux potassiques sensibles à l'ATP ( $K_{ATP}$ ) résultant d'une stimulation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques (UK-14,304), induisait une dilatation par le NO. Dans l'HVG, ce mécanisme est supprimé et n'est pas compensé par une autre voie vasodilatatrice comme celle de l'EDHF, qui a été démontrée comme étant un système de remplacement dans certains modèles<sup>187</sup>. Nous avons également démontré que la dilatation dépendante de l'endothélium à la BK (agoniste des récepteur B2) et la dilatation indépendante de l'endothélium au SNP ne dépendent pas de l'ouverture des canaux  $K_{ATP}$  et ne sont pas altérées dans l'HVG.

En présence d'indométhacine, l'ajout de L-NNA a réduit de moitié la dilatation au UK-14,304 des artères provenant des cœurs témoins. Ceci démontre que le NO est impliqué dans la dilatation induite par le UK-14,304 dans les artérioles témoins. D'autre part, cette dilatation est dépendante de l'activation de la guanylate cyclase puisque l'ODQ, son inhibiteur, a eu des effets similaires à ceux du L-NNA.

Nous avons émis l'hypothèse que la dilatation restante, insensible à l'indométhacine et au L-NNA, était attribuable à l'EDHF. L'apamine et la charybdotoxine sont deux inhibiteurs des canaux potassiques dépendants du calcium qui bloquent les effets et/ou la production de l'EDHF<sup>188,189,190,191,192</sup>. Dans nos conditions expérimentales, ces deux toxines utilisées en combinaison ont bloqué la réponse dilatatrice induite par le UK-14,304 en présence d'indométhacine et de L-NNA. L'utilisation d'une solution physiologique dépolarisante est une seconde approche permettant de bloquer les effets de l'EDHF. Paradoxalement, l'utilisation d'une solution physiologique hyperpotassique (40 mM KCl-PSS) en présence uniquement d'indométhacine a abolie la dilatation au UK-14,304. Cette réponse est paradoxale en effet car alors que le L-NNA a réduit la dilatation, une solution hyperpotassique aurait du avoir les mêmes effets en ne bloquant que la composante

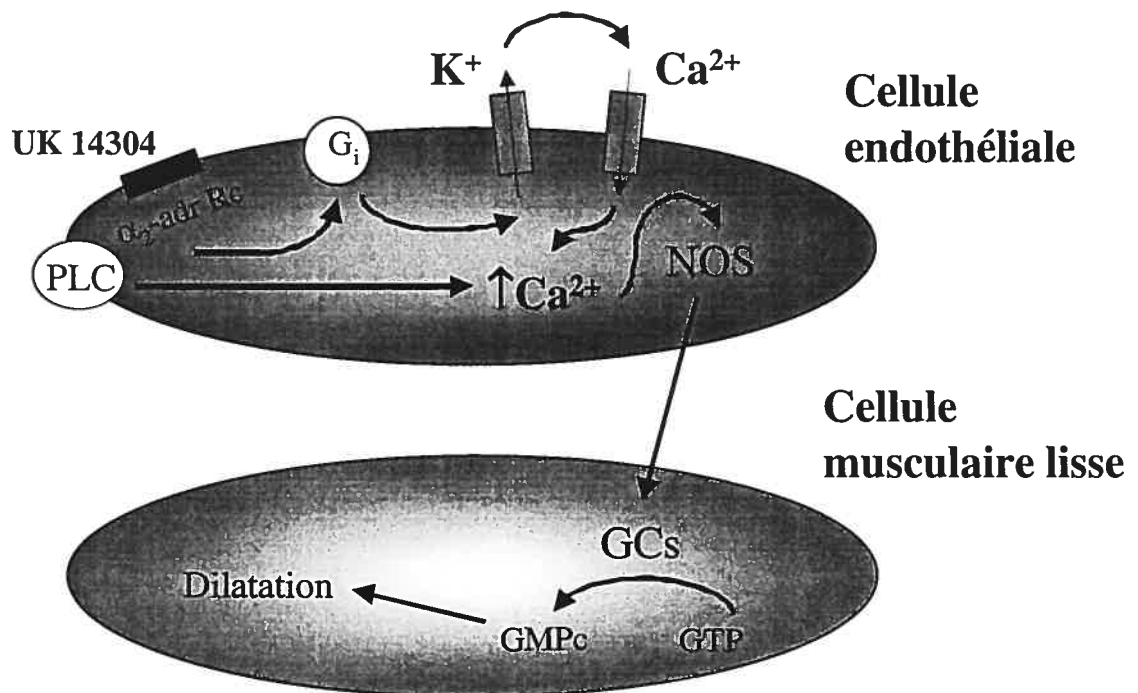
EDHF. Ainsi, la solution de 40 mM KCl-PSS a aboli la dilatation dépendante de l'EDHF et du NO, ces résultats suggèrent que la stimulation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques induit la relâche de NO *via* un mécanisme d'hyperpolarisation.

Le NO peut être produit (synthèse du NO) et agir (effet biologique du NO) de différentes façons. Tout d'abord, le NO peut être généré par différentes voies. La voie "classique" implique l'activation par un récepteur endothélial de la phospholipase C, qui par la formation de l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et du diacylglycérol (DAG) augmente les niveaux de calcium intracellulaire des cellules endothéliales. Cette augmentation de calcium intracellulaire permet à la calmoduline de se lier à la NO synthase endothéliale et d'engendrer la production de NO. Deuxièmement, le NO peut être formé suite à l'ouverture de canaux K<sub>ATP</sub>. En effet, différents groupes ont démontré que l'adénosine pouvait induire l'ouverture de canaux K<sub>ATP</sub> **endothéliaux** par l'intermédiaire de l'activation de protéines G<sub>i</sub> sensibles à la toxine de la coqueluche. Dans ce cas, l'hyperpolarisation endothéliale provoquée par l'ouverture de ces canaux potassiques augmente l'entrée de calcium dans la cellule endothéliale induisant l'activation de la NO synthase et la production de NO<sup>193</sup>. Le NO peut donc induire son effet vasodilatateur *via* l'activation de canaux potassiques situés sur les cellules endothéliales ou musculaires lisses (Figure 12).

Une fois formé le NO peut également agir de différentes manières pour induire une dilatation. Une première possibilité est que le NO migre vers le muscle lisse vasculaire sous-jacent pour activer la guanylate cyclase soluble et augmenter la production de GMP cyclique qui induit la phosphorylation de différentes protéines responsables de la diminution du relâchement de calcium par le réticulum endoplasmique, de la diminution d'entrée de calcium dans la cellule et de la séquestration du calcium. Finalement, la vasodilatation *in vivo* des vaisseaux est induite par la déphosphorylation des chaînes légères de la myosine. Le NO peut également interagir directement avec différents canaux potassiques comme les canaux K<sub>ATP</sub> du muscle lisse vasculaire, les canaux potassiques dépendants du

calcium à grande conductance ( $BK_{Ca}$ ) et les canaux dépendants du voltage ( $K_v$ )<sup>194,195,196,197,198,199</sup>. Cependant, les effets induit par ces différents canaux dépendent du type de vaisseau sanguin et du modèle étudié. Par exemple, il a été démontré que le NO, sans utiliser le GMP cyclique, peut directement activer des canaux  $K_{Ca}$  au niveau des **cellules musculaires lisses** isolées à partir d'aorte de lapin lorsqu'elles sont étudiées dans une configuration "inside-out" par la méthode de "patch clamp"<sup>193</sup>.

**Figure 12:** Mécanisme d'action du NO impliquant les canaux  $K_{ATP}$  endothéliaux



Plusieurs évidences suggèrent que les canaux  $K_{ATP}$  sont impliqués dans la régulation du débit coronarien qui se fait majoritairement dans le sous-endocarde. La glibenclamide, un inhibiteur sélectif des canaux  $K_{ATP}$ , réduit le débit sanguin<sup>200,201,202</sup>. Initialement, la communauté scientifique croyait que les canaux  $K_{ATP}$  étaient uniquement activés par une perte en ATP<sup>203</sup> créée par l'ischémie ou l'hypoxie, d'où leur nom. On sait aujourd'hui que plusieurs autres facteurs comme le lactate<sup>204</sup>, l'acidose<sup>205</sup>, les protéines  $G_i$  sensibles à la toxine de la coqueluche<sup>206,207,208</sup> et les

agonistes endogènes (“calcitonin gene-related peptide”<sup>209</sup> et l’adénosine<sup>210</sup>) peuvent activer les canaux  $K_{ATP}$ . La sensibilité des canaux  $K_{ATP}$  à l’ATP peut également être diminuée par des activateurs de la phospholipase C<sup>211</sup>.

Afin de vérifier l’implication des canaux  $K_{ATP}$  dans la dilatation dépendante du NO induite par le UK-14,304, nous avons utilisé la glibenclamide. L’utilisation de la glibenclamide a réduit la dilatation à un niveau comparable à celui obtenu avec le L-NNA. De plus, la combinaison de L-NNA et de glibenclamide n’a pas produit d’effet inhibiteur additionnel sur la dilatation. Ces résultats démontrent que le L-NNA et la glibenclamide ont inhibé la même voie intracellulaire. Ainsi, ces données montrent que l’ouverture des canaux  $K_{ATP}$  est impliquée dans la dilatation induite par le NO suite à une stimulation  $\alpha_2$ -adrénergique. Tel que mentionné précédemment, le NO peut activer des canaux  $K_{ATP}$  endothéliaux ou musculaires lisses.

Une première possibilité est que le UK-14,304 active des canaux  $K_{ATP}$  au niveau des cellules endothéliales. L’activation de ces canaux serait responsable de l’augmentation de calcium intracellulaire et de l’activation de la NO synthase<sup>199</sup>. La seconde possibilité est que le UK-14,304 active la phospholipase C (voie classique) qui est responsable du relâchement subséquent du NO. Le NO, par la suite, active directement<sup>193</sup> ou indirectement, *via* le GMP cyclique<sup>212</sup> des canaux  $K_{ATP}$  sur les cellules musculaires lisses.

Les expériences réalisées dans le laboratoire ne permettent pas d’affirmer quel mécanisme est utilisé. Toutefois, plusieurs résultats suggèrent une activation directe des canaux  $K_{ATP}$  endothéliaux par les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques.

Premièrement, l’application d’un milieu extracellulaire riche en ions potassiques (qui inhibe l’effet de l’EDHF) a légèrement réduit la sensibilité, mais pas l’efficacité de la dilatation induite par la BK (agoniste des récepteurs  $B_2$  couplé à des protéines  $G_q$ ) des artères isolées à partir des coeurs témoins. Ceci démontre que, contrairement à la dilatation induite par le UK-14,304:



- 1) la dilatation par le NO, dépendante du GMPc (sensible à l'ODQ), compense complètement pour une perte en EDHF;
- 2) le NO n'implique pas l'ouverture de canaux  $K_{ATP}$ , puisque la glibenclamide n'a pas inhibé la dilatation induite par la BK.

Deuxièmement, comme pour la BK, la dilatation indépendante de l'endothélium induite par le SNP n'est pas affectée par l'ajout d'une solution de 40 mM KCl-PSS en présence ou absence de glibenclamide. De plus, la dilatation au SNP a été abolie par l'ODQ, démontrant que la dilatation induite par le SNP est induite par le NO et dépendante du GMP cyclique.

Dans tous les cas, l'utilisation d'ODQ a inhibé la dilatation dépendante du NO. Ces résultats démontrent que les dilatations dépendantes du NO à la BK, au UK-14,304 et au SNP empruntent toutes la voie du GMP cyclique afin d'induire la dilatation.

Ces résultats suggèrent que les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques activent directement les canaux  $K_{ATP}$  endothéliaux. L'hyperpolarisation endothéliale qui s'en suit augmente le  $[Ca^{2+}]_i$  activant ainsi la eNOS. Une fois le NO généré, celui-ci diffuse vers le muscle lisse et stimule la guanylate cyclase soluble qui induit la dilatation. Il est peu probable que le NO active les canaux  $K_{ATP}$  au niveau du muscle lisse vasculaire uniquement lorsque les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques endothéliaux sont activés. Cependant, ceci reste à être confirmé par des études d'électrophysiologie.

Nous avons ensuite étudié la dilatation au UK-14,304 des vaisseaux sous-endocardiques des coeurs avec HVG. Dans les vaisseaux sous-endocardiques provenant de ce groupe de porcs, la dilatation induite par le UK-14,304 est sévèrement réduite comparativement à la réponse des vaisseaux témoins. Cette dysfonction est sélective pour les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques puisque les dilatations à la BK et au SNP n'ont pas été altérées dans l'HVG. De plus, l'inhibition de la NO

synthase n'a produit aucun effet dans les artérioles des coeurs avec HVG suite à une stimulation au UK-14,304. Ces données démontrent que la formation de NO secondaire à la stimulation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques est supprimée. Puisque la dilatation est insensible à l'indométhacine et au L-NNA, celle-ci est uniquement attribuable à l'EDHF. Nous avons confirmé que la dilatation était seulement provoquée par l'EDHF en inhibant complètement la dilatation par une solution de 40 mM KCl-PSS ou par une combinaison d'apamine et de charybdotoxine.

L'origine de l'inhibition sélective de la voie endothéliale des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques n'est pas connue. Dans une étude précédente, nous avons démontré que l'activation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques mène à une libération de NO par l'activation des sous-unités  $\beta\gamma$  de la protéine  $G_i$  et que l'effet de l'EDHF est relié plutôt à l'activation de la sous-unité  $\alpha_i$ <sup>192</sup>. Il est également connu qu'en conditions pathologiques menant à une dysfonction de l'endothélium, les protéines  $G_i$  sont plus facilement altérées que les protéines  $G_q$ <sup>187</sup>. Il serait donc possible que la voie des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, qui est couplée aux protéines  $G_i$  soit altérée dans l'HVG et que les voies reliées à la BK (voie couplée aux protéines  $G_q$ ) ne le soient pas. Ce phénomène a déjà été observé dans le contexte d'autres pathologies comme la transplantation cardiaque<sup>187</sup>.

Cette altération de la voie vasodilatatrice dépendante du NO et des canaux  $K_{ATP}$  suite à une stimulation  $\alpha_2$ -adrénergique pourrait être également être due à une réduction sévère de la pression de perfusion au niveau du sous-endocarde. En effet, l'activité des canaux  $K_{ATP}$  pourrait être modulée par l'intensité de la pression de perfusion des tissus du milieu où ils se trouvent. Une diminution de la pression de perfusion pourrait réduire l'activité des canaux  $K_{ATP}$ <sup>133</sup>.

Le tonus myogénique se traduit par une réduction du diamètre suite à un changement de pression intraluminaire. Même si cette réponse est principalement indépendante de l'endothélium, le tonus myogénique est influencé par l'endothélium vasculaire<sup>213</sup>. Nous avons démontré que l'inhibition de la production du NO et de

l'EDHF par le L-NNA et une combinaison d'apamine et de charybdotoxine, respectivement, augmente considérablement le tonus myogénique. L'HVG a également influencé la régulation du tonus myogénique par l'endothélium. En effet, l'ajout de L-NNA a provoqué une augmentation du tonus myogénique, une observation absente dans les vaisseaux témoins. Davantage d'études devront être réalisées afin d'expliquer ce phénomène. En fait, ceci pourrait soit être expliqué par une libération constitutive de NO dans l'HVG qui, lorsqu'inhibée par le L-NNA, induit une augmentation du tonus myogénique. Une deuxième possibilité est qu'il y ait une augmentation de la production d'un facteur vasoconstricteur dérivé de l'endothélium, comme l'endothéline-1<sup>213</sup>, dans l'HVG et dont l'effet est priorisé lorsque la production de NO est inhibée. Également, il est intéressant de remarquer que la glibenclamide n'a provoqué aucun effet dans les vaisseaux isolés à partir des coeurs avec HVG supportant nos résultats qui suggèrent que les canaux  $K_{ATP}$  sont altérés dans l'HVG. Finalement, il est intéressant de noter que dans les artères témoins, l'ajout de L-NNA a induit un tonus beaucoup plus faible que lorsque l'ODQ est ajouté. Ceci pourrait être expliqué par un blocage moins global par le L-NNA que par l'ODQ. En effet, le L-NNA inhibe uniquement les NO synthases (donc une seule source de NO), alors que l'ODQ bloque la guanylate cyclase soluble qui est en quelque sorte un récepteur de choix pour le NO peu importe sa source (cytochrome P450, terminaisons nerveuses).

En conclusion, nos résultats suggèrent que la libération de NO par l'endothélium induit une dilatation qui découle de l'ouverture des canaux endothéliaux  $K_{ATP}$  suite à une stimulation par le UK-14,304, un agoniste des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques. Nous avons également démontré que ce mécanisme était supprimé dans l'HVG et qu'il n'est pas compensé par une autre voie dépendante de l'endothélium. Toutefois, comme toutes nos expériences ont été réalisées en présence d'indométhacine il est impossible d'exclure la possibilité que les prostaglandines puissent compenser. De plus, cette altération est sélective pour la voie  $\alpha_2$ -adrénergique (couplée aux protéines  $G_i$ ). Il est impératif de déterminer

## DISCUSSION

---

l'implication de cette voie dans la perfusion sous-endocardique, qui est altéré dans l'HVG.

***LES SOURCES  
DOCUMENTAIRES***

1. Vanhoutte PM. Dysfonctionnement endothélial et athérosclérose (1997). Archives des maladies du coeur et des vaisseaux, tome 90 (spécial VI), novembre, 9-19.
2. Vanhoutte PM. Other endothelium-derived vasoactive factors (1993). Circulation, 87 (suppl. V), V9-V17.
3. Busse R, Fleming I. Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces (2003). Trends in pharmacological sciences, 24, 24-29.
4. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine (1980). Nature, 288, 373-376.
5. Furchgott RF, Zawadzki JV. Endothelium-derived relaxing factor : discovery, early studies, and identification as nitric oxide (1999). Biosci Rep, 19, 235-251.
6. Ryan JW, Ryan US, Habliston D, Martin L, Howell DS. Synthesis of prostaglandins by pulmonary endothelial cells (1978). Trans Assoc Am Physicians, 91, 343-350.
7. Ryan US, Ryan JW, Habliston DL, Pena GA. Endothelial cells and components of the kallikrein-kinin system (1979). Adv Exp Med Biol, 120B, 275-286.
8. Gordon JL, Martin W. Stimulation of endothelial prostacyclin production plays no role in endothelium-dependent relaxation of the pig aorta (1983). Br J Pharmacol, 80, 179-186.
9. Gruetter CA, Gruetter DY, Lyon JE, Kadowitz PJ, Ignarro LJ. Relationship between cyclic guanosine 3' :5'-monophosphate formation and relaxation of

coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide : effects of methylene blue and methemoglobin (1981). *J Pharmacol Exp Ther*, 219, 181-186.

10. Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S, Kimura H. Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compound, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by haemoglobin and myoglobin (1978). *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 9, 145-158.

11. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxyde anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor (1986). *Am J Physiol*, 250, H822-827.

12. Ignarro LJ. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein (1989). *Circ Res*, 65, 1-21.

13. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties that are identical to those of nitric oxide radical (1987). *Circ Res*, 61, 866-879.

14. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor (1987). *Nature*, 327, 524-526.

15. Meulemans A. Diffusion coefficients and half-lives of nitric oxide and N-nitroso-L-arginine in rat cortex (1994). *Neurosci Lett*, 171(1-2), 89-93.

16. Moncada S, Higgs A. Mechanisms of disease : the L-arginine–nitric oxide pathway (1993). *New Engl J Med*, 329, 2002-2012.

17. Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission (1992). *New Engl J Med*, 326, 90-94.
18. Green SJ, Scheller LF, Marletta MA, Seguin MC, Klotz FW, Slayter M, Nelson BJ, Nacy CA. Nitric oxide : cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens (1994). *Immunol Lett*, 43, 87-94.
19. Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of endothelium in the vascular response to increased flow in vivo (1986). *Hypertension*, 8, 37-44.
20. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric Oxide as a signalling molecule in the vascular system : an overview (1999). *J Cardiovasc Pharmacol*, 34, 879-886.
21. Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide : mechanisms and therapeutic potential (2002). *Cardiovasc Res*, 55, 250-260.
22. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependant potassium channels in vascular smooth muscle (1994). *Nature*, 404, 197-201.
23. Rossi GP, Seccia TM, Nussdorfer GG. Reciprocal regulation of endothelin-1 and nitric oxide: relevance in the physiology and pathology of the cardiovascular system (2001). *Int Rev Cytol*, 209, 241-272.
24. Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans (1994). *Circulation*, 89, 2035-2040.



25. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase (1995). *Nature*, 377, 239-242.
26. Radomski MW, Moncada S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide (1993). *Thromb Haemost*, 70, 36-41.
27. Benjamin N, Dutton JAE, Ritter JM. Human vascular smooth muscle cells inhibit platelet aggregation when incubated with glyceryl trinitrate : evidence for generation of nitric oxide (1991). *Br J Pharmacol*, 102, 847-850.
28. Moro MA, Russel RJ, Celtek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-Usmar VM, Radomski MW, Moncada S. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide : Confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase (1996). *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 1480-1485.
29. Rao GH, Krishnamurthi S, Raj L, White JG. Influence of nitric oxide on agonist-mediated calcium mobilization in platelets (1990). *Biochem Med Metab Biol*, 43, 271-275.
30. Ross R. Atherosclerosis- An inflammatory disease (1999). *New Engl J Med*, 340, 115-126.
31. Schwartz SM. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis (1997). *J Clin Invest*, 99, 2814-2817.
32. Scott-Burden T, Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation (1993). *Circulation*, 87 (suppl 5), 51-55.

33. Nakaki T, Nakayama M, Kato R. Inhibition by nitric oxide and nitric-producing vasodilator of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells (1990). *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol*, 189, 347-353.
34. Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC, Huang PL. Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice (1998). *J Clin Invest*, 101, 1225-1232.
35. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: An endogenous modulator of leucocyte adhesion (1991). *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 4651-4655.
36. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells (1996). *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 9114-9119.
37. Koppenol WH. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite (1998). *Free Radic Biol Med*, 25, 385-391.
38. Recalcati S, Tarameli D, Conte D, Cairo G. Nitric oxide-mediated induction of ferritin synthesis in J774 macrophage by inflammatory cytokines: role of selective iron regulatory protein-2 downregulation (1998). *Blood*, 91, 1059-1066.
39. Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM. Ferritin: a cytoprotective antioxidant stratagem of endothelium (1992). *J Biol Chem*, 267, 18148-18153.
40. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training (2000). *J Clin Invest*, 105, 1631-1639.

41. Vane JR. The endothelium: maestro of the blood circulation (1993). *Phil Trans R Soc Lon B*, 348, 225-246.
42. Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxanes A<sub>2</sub> and prostacyclin (1979). *Pharmacol Rev*, 30, 293-331.
43. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle (1988). *Br J Pharmacol*, 93, 515-524.
44. Fleming I, Fisslthaler B, Michaelis UR, Kiss L, Popp R, Busse R. The coronary EDHF stimulates multiple signalling pathways and proliferation in vascular cells (2001). *Pflugers Arch*, 442, 511-518.
45. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factor (1996). *Circ Res*, 78, 415-423.
46. Popp R, Bauersachs J, Hecker M, Fleming I, Busse R. A transferable,  $\beta$ -naphthoflavone-inducible, hyperpolarization factor is synthesized by native and cultured porcine coronary endothelial cells (1996). *J Physiol*, 497, 699-709.
47. Widmann MD, Weintraub NL, Fudge JL, Brooks LA, Dellsperger KC. Cytochrome P-450 pathway in acetylcholine-induced canine coronary microvascular vasodilation in vivo (1998). *Am J Physiol*, 43, H283-H289.
48. Quilley J, McGiff JC. Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? (2000). *Trends Pharmacol Sci*, 21, 121-124.

49. Emerson GG, Segal SS. Electrical activation of endothelium evokes vasodilation and hyperpolarization along hamster feed arteries (2001). *Am J Physiol*, 280, H160-H167.

50. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle (1995). *Am J Physiol*, 268, C799-C822.

51. 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 (1998). *Cardiovasc Res*, 37, 780-790.

52. Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF : bringing the concepts together (2002). *Trends in pharmacological sciences*, 23, 374-380.

53. Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinine in human coronary arteries (1993). *J Clin Invest*, 92, 2867-2871.

54. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing (1996). *Circ Res*, 78, 415-423.

55. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells (1988). *Nature*, 332, 411-415.

56. Luscher TF, Oemar BS, Boulanger CM, Hahn AWA. Molecular and cellular biology of endothelin and its receptors- Part II (1993). *Journal of hypertension*, 11, 121-126.

57. Teerlink JR, Breu V, Sprecher U, Clozel M, Clozel JP. Potent vasoconstriction mediated by endothelin ET<sub>B</sub> receptors in canine coronary arteries (1994). *Circulation Research*, 74, 105-114.
58. Schiffrin EL. The endothelium and control of blood vessel function in health and disease (1994). *Clin Invest Med*, 17 :6, 602-620.
59. Miller VM. Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase in canine veins (1985). *Am J Physiol*, 248, H432-H437.
60. Katusic ZS, Vanhoutte PM. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor (1989). *Am J Physiol*, 257, H33-H37
61. Leopold J, Loscalzo J. Clinical importance of understanding vascular biology (2000). *Cardiol Rev*, 8, 115-123.
62. Widlansky Me, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction (2003). *J Am Coll Cardiol*, 42, 1149-1160.
63. Meredith IT, Anderson TJ, Uehata A, Yeung AC, Sewyn AP, Ganz P. Role of endothelium in ischemic coronary syndromes (1993). *Am J Cardiol*, 72, 27C-31C.
64. Lüscher TF, Noll Goerge. Endothelium dysfunction in the coronary circulation (1994). *J Cardiovasc pharmacol*, 24(suppl. 3), S16-S26.
65. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxal vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries (1986). *N Engl J Med*, 315, 1046-1051.

66. Cox DA, Vita JA, Treasure CB, Fish RD, Alexander RW, Ganz P, Selwyn AP. Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans (1989). *Circulation*, 80, 458-465.
67. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans (1990). *J Clin Invest*, 86, 228-234.
68. Oliver JJ, Webb DJ. Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events (2003). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 554-566.
69. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R; International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent low-mediated vasodilation of the brachial artery : a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force (2002). *J Am Coll Cardiol*, 39, 257-265.
70. Smith SC Jr, Blair SN, Bonow RO, Brass LM, Cerqueira MD, Dracup K, Fuster V, Gotto A, Grundy SM, Miller NH, Jacobs A, Jones D, Krauss RM, Mosca L, Ockene I, Pasternak RC, Pearson T, Pfeffer MA, Starke RD, Taubert KA. AHA/ACC guidelines for preventing heart attack and death in patients with atherosclerotic cardiovascular disease : 2001 update. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology (2001). *J Am Coll Cardiol*, 38, 1581-1583.
71. Clarkson P, Montgomery HE, Mullen MJ, Donald AE, Powe AJ, Bull T, Jubbs M, World M, Deanfield JE. Exercise training enhances endothelial function in young men (1999). *J Am Coll Cardiol*, 33, 1379-1385.

72. Higashi Y, Sasaki S, Kurisu S, Yoshimizu A, Sasaki N, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T. Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects : role of endothelium-derived nitric oxide (1999). *Circulation*, 100, 1194-1202.

73. Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure (1998). *Circulation*, 98, 2709-2715.

74. Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, Schoene N, Schuler G. Effect of physical exercise on coronary endothelial function in coronary artery disease (2000). *N Engl J Med*, 342, 454-460.

75. Duffy SJ, Keaney JF Jr, Holbrook M, Gokce N, Swerdloff PL, Frei B, Vita JA. Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease (2001). *Circulation*, 104, 151-156.

76. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects (1997) *Am J Cardiol*, 79, 350-354.

77. Goodfellow J, Bellamy MF, Ramsey MW, Jones CJ, Lewis MJ. Dietary supplementation with marine omega-3 fatty acids improves systemic large artery endothelial function in subjects with hypercholesterolemia (2000). *J Am Coll Cardiol*, 35, 265-270.

78. Keaney JF. Atherosclerosis, oxidative stress, and endothelial function. In : JF Keaney, Jr., Editor, *Oxidative Stress and Vascular Diseases*, Kluwer Academic Publishers, Boston, MA (2000), 155-181.

79. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn A, Ganz P. The effect of cholesterol lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion (1995). *Engl J Med*, 332, 488-493.

80. Heitzer T, Yla HS, Wild E, Luoma J, Drexler H. Effect of vitamin E on endothelial vasodilator function in patients with hypercholesterolemia, chronic smoking or both (1999). *J Am Coll Cardiol*, 33, 499-505.

81. Title LM, Cummings PM, Giddens K, Genest JJ, Nassar BA. Effect of folic acid and antioxidant vitamins on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease (2000). *J Am Coll Cardiol*, 36, 758-765.

82. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients : the Heart Outcomes Prevention Evaluation study investigators (2000). *N Engl J Med*, 342, 154-160.

83. Gilligan DM, Sack MN, Guetta V, Casino PR, Quyyumi AA, Rader DJ, Panza JA, Cannon RO 3rd. Effect of antioxidant vitamins on low density lipoprotein oxidation and impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with hypercholesterolemia (1994). *J Am Coll Cardiol*, 24, 1611-1617.

84. McKechnie R, Rubenfire M, Mosca L. Antioxidant nutrient supplementation and brachial reactivity in patients with coronary artery disease (2002). *J Lab Clin Med*, 139, 133-139.

85. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes (2001). *Circulation*, 104, 365-372.



86. Egashira K, Hirooka Y, Kai H et al. Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia (1994). *Circulation*, 89, 2519-2524.

87. Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, Zhang J, Boccuzzi SJ, Cedarholm JC, Alexander RW. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease (1995). *N Engl J Med*, 332, 481-487.

88. Vita JA, Yeung AC, Winniford M, Hodgson JM, Treasure CB, Klein JL, Werns S, Kern M, Plotkin D, Shih WJ, Mitchel Y, Ganz P. Effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelial vasomotor function in patients with coronary artery disease (2002). *Circulation*, 102, 846-851.

89. Levine GN, Keaney JF, Vita JA. Cholesterol reduction in cardiovascular disease : clinical benefits and possible mechanisms (1995). *N Engl J Med*, 332, 512-521.

90. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors (1998). *Circulation*, 97, 1129-1135.

91. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals (2000). *Nat Med*, 6, 1004-1010.

92. Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DA, Stewart DJ. A self-fulfilling prophecy : C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis (2002). *Circulation*, 106, 913-919.

93. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davis R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients : the Heart Outcomes Prevention Evaluation study investigators (2000). *N Engl J Med*, 342, 145-153.
94. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, Wargovich TJ, Mudra H, Luscher TF, Klibaner MI, Haber HE, Uprichard AC, Pepine CJ, Pitt B. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease : the TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) study (1996). *Circulation*, 94, 258-265.
95. Prasad A, Tupas-Habib T, Schenke WH, Mincemoyer R, Panza JA, Waclawin MA, Ellahham S, Quyyumi AA. Acute and chronic angiotensin-1 receptor antagonism reverses endothelial dysfunction in atherosclerosis (2000). *Circulation*, 101, 2349-2354.
96. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Ueda T, Yoshimizu A, Kurisu S, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T. A comparison of angiotensin-converting enzyme inhibitors, calcium antagonists, beta-blockers and diuretic agents on reactive hyperemia in patients with essential hypertension : a multicenter study (2000). *J Am Coll Cardiol*, 35, 284-291.
97. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADP and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells (1994). *Circ Res*, 74, 1141-1148.
98. Wassmann S, Hilgers S, Laufs U, Bohm M, Nickenig G. Angiotensin II type 1 receptor antagonism improves hypercholesterolemia-associated endothelial dysfunction (2002). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 1208-1212.

99. Hornig B, Landmesser U, Kohler C, Ahlersmann D, Spiekermann S, Christoph A, Tatge H, Drexler H. Comparative effect of ACE inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on bioavailability of nitric oxide in patients with coronary artery disease : role of superoxide dismutase (2001). *Circulation*, 103, 799-805.

100. Brown NJ, Abbas A, Byrne D, Schoenhard JA, Vaughan DE. Comparative effects of estrogen and angiotensin-converting enzyme inhibition on plasminogen activator inhibitor-1 in healthy postmenopausal women (2002). *Circulation*, 105, 304-309.

101. Herrington DM, Espeland MA, Crouse JR 3rd, Robertson J, Riley WA, McBurnie MA, Burke GL. Estrogen replacement and brachial artery flow-mediated vasodilation in older women (2001). *Arterioscler Thromb vasc biol*, 21, 1955-1961

102. Women's Health initiative Study Group, Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women : principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial (2002). *JAMA*, 288, 321-333.

103. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women : Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) research group (1998). *JAMA*, 280, 605-613.

104. Adams MR, McCredie R, Jessup W, Robinson J, Sullivan D, Celermajer DS. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilatation and reduces monocyte adhesion to endothelial cells in young men with coronary artery disease (1997). *Artherosclerosis*, 129, 261-269.

105. Lerman A, Burnett JCJ, Higano ST, McKinley LJ, Holmes DRJ. Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans (1998). *Circulation*, 97, 2123-2128.

106. Heitzer T, Krohn K, Albers S, Meinertz T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with type II diabetes mellitus (2000). *Diabetologia*, 43, 1435-1438.

107. Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Garrett LA, Creager MA. Inhibition of protein kinase C-beta prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans (2002). *Circ Res*, 90, 107-111.

108. Chenevard R, Hurlimann D, Bechir M, Enseleit F, Spieker L, Hermann M, Riesen W, Gay S, Gay RE, Neidhart M, Michel B, Luscher TF, Noll G, Ruschitzka F. Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery disease (2003). *Circulation*, 107, 405-409.

109. Kichuk MR, Seyedi N, Zhang X, Marboe CC, Michler RE, Addonizio LJ, Kaley G, Nasjletti A, Hintze TH. regulation of nitric oxide production in human coronary microvessels and the contribution of local kinin formation (1996). *Circulation*, 94, 44-51.

110. Drexler H, Hayoz D, Munzel T, Horning B, Just H, Brunner HR, Zelis R. endothelial function in chronic congestive heart failure (1992). *Am. J. cardiol.*, 69, 1596-1601.

111. Wang J, Seyedi N, Xu XB, Wolin MS, Hintze TH. Defective endothelium-mediated control of coronary circulation in conscious dogs after heart failure (1994). *Am. J. Physiol.*, 266, H670-H680.

112. Antonov AS, Nokolaeva MA, Klueva TS, Romanov YA, Babaev VR, Bystrevskaya VB, Perov NA, Repin VS, Smirnov VN. Primary culture of endothelial cells from atherosclerotic human aorta (1986). *Atherosclerosis*, 59, 1-19.

113. Farber HW, Antonov AS, Romanov YA, Smirnov VN, Scrafo LM, Beer DJ. Cytokine secretion by human aortic endothelial cells is related to degree of atherosclerosis (1992). *Am. J. physiol.*, 262, H1088-H1095.

114. Bacon CR, Cary NRB, Davenport AP. Endothelin peptide and receptors in human atherosclerotic plaques (1973). *Circ Res.*, 79, 794-801.

115. Rush DS, Kerstein MD, Bellan JA, Knoop SM, Mayeux PI, Hyman AL, Kadowitz FJ, McManara DB. Prostacyclin, thromboxane A2 and prostaglandin E2 formation in atherosclerotic human carotid artery (1988). *Atherosclerosis*, 8, 73-78.

116. Lüscher TF, Raij L, Vanhoutte PM. Effect of hypertension and its reversal on endothelium-dependent relaxations in the aorta of the rat (1987). *J Hypertens*, 5 (suppl. 5), 153-155.

117. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magnaga A, Salvetti A. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension (1997). *Hypertension*, 29, 274-279.

118. Taddei S, Viridis A, Mattei P, Ghiadoni L, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. Hypertension causes premature aging of endothelial function in humans (1997). *Hypertension*, 29, 736-743.

119. Lüscher TF. *The Endothelium in Cardiovascular Diseases* (1995). Springer Verlag, Berlin.

120. World Health Organization. The World Health Report 2002 : Preventing risk, promoting healthy life.

121. Vassalli G, Kaufmann P, Villari B, Jakob M, Boj H, Kiowski W, Hess OM. Reduced epicardial coronary vasodilator capacity in patients with left ventricular hypertrophy (1995). *Circulation*, 91, 2916-2923.

122. Dellsperger KC, Marcus ML. The effects of pressure-induced cardiac hypertrophy on the functional capacity of the coronary circulation (1988). *Am J Hypertens*, 1, 200-207.

123. Hittinger L, Shannon RP, Bishop SP, Gelpi RJ, Vatner SF. Subendomyocardial exhaustion of blood flow reserve and increased fibrosis in conscious dogs with heart failure (1989). *Circ Res*, 1989, 65, 971-980.

124. Hittinger L, Shannon RP, Kohin S, Manders WT, Kelly P, Vatner SF. Exercise-induced by experimental renal hypertension (1990). *Circ Res*, 66, 329-343.

125. Wiener J, Giacomelli F, Loud AV, Anversa P. Morphometry of cardiac hypertrophy induced by experimental renal hypertension (1979). *Am J Cardiol*, 44, 919-929.

126. Meerson FZ. On the mechanism of compensatory hyperfunction and insufficiency of the heart (1961). *Cor Vasa*, 3, 161-177.

127. Martin V, Bodo ES. Systolic ventricular dysfunction and heart failure due to coronary microangiopathy in hypertensive heart disease (1995). *Am J Cardiol*, 76, 48D-53D.

128. Anversa P, Ricci R, Olivetti G. Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy : a review (1986). *J Am Coll Cardiol*, 7, 1140-1149.

129. Weber KT, Anversa P, Armstrong PW, Bauer JH, Brilla CG, Burnett JC, Cruickshank JM, Devereux RB, Giles TD, Korsgaard N, Leiver CV, Mendelson FAO, Motz WH, Mulvany MJ, Strauer BE. Remodeling and reparation of the cardiovascular system : an international perspective (1992). *J Am Coll Cardiol*, 20, 3-16.

130. Eghbali M, Blumenfeld OO, Seifter S, Buttrick PM, Leinwand LA, Robinson TF, Kern MA, Giambrone MA. Localisation of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by insitu hybridisation (1989). *J Mol Cell Cardiol*, 21, 103-113.

131. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease : remodeling of the fibrillar collagen matrix (1989). *J Am Coll Cardiol*, 13, 1637-1652.

132. Fujita M, Mikunija A, McUown MD, Franklin D. Regional myocardial volume alterations induced by brief repeated coronary occlusion in conscious dogs (1988). *J Am Coll Cardiol*, 12, 1048-1053.

133. Komaru T, Kanatsuka H, Shirato K. Coronary microcirculation. Physiology and pharmacology (2000). *Pharmacology and Therapeutics*, 86, 217-261.

134. Fulton WFM. Morphology of the myocardial microcirculation. In H. Tillmanns, W. Kübler, H. Zebe (Eds.), *Microcirculation of the heart : Theoretical and clinical problems* (pp. 15-24). Berlin, Heidelberg, New York : Springer-Verlag.

135. Kuo L, Chilian WM, Davis MJ. Coronary arteriolar myogenic response is independent of endothelium (1990). *Circ Res*, 66, 860-866.

136. Davis MJ. Microvascular control of capillary pressure during increases in local arterial and venous pressure (1988). *Am J Physiol*, 254 (4Pt 2), H772-H784.

137. Kuo L, Davis MJ, Chilian WM. Myogenic activity in isolated subepicardial and subendocardial coronary arterioles (1988). *Am J Physiol*, 255 (6 Pt 2), H1558-H1562.

138. Nakayama K, Osol G, Halpern W. Reactivity of isolated porcine coronary resistance arteries to cholinergic and adrenergic drugs and transmural pressure changes (1988). *Circ Res*, 52, 741-848.

139. Liao JC, Kuo L. Interaction between adenosine and flow-induced dilation in coronary microvascular network (1997). *Am J Physiol*, 272 (4 Pt 2), H1571-H1581.

140. Koyanagi S, Eastham CL, Harrison DG, Marcus ML. Transmural variation in the relationship between myocardial infarct size and risk area (1982). *Am J Physiol*, 242, H867-H874.

141. Meininger GA, Zawieja DC, Falcone JC, Hill MA, Davey JP. Calcium measurement in isolated arterioles during myogenic and agonist stimulation (1991). *Am J Physiol*, 261 (3 Pt 2), H950-H959.

142. Hill MA, Meininger GA. Calcium entry and myogenic phenomena in skeletal muscle arterioles (1994). *Am J Physiol*, 267 (3 Pt 2), H1085-H1092.

143. Bowles DK, Hu Q, Laughlin MH, Sturek M. Heterogeneity of L-type calcium current density in coronary smooth muscle (1997). *Am J Physiol*, 273 (4 Pt 2), H2083-H2089.



144. Davis MJ, Donovitz JA, Hood JD. Stretch-activated single-channel and whole-cell currents in vascular smooth muscles (1992). *Am J Physiol*, 262 (4 Pt 1), C1083-C1088.

145. Narayanan J, Imig M, Roman RJ, Harder DR. Pressurization of isolated renal arteries increases inositol triphosphate and diacylglycerol (1994). *Am J Physiol*, 266 (5 Pt 2), H1289-H1293.

146. Miller FJ, Jr, Dellsperger KC, Gutterman DD. Myogenic constriction of human coronary arterioles (1997). *Am J Physiol*, 273, (1 Pt 2), H257-H264.

147. Kauser K, Clark JE, Masters BS, Ortiz de Montellano PR, Ma YH, Harder DR, Roman RJ. Inhibitors of cytochrome P-450 attenuate the myogenic response of dogs renal arcuate arteries (1991). *Circulation*, 92, 511-517.

148. Mogford JE, Davis GE, Platts SH, Mininger GA. Vascular smooth muscle  $\alpha\beta_3$  integrin mediates arteriolar vasodilation in response to RGD peptide (1996). *Circ Res*, 79, 821-826.

149. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction (1995). *Physiol Rev*, 75, 519-560.

150. Tanaka M, Fujiwara H, Onodera T, Wu DJ, Matsuda M, Hamashima Y, Kawai C. Quantitative analysis of narrowings of intramyocardial small arteries in normal hearts, hypertensive hearts and hearts with hypertrophic cardiomyopathy (1987). *Circulation*, 75, 1130-1139.

151. Vitullo JC, Penn MS, Rakusan K, Wicker P. Effects of hypertension and aging on coronary arteriolar density (1993). *Hypertension*, 21, 406-414.

152. Schwartzkopff B, Motz W, Frenzel H, Vogt M, Knauer S, Strauer BE. Structural and functional alterations of the intramyocardial coronary arterioles in patients with arterial hypertension (1993). *Circulation*, 88, 993-1003.

153. Harrison DG, Florentine MS, Brooks LA, Cooper SM, Marcus ML. The effect of hypertension and left ventricular hypertrophy on the lower range of coronary autoregulation (1988). *Circulation*, 77, 1108-1115.

154. Ghaleh B, Hittinger L, Kim SJ, Kudej RK, Iwase M, Uechi M, Berdeaux A, Bishop SP, Vatner SF. Selective large coronary endothelial dysfunction in conscious dogs with chronic coronary pressure overload (1998). *Am J Physiol*, 274, H539-H551.

155. Nava E, Farré AL, Moreno C, Casado S, Moreau P, Cosentino F, Lüscher TF. Alterations to the nitric oxide pathway in the spontaneously hypertensive rat (1998). *J Hypertens*, 16, 609-615.

156. Crabos M, Coste P, Paccalin M, Tariosse L, Daret D, Besse P, Bonoron-Adèle S. Reduced basal NO-mediated dilation and decreased endothelial NO-synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats (1997). *J Mol Cell Cardiol*, 29, 55-65.

157. Matsuoka H, Itoh S, Kimoto M, Kohno K, Tamai O, Wada Y, Yasukawa H, Iwami G, Okuda S, Imaizumi T. Asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in experimental hypertension (1997). *Hypertension*, 29 (1Pt 2), 242-247.

158. Chilian WM, Layne SM. Coronary microvascular responses to reductions in perfusion pressure. Evidence for persistent arteriolar vasomotor tone during coronary hypoperfusion (1990). *Circ Res*, 66, 1227-1238.

159. Sellke FW, Armstrong ML, Harrison DG. Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates (1990). *Circulation*, 81, 1586-1593.

160. Lamping KG, Piegors DJ, Benzuly KH, Armstrong ML, Heistad DD. Enhanced coronary vasoconstrictive response to serotonin subsides after removal of dietary cholesterol in atherosclerotic monkeys (1994). *Arterioscler Thromb*, 14, 951-957.

161. Egashira K, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Imou T, Takeshita A. Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia (1994). *Circulation*, 89, 2519-2524.

162. Bode-Boger SM, Boger RH, Kienke S, Junker W, Frolich JC. Elevated L-arginine/dimethylarginine ration contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits (1996). *Biochem Biophys Res Commun*, 219, 598-603.

163. Ferron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of calveolin and endothelial nitric oxide synthase (1999). *J Clin Invest*, 103, 897-905.

164. Factor SM, Okun EM, Minase T. Capillary microaneurysms in the human diabetic heart (1980). *N Engl J Med*, 302, 384-388.

165. Yarom R, Zirkin H, Stammlier G, Rose AG. Human coronary microvessels in diabetes and ischemia :morphometric study of autopsy material (1992). *J Pathol*, 166, 780-788.

166. Kersten JR, Brooks LA, Dellaperger KC. Impaired microvascular response to graded coronary occlusion in diabetic and hyperglycemic dogs (1995). *Am J Physiol*, 268 (4 Pt 2), H1667-H1674.

167. Matsunaga T, Okumura K, Ishizaka H, Tsunoda R, Tayama S, Tabuchi T, Yasue H. Impairment of coronary blood flow regulation by endothelium-derived nitric oxide in dogs with alloxan-induced diabetes (1996). *J Cardiovasc Pharmacol*, 28, 60-67.

168. Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptecar E, Attali JR. Impairment of coronary vascular reserve and Ach-induced coronary vasodilation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function (1993). *Diabetes*, 42, 1017-1025.

169. Ghaleh B, Hittinger L, Kim SJ, Kudej RK, Iwase M, Uechi M, Berdeaux A, Bishop SP, Vatner SF. Selective large coronary endothelial dysfunction in conscious dogs with chronic coronary pressure overload (1998). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 274, H539-H551.

170. Symon JD, Gunawardena S, Kappagoda CT, Dhond MR. Volume overload left ventricular hypertrophy : effects on coronary microvascular reactivity in rabbits 2001. *Exp Physiol*, 86.6, 725-732.

171. Hahan T. The importance of left ventricular hypertrophy in human hypertension (1998). *J Hypertens*, 16 (Suppl. 7), S23-S29.

172. Aeschbacher BC, Hutter D, Fuhrer J, Weidmann P, Delacretaz E, Allemann Y. Diastolic dysfunction precedes myocardial hypertrophy in the development of hypertension ( 2001). *Am J Hypetens*, 14, 106-113.

173. Ikonomidis I, Tsoukas A, Parthenakis F, Gournizakis A, Kassimatis A, Rallidis L, Nihoyannopoulos P. Four years follow up of aortic valve replacement for isolated aortic stenosis : a link between reduction in pressure overload, regression of left ventricular hypertrophy, and diastolic function (2001). *Heart*, 86, 309-316.
174. Malo O, Carrier M, Shi YF, Tardif JC, Tanguay JF, Perrault LP. Specific alterations of endothelial signal transduction pathways of porcine epicardial coronary arteries in left ventricular hypertrophy (2003). *J Cardiovasc Pharmacol*, 42, 275-286.
175. Bohr DF. Reactivity of smooth muscle from normal and hypertensive rats : effects of several cations (1974). *Fed Proc*, 33, 127-132.
176. Mulvany Mj, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats (1977). *Circ Res*, 41, 19-26.
177. Halpern W, Osol G, Coy GS. Mechanical behaviour of pressurized in vitro prearteriolar vessels determined with a video system (1984). *Ann Biomed Eng*, 12, 463-479.
178. Savage, D.D., Garrison, R.J., Kannel, W.B., Levy, D., Anderson, S.J., Stokes, J., Feinleib, M. & Castelli, W.P. The spectrum of left ventricular hypertrophy in a general population sample : the Framingham study (1987). *Circulation*, 75 (Suppl A), 126-133.
179. Pichard, A.D., Gorlin, R., Smith, H., Ambrose, J. & Meller, J. Coronary flow studies in patients with left ventricular hypertrophy of the hypertensive type. Evidence for an impaired coronary vascular reserve (1981). *Am. J. Cardiol.*, 47, 547-553.

180. Marcus, M.L., Doty, D.B., Hiratzka, L.F., Wright, C.B. & Eastham, C.L. A mechanism for angina pectoris in patients with aortic stenosis and normal coronary arteries (1982). *N. Engl. J. Med.*, 307, 1362-1367.

181. Opherk, D., Mall, G., Zebe, H., Schwartz, F., Weihe, E., Manthey, J. & Kubler, W. Reduction of coronary reserve : a mechanism for angina pectoris in patients with arterial hypertension and normal coronary arteries (1984). *Circulation*, 69, 1-7.

182. Taniyama Y, Griending KK. Reactive oxygen species in the vasculature. Molecular and cellular mechanism (2003). *Hypertension*, 23, 8019-8029.

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

184. Treasure CB, Manoukian SV, Klien JL, Vita JA, Nabel EG, Renwick GH, Selwyn AP, Alexander RW, Ganz P. Epicardial coronary responses to acetylcholine are impaired in hypertensive patients (1992). *Circ. Res.*, 71, 777-781.

185. Egashira K, Suzuki S, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Imaizumi T, Takeshita A. Impaired endothelium-dependent vasodilation of large epicardial and resistance coronary arteries in patients with essential hypertension (1995). *Hypertension*, 25, 201-206.

186. Malo O, Carrier M, Shi YF, Tardif JC, Tanguay FF, Perrault LP. Specific alterations of endothelial signal transduction pathways of porcine epicardial coronary arteries in left ventricular hypertrophy (2003). *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 42, 275-286.

187. Perrault LP, Birouard JP, Janiack P, Villeneuve N, Bruneval P, Vilaine JP, Vanhoutte PM. Impairment of G-protein-mediated signal transduction in the porcine

coronary endothelium during rejection after heart transplantation (1999). *Cardiovasc Res*, 43, 457-470.

188. Adeagbo ASO, Triggle CR. Varying extracellular [K<sup>+</sup>]: a functional approach to separating EDHF- and EDNO related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed (1993). *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 21, 423-429.

189. Beny JL, Schaad O. An evaluation of potassium ions as endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries (2000). *Br. J. Pharmacol.*, 131, 965-973.

190. Brandes RP, Behra A, Lebherz C, Boger RH, Bode-Boger SM, Phivthong-Ngam L, Mugge A. N(G)-nitro-L-arginine- and indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the rabbit renal artery: effect of hypercholesterolemia (1997). *Atherosclerosis*, 135, 49-55.

191. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries (1998). *Nature*, 396, 269-272.

192. Véquaud P, Thorin E. Endothelial G protein beta-subunits trigger nitric oxide- but not endothelium-derived hyperpolarizing factor-dependent dilation in rabbit resistance arteries (2001). *Circ. Res.*, 89, 716-722.

193. Hein TW, Kuo L. cAMP-independent dilation of coronary arterioles to adenosine. Role of nitric oxide, G proteins, and K<sub>ATP</sub> channels (1999). *Circ. Res.*, 85, 634-642.

194. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle (1994). *Nature*, 368, 850-853.

195. Miyoshi H, Nakaya Y, Moritoki H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K channel of vascular smooth muscle cells (1994). FEBS, 345, 47-49.

196. Yuan XY, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. NO hyperpolarizes pulmonary artery smooth muscle cells and decreases the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration by activating voltage-gated  $K^+$  channels (1996). Proc Natl Acad Sci USA, 93, 10489-10494.

197. Peng W, Hoidal JR, Farrukh IS. Regulation of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel in pulmonary vascular smooth muscle cells : role of nitric oxide (1996). J Appl Physiol, 81, 1264-1272.

198. Li PL, Zou AP, Campbell WB. Regulation of potassium channels in coronary arterial smooth muscle by endothelium-derived vasodilators (1997). Hypertension, 29, 262-267.

199. Bychkov R, Gollasch M, Steinke T, Ried C, Luft FC, Haller H. Calcium-activated potassium channels and nitrate-induced vasodilation in human coronary arteries (1998). J. Pharmacol. Exp. Ther., 285, 293-298.

200. Imamura Y, Tomoike H, Narishige T, Takahashi T, Kasuya H, Takeshita A. Glibenclamide decreases basal coronary blood flow in anesthetized dogs (1992). Am J Physiol, 263 (2 Pt 2), H339-H404.

201. Samaha FF, Heineman FW, Ince C, Fleming J, Balaban RS. ATP-sensitive potassium channel is essential to maintain basal coronary vascular tone in vivo (1992). Am J Physiol, 262 (5 Pt 1), C1220-C1227.



202. Duncher DJ, Van Zon NS, Pavek TJ, Herrlinger SK, Bache RJ. Endogenous adenosine mediates coronary vasodilation during exercise after  $K^+_{ATP}$  channel blockade (1995). *J Clin Invest*, 97, 996-1009.
203. Noma A. ATP-regulated  $K^+$  channels in cardiac muscle (1983). *Nature*, 305, 147-148.
204. Keung EC, Li Q. Lactate activates ATP-sensitive potassium channels in guinea pig ventricular myocytes (1991). *J Clin Invest*, 88, 1772-1777.
205. Davis NW. Modulation of ATP-sensitive  $K^+$  channels in skeletal muscle by intracellular protons (1990). *Nature*, 343, 375-377.
206. Ito H, Tung RT, Sugimoto T, Kobayashi I, Takahashi K, Katada T, Ui M, Kurachi Y. On the mechanism of G protein  $\beta\gamma$  subunit activation of the muscarinic  $K^+$  channel in guinea pig arterial cell membrane : comparison with ATP-sensitive  $K^+$  channel (1992). *J Gen Physiol*, 99, 961-983.
207. Kirsch GE, Codina J, Birnbaumer L, Brown AM. Coupling of ATP-sensitive  $K^+$  channels to A1 receptors by G proteins in rat ventricular myocyte (1990). *Am J Physiol*, 259 (3 Pt 2), H820-H826.
208. Ribalet B, Eddlestone GT. Characterization of the G protein coupling of the somatostatine receptor to the  $K^+_{ATP}$  channel insulin secreting mammalian HIT and RIN cell lines (1995). *J Physiol (Lond)*, 485, 73-86.
209. Nelson MT, Huang Y, Brayden JE, Hesceler J, Standen NB. Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of  $K^+$  channels (1990). *Nature*, 344, 770-773.

210. Kirsch GE, Codina J, Birnbaumer L, Brown AM. Coupling of ATP-sensitive  $K^+$  channels to A1 receptors by G proteins in rats ventricular myocyte (1990). *Am J Physiol*, 259 (3 Pt 2), H820- H826.

211. Baukrowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitz S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppersberg JP, Fakler B. PIPI2 and PIP as determinants for ATP inhibition of  $K_{ATP}$  channels (1998). *Science*, 282, 1141-1144.

212. Murphy ME, Brayden JE. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels (1995). *J Physiol*. 486 ( Pt 1), 47-58.

213. Nguyen TD, Véquaud P, Thorin E. Effects of endothelin receptor antagonists and nitric oxide on myogenic tone and  $\alpha$ -adrenergic-dependent contraction of rabbit resistance arteries (1999). *Cardiovasc Res*, 43, 755-761.

