

Université de Montréal

**Étude de la dysfonction vasculaire mésentérique
dans l'endotoxémie et évaluation des inhibiteurs
des voies du monoxyde d'azote**

**Par
Miguel Chaput, MD**

**Sciences biomédicales
Faculté de médecine**

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître
en Sciences biomédicales**

Août 2003

©Miguel Chaput, 2003



W

4

U58

2006

v.037

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 vasculaire mésentérique
dans l'endotoxémie et évaluation des inhibiteurs
des voies du monoxyde d'azote

présenté par
Miguel Chaput, MD

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Louis P. Perrault, M.D., Ph.D.
président-rapporteur

Raymond Cartier, M.D.
directeur de recherche

Jean-François Latulippe, M.D.
Membre du jury

Résumé

Étude de la dysfonction vasculaire mésentérique dans l'endotoxémie et évaluation des inhibiteurs des voies du monoxyde d'azote

Introduction. La production massive du monoxyde d'azote (NO) observée dans les états inflammatoires engendre des anomalies dans la réactivité des vaisseaux pouvant contribuer à la détérioration hémodynamique. **Objectif.** Développer un modèle d'étude de la réactivité vasculaire mésentérique dans l'endotoxémie et évaluer l'impact de l'inhibition des voies du monoxyde d'azote dans ce modèle. **Méthode.** Des études de réactivité vasculaire ont été effectuées dans une préparation d'intestins isolés (intestin grêle et colon) chez le rat. Les intestins ont été perfusés d'une solution de Krebs-Ringer modifiée et les variations de débit mesurées par sonométrie. Des études immunohistochimiques artérielles ont été effectuées à l'aide d'un anticorps pour l'iNOS. Les études ont été effectuées chez des rats normaux (contrôle, n=9), endotoxémiques (lipopolysaccharides [LPS], 20 mg/kg, n=6), et endotoxémiques pré-traités avec L-NMMA (100 mg/kg, n=6) et aminoguanidine (AMG 100 mg/kg, n=6). **Résultats.** L'évaluation de la contractilité vasculaire avec phényléphrine 10^{-6} a révélé une atteinte significative dans le groupe LPS; cette atteinte n'a pas été observée dans le groupe pré-traité avec L-NMMA et AMG (Δ débit, contrôle: $-13,7 \pm 0,9$ mL/min, LPS: $-6,3 \pm 2,4$ mL/min, $p < 0,001$, LNMMA : $-10,5 \pm 2,3$, $p = ns$, AMG: $11,0 \pm 3,6$ mL/min, $p = ns$). L'évaluation de l'activité de l'iNOS avec L-arginine 10^{-4} , le précurseur du NO, a révélé une activation significative dans le groupe LPS; cette activation a été inhibée dans le groupe AMG (Δ débit, contrôle: $0,4 \pm 0,6$ mL/min, LPS: $4,0 \pm 1,1$ mL/min, $p < 0,0001$, AMG: $1,1 \pm 1,3$ mL/min, $p = ns$). La relaxation engendrée par l'endothélium en réponse à l'acétylcholine 10^{-6} a été abolie dans les groupes LPS; cette réponse a été préservée dans le groupe AMG (Δ débit, contrôle: $8,6 \pm 1,1$ mL/min, LPS: $-0,2 \pm 1,2$ mL/min, $p < 0,001$, AMG: $6,4 \pm 2,1$ mL/min, $p = ns$). **Conclusion.** L'AMG prévient la diminution de la contractilité et de la relaxation engendrée par l'endothélium dans l'endotoxémie. Elle peut donc contribuer à l'intégrité vasculaire et intestinale dans les états inflammatoires associés avec l'activation de l'iNOS.

Mots clés : endotoxémie, réactivité vasculaire, perfusion mésentérique, monoxyde d'azote, aminoguanidine, L-NMMA.

Abstract

Mesenteric vascular reactivity dysfunction in endotoxemia : Evaluation of nitric oxide synthase inhibition

Background. Massive nitric oxide production in septic shock causes vascular reactivity dysfunction that can lead to hemodynamic deterioration. **Objective.** Our objective was to develop a model for the study of mesenteric vascular reactivity in endotoxemia and to evaluate inhibitors of nitric oxide synthesis in this model. **Methods.** Vascular reactivity studies were performed on rat isolated intestines. Those were removed from the animal and perfused with Krebs-Ringer solution. Flow variations were recorded by sonometry. Arterial immunohistochemistry studies were performed using an inducible nitric oxide synthase (iNOS) antibody. Studies were conducted in normal rats (n=9), endotoxemic rats (lipopolysaccharide [LPS], 20 mg/kg, n=6) and endotoxemic rats pre-treated with N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA 100 mg/kg, n=6) and aminoguanidine (AMG 100 mg/kg, n=6). **Results.** Evaluation of vascular contractility with phenylephrine 10⁻⁶ M showed significant impairment in the LPS group which was prevented by L-NMMA and AMG pre-treatment (Δ flow, mL/min, control $-13,7\pm 0,9$, LPS: $-6,3\pm 2,4$, $p<0,001$, L-NMMA $-10,5\pm 2,3$, $p=ns$, AMG $-11,0\pm 3,6$, $p=ns$). Evaluation of iNOS activity by L-arginine 10⁻⁴ M administration showed significant activation in the LPS group and was highly inhibited by AMG (Δ flow, mL/min, control: $0,4\pm 0,6$, LPS: $4,0\pm 1,1$, $p<0,0001$, AMG: $1,1\pm 1,3$, $p=ns$). Endothelium-dependent relaxation with acetylcholine 10⁻⁶ M was blunted in the LPS group and restored by AMG (Δ flow, mL/min, control: $8,6\pm 1,1$, LPS: $-0,2\pm 1,2$, $p<0,001$, AMG: $6,4\pm 2,1$, $p=ns$). **Conclusion.** Aminoguanidine restores vascular contractility and endothelial synthesis of NO in endotoxemia and may contribute to vascular and intestinal integrity in processes associated with iNOS activation.

Key words: endotoxin, vascular reactivity studies, mesenteric perfusion, nitric oxide, aminoguanidine, L-NMMA.

Table des Matières

Introduction	1
Hypothèses et objectifs	14
I- Développement et validation d'un modèle pour l'étude de la réactivité vasculaire mésentérique chez le rat	
Matériel et méthodes	16
Résultats	27
II- Étude de la réactivité vasculaire mésentérique dans l'endotoxémie chez le rat et évaluation des inhibiteurs du monoxyde d'azote	
Matériel et méthodes	29
Résultats	37
Discussion	46
Références	56

Liste des tableaux

Tableau I.	Réponses aux agents vasoactifs avant et après perfusion d'inhibiteurs des voies du NO administrés <i>ex vivo</i> pendant 30 minutes: comparaisons individuelles avant et après la perfusion	44
------------	---	----

Liste des figures

Figure 1.	Voie endothéliale constitutive et voie inductible de synthèse du monoxyde d'azote	4
Figure 2.	Montage expérimental et schéma	18
Figure 3.	Dissection des vaisseaux mésentériques	20
Figure 4a.	Canule aortique	20
Figure 4b.	Canulation de l'aorte au niveau de l'artère mésentérique supérieure et ligature de l'aorte distale avec une hémaclip	20
Figure 5a.	Préparation intestinale explantée	22
Figure 5b.	Chambre d'organes	22
Figure 6.	Courbes de contraction-relaxation des expériences initiales	25
Figure 7.	Étude de réactivité vasculaire mésentérique chez le rat sain	28
Figure 8.	Protocole expérimental de traitement <i>in vivo</i>	30
Figure 9.	Protocole expérimental de traitement <i>ex vivo</i>	35
Figure 10.	Variations de débit en réponse aux agents vasoactifs pour les 6 groupes traités <i>in vivo</i>	38
Figure 11a.	Dosage des nitrites sériques des groupes traités <i>in vivo</i>	40
Figure 11b.	Dosage des nitrates sériques des groupes traités <i>in vivo</i>	40
Figure 12.	Marquage immunohistochimique des artères mésentériques	42
Figure 13.	Réactivité vasculaire avant et après traitement <i>ex vivo</i> avec L-NMMA et AMG	45

Liste des sigles et des abréviations

ACh	acétylcholine
BK	bradykinine
CaM	calmoduline
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
1-3-DAG	1-3-diaminoguanidine
ecNOS	synthase endothéliale constitutive du monoxyde d'azote
GCs soluble	guanylate cyclase
GTP	guanosine triphosphate
IC ₅₀	IC ₅₀ inhibitrice de 50% de l'activité
iNOS	synthase inductible du monoxyde d'azote
IP ₃	inositol triphosphate
KCl	chlorure de potassium
L-arg	L-arginine
L-cit	L-citrulline
L-NAME	N ^G -amino-L-méthylester
L-NMMA	N ^G -monométhyl-L-arginine
LPS	lipopolysaccharide
MMG	monométhylguanidine
NPS	nitroprussiate de sodium
NO	monoxyde d'azote
PBS	<i>formalin phosphate-buffered saline</i>
Phe	phényléphrine
PLC	phospholipase C

*Cet ouvrage est dédié à Rose-Marie,
ma partenaire la plus chère*

Remerciements

Raymond Cartier,

pour conseils et illumination

Louise et Pierre Chaput,

pour support et attentions

Introduction

Le monoxyde d'azote dans l'inflammation induite par le choc endotoxémique

Le choc septique est une entité clinique qui découle d'une atteinte généralisée de la contractilité vasculaire. L'hypotension qui en résulte mène à l'hypoperfusion des organes vitaux puis, s'il elle n'est renversée rapidement, à une dysfonction progressive des systèmes cardiovasculaire, respiratoire, rénal et hépatique. Cette détérioration est maintenant appelée le syndrome de dysfonction multi-systémique et elle est associée à un risque important de décès^{1,2,3}. Dans sa forme sévère, cet état est également associé à une diminution paradoxale de l'utilisation de l'oxygène (O₂) par les cellules hypoperfusées, probablement par un mal fonctionnement du métabolisme aérobie de production du glucose.

Initialement, la bactérie en cause fut considérée comme l'élément clef dans la pathogénèse du choc septique. Cette conception a évolué au cours des deux dernières décennies et, malgré qu'elle soit bien à l'origine de l'état infectieux, la pathogénèse du choc septique dans sa forme sévère est une réponse inflammatoire de l'individu qui devient indépendante de la bactérie. Cette réponse peut en effet persister malgré son éradication, et elle est entretenue par des ensembles de médiateurs de l'inflammation, les cytokines. L'une des principales voies de l'inflammation implique la synthèse du monoxyde d'azote par la synthase

inductible du monoxyde d'azote, l'iNOS (inducible nitric oxyde synthase), une enzyme dont la propre synthèse est stimulée par la présence de certaines cytokines. En activant les voies de l'inflammation, on reconnaît donc maintenant que ces cytokines proinflammatoires sont à la base de la pathogénèse du choc septique^{4,5}.

La synthèse inductible du monoxyde d'azote dans l'endotoxémie

La bactérie gram-négatif possède une enveloppe principalement composée d'un lipopolysaccharide. Lors de la lyse de la bactérie par phagocytose, le processus d'attaque par les cellules immunitaires de l'hôte, ce lipopolysaccharide (LPS), aussi appelé *endotoxine*, est relâché dans l'organisme par voie hématologique.

L'endotoxine peut activer plusieurs cascades inflammatoires chez l'humain et l'animal en induisant l'action de certaines enzymes ou en induisant la synthèse d'enzymes non-régulées, comme c'est le cas pour l'iNOS, une enzyme de synthèse du monoxyde d'azote qui n'est pas présente à l'état sain⁶. Cliniquement, l'endotoxine entraîne des changements délétères sur la physiologie cardiorespiratoire et une acidose métabolique qui s'installent en quelques heures^{7,8,9}. La modulation de ces cascades et l'atténuation de cette puissante réaction de défense de l'organisme est une nouvelle avenue dans le traitement de l'état inflammatoire¹⁰.

L'endotoxine pénètre les tissus vasculaires et son action principale sur les voies du monoxyde d'azote a lieu au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires. Elle

mène à l'induction de la synthèse de l'iNOS, enzyme qui n'est pas présente dans les tissus vasculaires à l'état sain (Figure 1)^{11,12,13}. L'iNOS est synthétisée principalement dans les cellules musculaires lisses mais sa présence dans les cellules endothéliales est décrite¹⁴. L'iNOS produit le monoxyde d'azote et la L-citrulline par lyse de la L-arginine, un acide aminé disponible dans le cytosol.

Contrairement à la synthase endothéliale constitutive du monoxyde d'azote (ecNOS), dont l'action est finement régulée par des médiateurs physiologiques ayant pour intermédiaire le complexe calcium/calmoduline, l'action de l'iNOS est non-contrôlée et donc principalement dépendante de la concentration de la L-arginine, son substrat. L'induction de l'iNOS par l'endotoxine mène donc à la production massive de monoxyde d'azote (NO) dans la paroi vasculaire¹⁵. Ceci explique la vasodilatation par administration de L-arginine et la diminution de la réponse contractile adrénergique à la phényléphrine observées initialement chez les animaux endotoxémiques^{16,17,18,19}. L'administration de L-arginine dans le choc septique chez l'humain produit également une vasodilatation systémique par ce mécanisme²⁰. Le monoxyde d'azote agit comme vasodilatateur local en activant la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) par la guanylate cyclase de la cellule musculaire lisse, ce qui mène à une l'ouverture des canaux potassiques membranaires et entraîne la relaxation musculaire. Cette « vasoplégie » devient

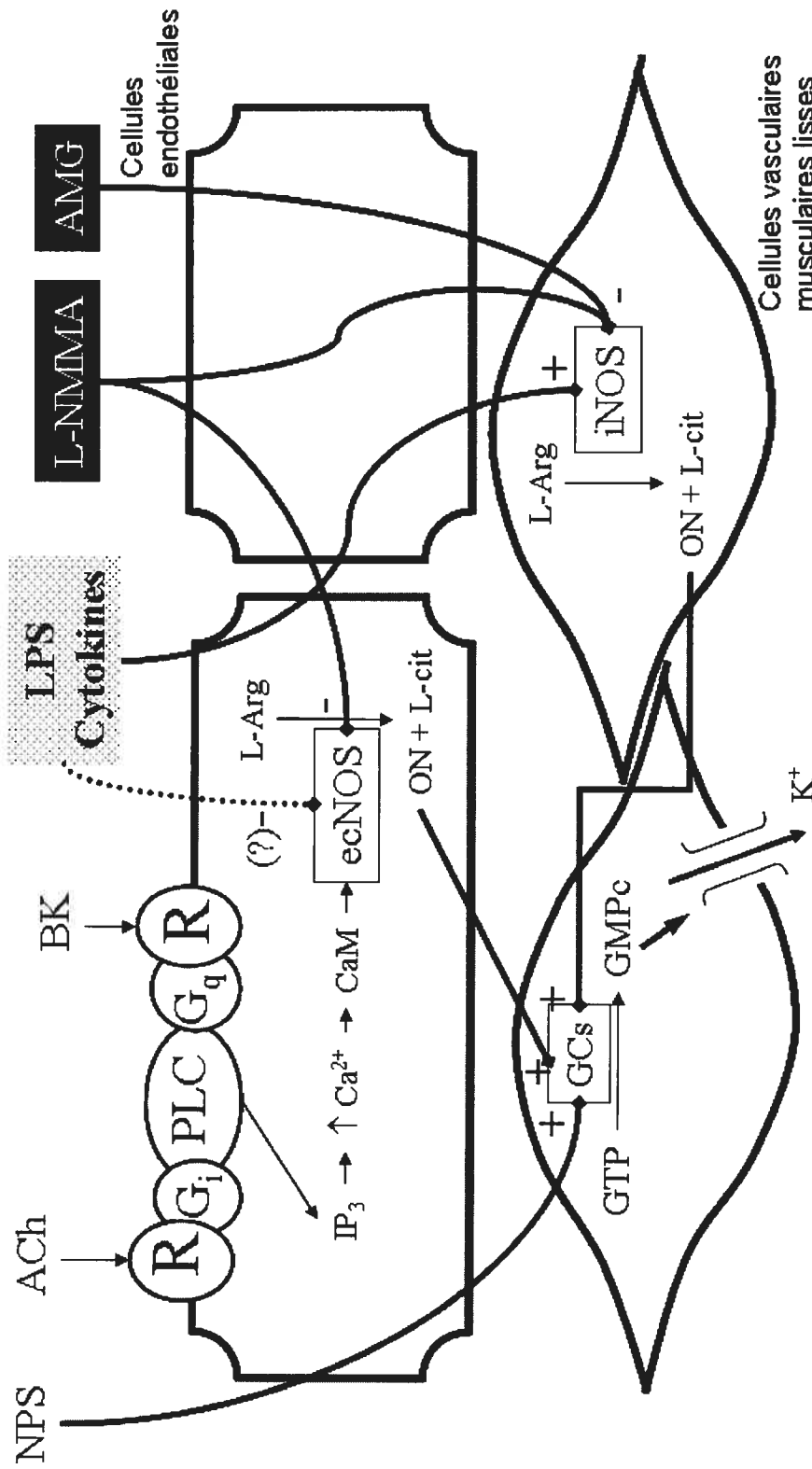


Figure 1. Voie endothéliale constitutive et voie inducible de synthèse de l'oxyde nitrique.

ACh, acétylcholine, AMG, aminoguanidine, BK, bradykinine, CaM, calmoduline, IP₃, ecNOS, synthase endothéliale constitutive de l'oxyde nitrique, GMPC, guanosine monophosphate cyclique, GTP, guanosine triphosphate, GC's, guanylyl cyclase soluble, inositol triphosphate, iNOS, synthase inducible de l'oxyde nitrique, L-arg, L-arginine, L-cit, L-citrulline, LPS, lipopolysaccharide, LNMMA, N^G-monométhyl-L-arginine, NPS, nitroprussiate de sodium, ON, oxyde nitrique, PLC, phospholipase C.

systémique dans l'endotoxémie profonde. La voie inductible du monoxyde d'azote est donc l'une des principales voies responsables du tableau clinique du choc septique^{21,22}. Malgré qu'elle représente vraisemblablement un mécanisme de défense de l'organisme contre l'insulte bactérienne, la surproduction de monoxyde d'azote qu'elle engendre devient délétère en ce qu'elle entraîne une perte de la capacité d'autorégulation du débit sanguin d'un lit vasculaire²³, et ainsi des phénomènes d'ischémie (sous perfusion) ou d'œdème (perfusion exagérée et augmentation de la perméabilité de l'endothélium aux protéines sériques). Les inhibiteurs non-sélectifs du NO aurait un effet délétaire sur la perméabilité de la muqueuse digestive chez le rat²⁴, ce qui suggère un rôle protecteur du NO. Un effet bénéfique du NO sur l'intégrité de la fonction hépatique a également été démontré chez la souris²⁵ : les souris ne possédant pas le gène menant à la transcription de l'iNOS présente une insulte hépatique accrue dans l'ischémie. Cependant, les souris ne possédant pas ce gène présentent une atténuation de la réponse hypotensive dans un modèle d'endotoxémie^{26,27}. L'absence du gène serait également protecteur de la fonction barrière de la muqueuse digestive, ce qui suggère un effet délétère d'une production excessive de NO²⁸.

À l'état sain, la vasodilatation locale est régulée par la synthèse endothéliale constitutive du monoxyde d'azote, l'ecNOS (Figure 1). L'activité de cette enzyme est régulée localement mais elle est également sous l'influence de médiateurs intravasculaires qui agissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques, comme l'acétylcholine (ACh) et la bradykinine (BK). Ces derniers

activent la cascade de la phospholipase C (PLC) par l'intermédiaire des protéines ou récepteurs membranaires G. Plusieurs protéines G ont été identifiées et chaque récepteur possède une affinité spécifique pour certaines d'entre elles.

L'acétylcholine agit par l'intermédiaire des récepteurs muscariniques, principalement le récepteur M_2 au niveau cardiaque et vasculaire²⁹, qui activent certaines fonctions cellulaires en se liant principalement aux protéines G_i . La bradykinine agit via 2 récepteurs (BKB1R et BKB2R)³⁰ qui se lient principalement aux protéines G_q mais également aux protéines G_i avec différentes affinités. La sérotonine est associée à 7 récepteurs membranaires qui se lient aux protéines G_i , G_o , G_q , G_s et G_{q11} , chaque récepteur ayant ses affinités spécifiques³¹. L'inositol triphosphate (IP_3) ainsi produit, génère une augmentation de la concentration calcique et une activation de la calmoduline. Celle-ci active l'ecNOS de façon contrôlée en ce que cette activation est courte et dépendante d'une régénération constante de la cascade. Ainsi, lorsque la stimulation cholinergique cesse, l'ecNOS devient rapidement inactif. Le monoxyde d'azote est ainsi une voie de communication paracrine majeure du tissu vasculaire à l'état sain, transmettant des influences sur le tonus vasculaire. Il est également protecteur des fonctions de la cellule, entre autre par ses effets anti-oxidants et donc cytoprotecteurs^{32,33,34}. Plusieurs agents endogènes, appelés « donneurs de monoxyde d'azote », peuvent ainsi activer l'ecNOS et entraîner la relaxation du muscle lisse. L'endotoxémie mène à une perte de la régulation endothéliale de vasodilatation³⁵. Cet effet a été démontré dans plusieurs lits vasculaires^{36,37,38}. Les mécanismes de cette dysfonction de l'ecNOS demeurent inconnus, la littérature suggérant parfois une

déplétion de L-arginine par consommation accrue de l'iNOS et parfois une inhibition directe de l'ecNOS par l'endotoxine^{39,40}. L'arginase, une enzyme également induite par le choc endotoxémique et pouvant cliver l'arginine pour produire l'ornithine, a également été impliquée dans la déplétion de ce précurseur du monoxyde d'azote⁴¹.

La découverte de l'induction de l'iNOS dans l'endotoxémie et de son importance dans la pathogénèse du choc septique mena rapidement à l'étude de l'iNOS dans d'autres états inflammatoires fréquemment rencontrés en médecine clinique. Notamment, l'induction de l'iNOS a depuis été décrite dans plusieurs états inflammatoires auto-immunitaires, dans le diabète et dans l'inflammation induite par l'utilisation de la circulation extra-corporelle en chirurgie cardiaque^{42,55,59,60}.

La voie inductible du monoxyde d'azote peut être inhibée dans son induction par des inhibiteurs de l'inflammation ou dans son action par les analogues de la L-arginine, agents compétiteurs. Les anti-inflammatoires corticostéroïdiens peuvent bloquer l'induction de la synthèse de l'iNOS en réponse à l'inflammation^{43,44,45}. Malgré leur absence d'action sur les voies constitutives de la réactivité vasculaire (ecNOS)⁴⁶, leur avantage clinique n'a pas été décrit dans la plupart des états d'inflammation, et particulièrement dans les états infectieux. Ceci a été attribué à leur action d'immunosuppression globale : atténuation de la production de leucocytes par la moëlle épinière, inhibition de l'immunité humorale et cellulaire.

La modulation de l'activité de l'iNOS par les analogues de la L-arginine a été décrite dans plusieurs contextes cliniques. La N^G-monométhyl-L-arginine (L-NMMA) est un inhibiteur non-sélectif des synthèses du monoxyde d'azote. Sa puissance d'inhibition de l'ecNOS et de l'iNOS est environ équivalente. Il fut initialement démontré chez le rat endotoxémique qu'elle restaurait les résistances périphériques et la réponse à la stimulation adrénergique^{47,48}. Malgré la démonstration d'une amélioration de la fonction hépatique⁴⁹, son avantage clinique dans l'endotoxémie demeure controversé. Malgré une augmentation des résistances périphériques, une chute du débit cardiaque et des indices abaissés de perfusion des organes cibles ont été démontrés^{50,51}. Ces résultats ont été attribués à l'impact négatif d'une inhibition des voies constitutives du monoxyde d'azote et donc à une perte de son rôle protecteur sur l'intégrité tissulaire et vasculaire dans l'inflammation^{52,53}.

Les inhibiteurs sélectifs de l'iNOS ont été caractérisés *in vitro* par leur action sur les synthèses du monoxyde d'azote du macrophage⁵⁴. Les deux classes principales sont les thiourées et les guanidines, dont la plus puissante est l'aminoguanidine (AMG). La capacité d'inhibition de l'iNOS de cette dernière est aussi puissante que celle du L-NMMA (IC₅₀, AMG 7 µM, L-NMMA 10 µM), mais son affinité pour l'ecNOS 30 fois moins importante. La 1,3-diaminoguanidine (1-3-DAG) est un inhibiteur de l'iNOS 25 fois moins puissant que l'aminoguanidine mais dont l'affinité pour l'ecNOS est minime. La 1-3-DAG est donc l'inhibiteur le plus

sélectif de l'iNOS parmi les guanidines. Certaines guanidines, telle la monométhylguanidine (MMG), n'ont qu'une affinité faible pour les deux enzymes.

Les inhibiteurs des synthèses du monoxyde d'azote ont également été comparés dans certains contextes cliniques, dont l'endotoxémie⁵⁵. Les agents non-sélectifs de l'iNOS ont eu un impact négatif sur la perfusion mésentérique et hépatique⁵⁶. Les inhibiteurs sélectifs de l'iNOS, potentiellement plus physiologiques puisqu'ils préservent l'intégrité du contrôle endothélial du tonus vasculaire, ont été évalués *in vivo*. Une étude chez le rat endotoxémique anesthésié a démontré une diminution des marqueurs de dysfonction multi-systémique avec aminoguanidine en pré-traitement⁵⁷. Dans un modèle murin, l'aminoguanidine a prévenu la synthèse massive du monoxyde d'azote par l'iNOS après 60 minutes d'exposition à la circulation extra-corporelle⁵⁸.

Chez l'humain, plusieurs séries ont démontré l'efficacité du bleu de méthylène, inhibiteur de la guanylate cyclase, dans la restauration des résistances vasculaires périphériques chez des patients en choc réfractaire^{59,60}. Son avantage sur la survie n'a cependant pas été démontré. L'utilisation du L-NMMA semble avoir précipité la défaillance multi-systémique chez le patient en choc septique, ce qui serait potentiellement relié à une baisse de la perfusion des organes cibles par diminution du débit cardiaque et vasoconstriction prononcée des lits vasculaires rénal et splanchnique⁶¹.

La dysfonction endothéliale mésentérique dans le choc relié à l'inflammation

L'induction de l'iNOS a été impliquée dans des pathologies aussi variées que le choc septique, le choc hypovolémique, et le syndrome de réponse inflammatoire systémique^{62,63,64}. La distribution de l'activité de synthèse du monoxyde d'azote et la présence de l'iNOS dans la paroi artérielle du lit mésentérique ont aussi été décrites dans l'inflammation chez l'animal⁶⁵. L'impact de l'induction de l'iNOS sur la réactivité vasculaire mésentérique demeure cependant peu décrit. Cet impact revêt une importance en ce que l'atteinte du lit mésentérique peut entretenir la pathologie inflammatoire. Premièrement, le débit sanguin à l'intestin représentant le quart du débit cardiaque total, une vasodilatation mésentérique peut signifier une baisse de la perfusion des organes vitaux susceptible d'entretenir la défaillance multi-systémique. Ensuite, des phénomènes d'ischémie intestinale locale peuvent affecter la fonction barrière de la muqueuse digestive et, secondairement, mener à une translocation de la flore bactérienne intestinale. Des études récentes ont d'ailleurs démontré une augmentation de la translocation bactérienne dans certains états d'inflammation systémique^{66,67,68}. L'induction de l'iNOS a été mise en cause dans l'augmentation de la translocation bactérienne découlant du choc hémorragique et une diminution de ce phénomène associée à l'administration d'AMG et de N^G-amino-L-méthylester (L-NAME) a récemment été décrite⁶⁹.

La plupart des résultats mentionnés précédemment découlent de travaux ayant étudié la réactivité des artères de premières générations, telles l'aorte, l'artère

mésentérique supérieure et l'artère fémorale. Il s'agit donc d'études des vaisseaux de conductance. Le lit vasculaire mésentérique de résistance demeure peu étudié. Ceci est entre autre relié au fait que la description de la contribution de la malperfusion intestinale au tableau clinique de la réaction systémique inflammatoire est relativement récente mais également au fait qu'il n'existe pas de modèle simple et physiologique permettant d'étudier cette atteinte.

Modèles existants d'étude de la réactivité vasculaire mésentérique

Les études initiales de réactivité vasculaire dans l'endotoxémie ont été réalisées sur des modèles de tension isométrique exercée sur des anneaux vasculaires isolés. Dans ces modèles, l'aorte d'un rat, par exemple, est disséquée et coupée en courts segments qui sont placés sous tension dans des bains de solution physiologique oxygénée. La tension est générée par deux tuteurs métalliques fins et un capteur détermine les variations de tension qu'exerce l'anneau en réponse à divers agents vasoactifs. Ce modèle a été validé pour l'étude de la réactivité vasculaire dans plusieurs contextes cliniques, dont l'endotoxémie.

Il possède cependant plusieurs limitations. Premièrement, il exige que les vaisseaux étudiés soient d'un certain calibre (au moins 0,5 à 1 mm), ce qui limite son utilisation à l'étude des lits de conductance ou aux artères de résistance de toute première génération. Ces lits de conductance (aorte et troncs vasculaires proximaux) contribuent peu à la résistance vasculaire, celle-ci étant générée

principalement par les artères de petit calibre et les artérioles. Ces vaisseaux sont trop petits pour être étudiés dans des modèles de tension isométrique. L'utilisation de vaisseaux mésentériques de 3^e génération (100 à 200 μm) est rapportée : la sensibilité des résultats et la réponse même aux agents vasoactifs est très influencée par les conditions de montage de ces anneaux extrêmement fragiles^{70,71}.

Le modèle murin décrit par McGregor en 1965 est encore utilisé aujourd'hui dans des études de résistance vasculaire⁷². Ce modèle implique une dissection du lit vasculaire mésentérique dans laquelle l'artère mésentérique supérieure est canulée et l'intestin réséqué pour ne garder que le mésentère. Le lit vasculaire est ensuite perfusé à débit constant de 2 à 6 mL/min (pour des animaux de 200 à 400 g) et les variations de pression dans le lit artériel sont mesurées. Pour générer des résultats reproductibles, la préparation vasculaire doit être pré-contractée avec KCl ou phényléphrine de façon à générer des variations de tension suffisantes pour interprétation. Cela implique que le débit de perfusion doit être ajusté à des valeurs infra-physiologiques, le débit mésentérique normal d'un rat de 300 g étant d'environ 30 à 40 mL/min⁷³. Ce modèle implique également qu'une grande partie du lit de résistance soit exclue puisque l'intestin, ses artérioles et son réseau veineux sont réséqués, ceux-ci contribuant à la résistance et à la capacitance vasculaire mésentérique, tel que démontré par Warner⁷⁴. L'exclusion de l'intestin implique également que les interactions entre l'organe et son lit vasculaire ne sont pas étudiées. Les groupes ayant étudié l'impact de l'endotoxémie sur les voies du

monoxyde d'azote au niveau mésentérique et utilisant ce modèle ont rapporté des résultats parfois contradictoires^{75,76}.

Les artères de résistance ont été étudiées récemment dans des modèles de vidéo microscopique dans lesquels des vaisseaux inférieurs à 200 μM sont isolés et placés dans des médiums permettant de les exposer à des agents vasoactifs⁷⁷. Les désavantages de ce modèle sont qu'il exige un équipement contraignant et sophistiqué et une préparation coûteuse et exigeante sur le plan technique. Il implique également, comme le modèle d'anneau vasculaire, l'étude d'un vaisseau isolé, éloigné de l'organe lui-même.

Certains modèles de perfusion intégrale de l'intestin ont été validés chez le rat. L'un d'eux développé par le groupe de Jackson et al. implique une perfusion in vivo par une pompe péristaltique⁷⁸. Intéressant puisqu'il reproduit bien l'état physiologique, mais ce modèle est peu utilisé car il implique une préparation longue et complexe. Lorsque comparé au modèle de perfusion in vitro de McGregor, Jackson et al. avaient démontré un effet inverse de la prostaglandine E_2 sur la contractilité à la phényléphrine, ce qui démontre l'ampleur de l'impact de l'isolation du lit artériel mésentérique sur les phénomènes de réactivité vasculaire de base.

Hypothèses et objectifs

I- Développement et validation d'un modèle d'étude de la réactivité vasculaire mésentérique chez le rat

Notre premier objectif était de développer et de valider un modèle d'étude de la réactivité vasculaire mésentérique qui permettrait de décrire l'atteinte de l'intégrité vasculaire de l'intestin dans l'état inflammatoire. Ce modèle devrait posséder les qualités suivantes : reproduction de l'état physiologique de la perfusion intestinale, reproductibilité élevée, facilité d'exploitation (simplicité et rapidité, coût faible).

Ce modèle devait donc impliquer que le lit vasculaire mésentérique soit étudié à pression et débit de perfusion s'apparentant à l'état *in vivo*. Il devait impliquer que l'entité mésentère-intestin (intestin grêle et colon) soit maintenue intacte dans la mesure du possible afin d'inclure dans le lit de résistance les artérioles et le lit veineux, et afin de préserver les interactions entre le lit vasculaire et son tissu de soutien.

II- Étude de la réactivité vasculaire mésentérique dans l'endotoxémie

IIa. Description de l'atteinte vasculaire mésentérique dans l'endotoxémie

Notre deuxième objectif était de décrire la capacité de vasoconstriction et de vasorelaxation du lit mésentérique dans le cadre de ce modèle pour l'état sain et dans l'état inflammatoire qu'est l'endotoxémie profonde. Le mécanisme ciblé pour ces études est celui des voies du monoxyde d'azote, impliquant donc une évaluation de l'activité de ces deux enzymes de synthèse au niveau intestinal, l'ecNOS et l'iNOS.

IIb. Impact des inhibiteurs sélectifs et non-sélectifs du monoxyde d'azote sur la réactivité vasculaire dans l'endotoxémie

Notre troisième objectif était de décrire la capacité d'inhibiteurs connus des voies du monoxyde d'azote à restaurer la physiologie vasculaire dans l'endotoxémie. Les agents étudiés seront les inhibiteurs non-sélectifs des voies du monoxyde d'azote et les inhibiteurs sélectifs de l'iNOS. Ces agents seront étudiés lorsqu'administrés de façon précoce (avant l'induction du choc) et de façon tardive (après instauration de l'état de choc), pour déterminer si le traitement permet de prévenir la dysfonction vasculaire mais également de restaurer la physiologie vasculaire d'un sujet atteint.

I- Développement et validation d'un modèle pour l'étude de la réactivité vasculaire mésentérique chez le rat

Matériel et méthodes

Modèle de perfusion mésentérique

Animaux et manipulations. Des rats Sprague-Dawley de 300 g ont été choisis pour ces expériences. Faciles à manipuler, ces animaux ont un débit mésentérique moyen variant de 30 à 40 mL/min. Ce débit est facilement compatible avec un système de tubulure standard (1/4") et les sondes à ultrasons adaptées à ces débits ont une précision adéquate (± 1 mL/min, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, É.-U.). Une expérience de 60 minutes ne nécessite qu'environ 2 L de solution de Krebs-Ringer modifiée. Une anesthésie intra-musculaire avec kétamine 75 mg/kg et xylozine 5 mg/kg a été choisie. Ces médicaments ont une action rapide et un impact hémodynamique relativement restreint. Pour éviter les phénomènes thrombotiques liés à la manipulation des vaisseaux mésentériques pendant la procédure, une anticoagulation systémique avec héparine 5 mg/kg en intra-musculaire a été administrée. Les expériences préliminaires ayant servi au développement du modèle et à la détermination des dosages, des agents vasoactifs ont été injectés chez 10 animaux sains. Les expériences de description de la réactivité vasculaire mésentérique chez le rat sain ont ensuite été effectuées chez 9 animaux (groupe contrôle, n=9).

Modèle de perfusion mésentérique. Afin d'obtenir un état de perfusion de l'intestin se rapprochant le plus possible de l'état physiologique, un modèle de perfusion par gravité à pression constante a été choisi. Ce modèle s'inspire de la préparation cardiaque de Langendorff. L'intestin (intestin grêle et colon) a donc été perfusé d'une solution physiologique (voir ci-bas) contenue dans un réservoir situé 80 cm au-dessus de l'organe (Figure 2). La pression de perfusion est donc de 80 cmH₂O, ce qui correspond à peu près à la tension artérielle moyenne de l'animal, d'environ 80 mmHg. Ce réservoir se déverse par gravité dans une chambre de déaération à deux entrées qui permet d'alterner la source de solution entre deux réservoirs sans interrompre la perfusion. Cette chambre est reliée à l'organe par une tubulure au bout de laquelle est insérée une canule adaptée à l'aorte de l'animal (environ 1,5 mm de diamètre). Elle permet d'alterner la source de solution de perfusion entre un réservoir principal et un réservoir alternatif contenant la phényléphrine. Les agents vasodilatateurs sont administrés par une tubulure latérale branchée à un pousse-seringue automatique à débit réglable. Le débit de ces perfusions est ajusté à 1/100^e du débit total au moment de débiter l'administration de chaque agent. Dans cette dernière tubulure est intercalé un débitmètre cylindrique à ultrasons de 3 mm de diamètre (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, É-U). L'appareil est relié à un polygraphe précalibré (Gould Instruments, OH, USA) permettant d'inscrire les courbes de débit sur du papier millimétrique.

Instruments, OH, USA) permettant d'inscrire les courbes de débit sur du papier millimétrique.

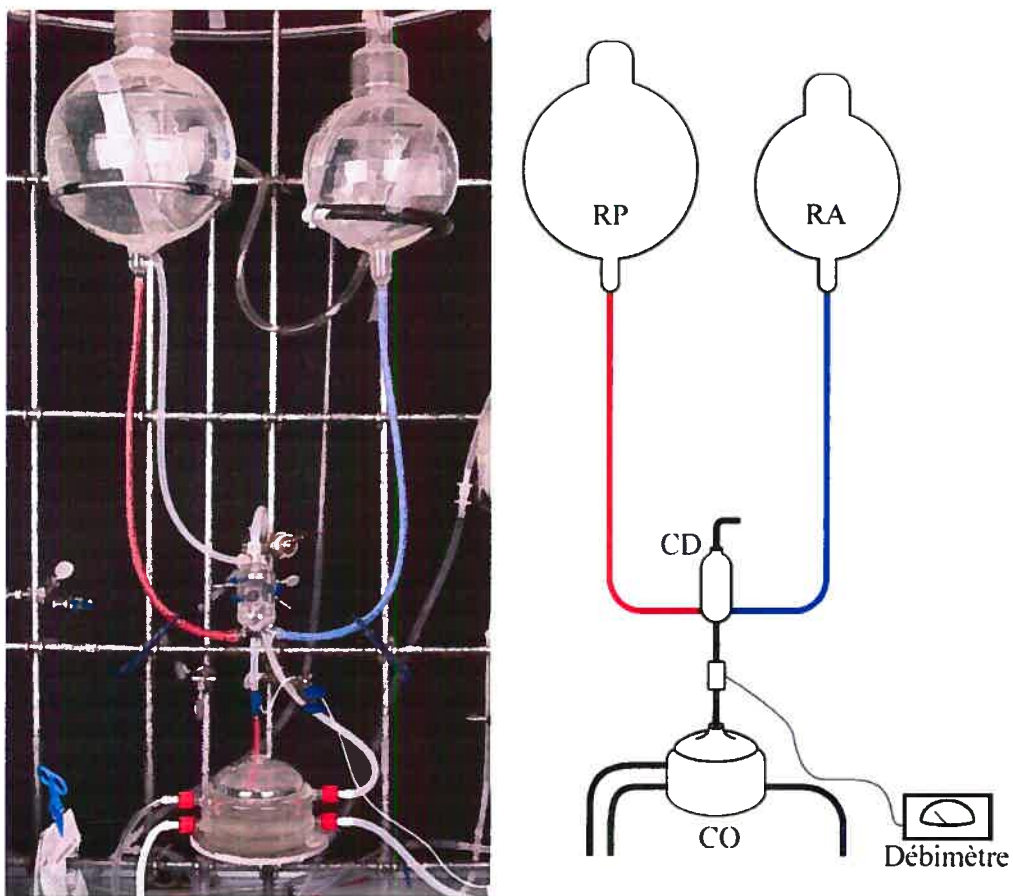


Figure 2. Montage expérimental et schéma. RP, réservoir principal, RA, réservoir alternatif (Krebs-Ringer modifié + phényléphrine 10-6), CD, chambre de déaération, CO, chambre d'organe.

Préparation intestinale. Pour relier l'intestin au système de perfusion, une procédure d'explantation a été développée. Cette procédure devait permettre de perfuser l'intestin de solution physiologique *immédiatement* après l'arrêt de la perfusion sanguine chez l'animal anesthésié.

Les animaux sont mis à jeun 12 heures avant l'expérience pour obtenir un intestin relativement vide. Après anesthésie et anticoagulation, l'animal est placé sur une table de dissection située 80 cm sous un réservoir de solution physiologique et à moins de 2 mètres du montage de perfusion mésentérique décrit ci-haut. Une laparotomie médiane est effectuée. L'aorte abdominale est disséquée et l'artère mésentérique supérieure (AMS) est identifiée (Figure 3). L'aorte est ligaturée en dessous de l'AMS et une canule de perfusion est insérée dans l'aorte au niveau de l'AMS par une incision latérale longitudinale (Figure 4b). Cette canule était préalablement reliée au réservoir de perfusion. L'œsophage, le rectum et les vaisseaux portes sont ligaturés et sectionnés et une canule est insérée dans la veine porte (Figure 5a). Cette canule permet d'orienter le retour du liquide effluent, d'en effectuer facilement des prélèvements et d'empêcher une congestion veineuse. L'organe est ensuite explanté en bloc et placé dans la chambre d'organe après avoir été pesé (Figure 5b). Le transfert est effectué en quelques secondes, l'organe étant toujours perfusé. Le changement de la tubulure de transfert à la tubulure du montage expérimental est effectué en prenant soin de rincer toutes les parties des tubes de perfusion afin d'éviter le passage de bulles d'air. L'organe a initialement été baigné dans la solution d'effluent. Un exemple des courbes de contraction-

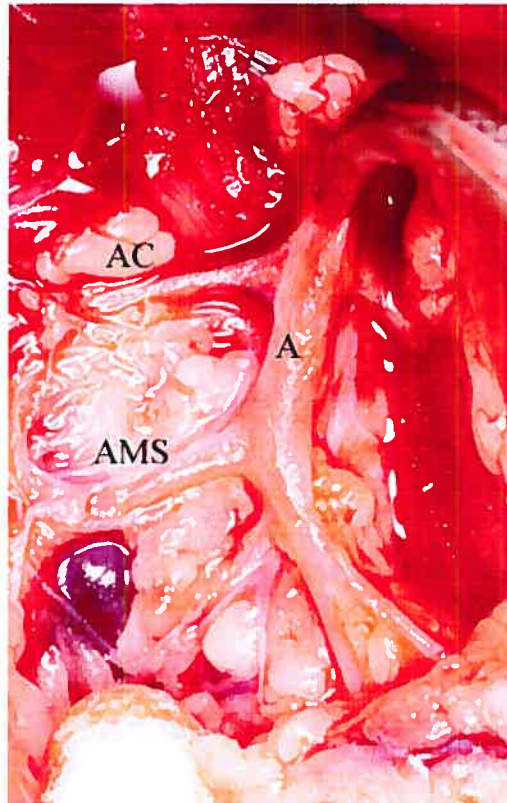


Figure 3. Dissection des vaisseaux mésentériques . A, aorte, AMS, artère mésentérique supérieure, AC, artère célique.

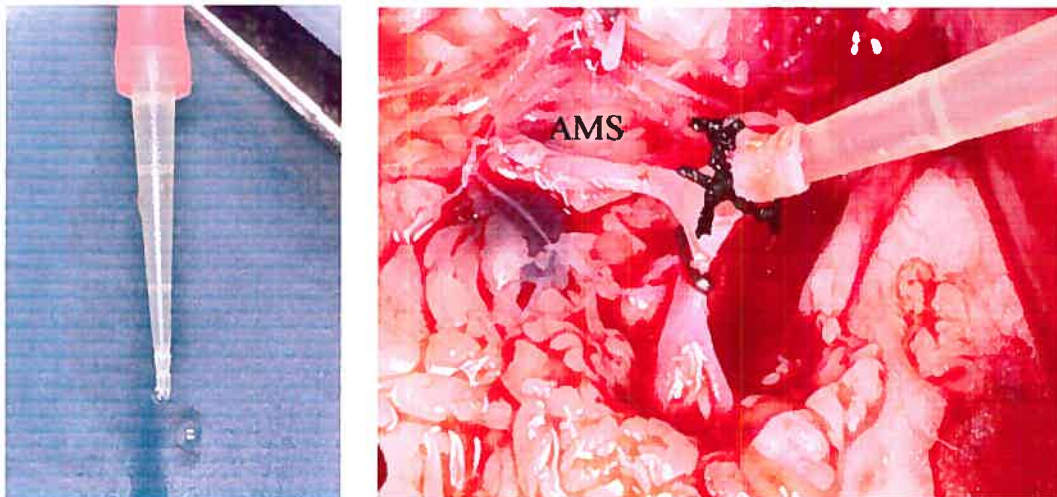


Figure 4. a) Canule aortique. b) Canulation de l'aorte au niveau de l'artère mésentérique supérieure et ligature de l'aorte distale avec une hémaclip. AMS, artère mésentérique supérieure

relaxation avec phényléphrine à ce moment est illustré dans la figure 6 (voir *Résultats*). L'organe a été pesé après l'expérience pour quantification de l'oedème.

Après le prélèvement de l'organe, les animaux sont sacrifiés à l'aide d'une dose létale de pentobarbital. La manipulation et le traitement des animaux dans le cadre de cette étude ont été approuvés par le comité d'éthique sur l'utilisation des animaux de laboratoire du Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal.

Développement de la chambre d'organe. Lors des expériences initiales, les débits basaux avant et après contraction n'étaient pas égaux. Une chambre d'organe qui permettrait d'effectuer rapidement un rinçage du liquide d'effluent a été élaborée. L'organe ne subirait pas l'influence des agents vasoactifs accumulés dans le bain. Cette chambre a été confectionnée sur mesure et elle est constituée d'un compartiment interne de 12,0 cm de diamètre et de 5,0 cm de hauteur, et d'une chambre externe de 1,0 cm de largeur (Figure 5b). Elle est donc adaptée à l'intestin d'un animal d'environ 300 g. La chambre interne est reliée par un port d'entrée situé au fond de la chambre à un réservoir de Krebs-Ringer modifié. Le port de sortie est situé près du rebord supérieur de la chambre. Ce système permet de faire baigner l'organe dans la solution physiologique et de rincer la chambre au besoin afin d'éviter que l'organe ne subisse l'influence d'agents vasoactifs accumulés dans le bain. La chambre externe est reliée à un bain thermostatique réglé à 37 C° muni

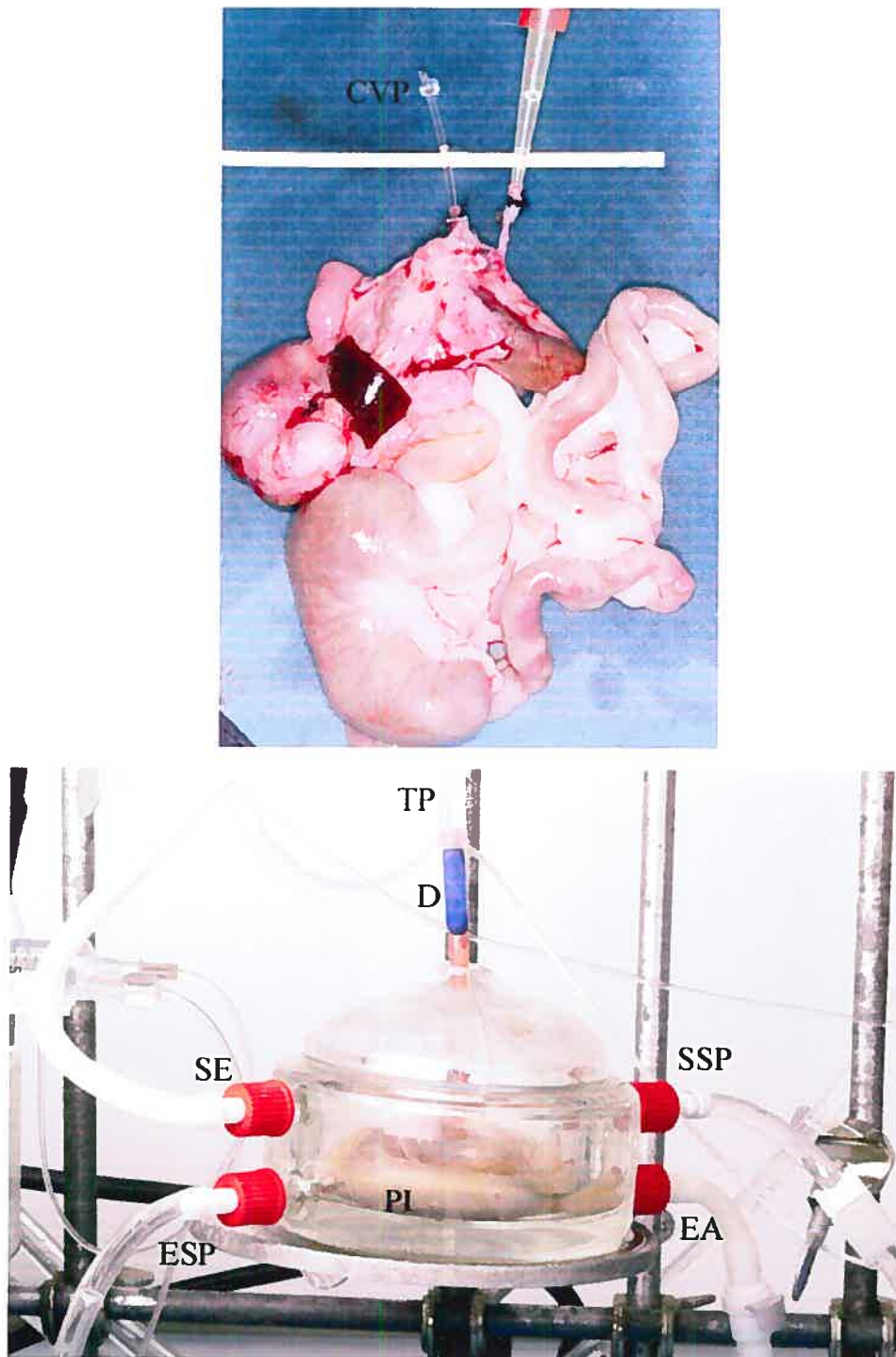


Figure 5. a) Préparation intestinale explantée. Une canule de 1 mm a été installée au niveau de la veine porte, CVP, canule veine porte .
 b) Chambre d'organe. D, diamètre, EE, entrée d'eau 37 C, chambre externe, ESP, entrée de solution physiologique chambre interne, PI, préparation intestinale, SSP, sortie de solution physiologique, chambre interne, SE, sortie eau chambre externe, TP, tubulure de perfusion.

d'une pompe de perfusion continue (3M Health Care Group, Ann Arbor, MI).

Un rinçage du bain d'organes avec Krebs-Ringer s'est avéré nécessaire pour obtenir des stabilisations de débit rapides après les expériences de contraction-relaxation (environ 2 minutes, Figure 6c). Une température constante du liquide baignant l'organe à 37 °C facilitée par l'utilisation d'un couvercle s'est avérée primordiale pour l'obtention de résultats reproductibles.

Choix de la solution physiologique de perfusion. La solution de Krebs-Ringer a été utilisée initialement puisqu'elle est efficace dans le modèle de perfusion cardiaque par gravité de Langendorff. Une concentration de chlorure de calcium de 2,6 mmol/L a été choisie puisqu'elle permettait de générer des contractions de plus grande amplitude qu'à 1,3 mmol/L et puisqu'elle correspond à la concentration sérique chez l'animal. La solution de Krebs-Ringer a donc été modifiée pour les expériences subséquentes : (mmol/L) NaCl 118,3; KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, K₂HPO₄ 1,22, CaCl₂ 2,6, NaHCO₃ 25; dextrose 15,0, pO₂ 95%, pCO₂ 5%, 37 °C.

Choix des agents vasoactifs. Le stimulateur des récepteurs adrénergiques phényléphrine (Phe) a été choisi puisqu'il s'est avéré efficace dans les expériences initiales. Cet agent, utilisé en médecine clinique, est un analogue des agents adrénergiques endogènes adrénaline et noradrénaline. Il agit par stimulation des récepteurs adrénergiques alpha situés au niveau des artères et artérioles de résistance du lit mésentérique. Ces récepteurs sont également présents dans la

paroi des veines mésentériques⁶⁸. Une précontraction avec KCl n'a pas permis d'effectuer des vasodilatations reproductibles. De plus, les effets délétaires du KCl sur la fonction et la viabilité des cellules endothéliales a été étudiée et démontrée^{79,80}. Des concentrations de Phe 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} ont généré des diminutions de débit de 85%, 70% et 50%, respectivement (Figure 6a, Phe 10^{-4}). Une concentration de 10^{-6} a permis d'effectuer une deuxième expérience 15 à 20 minutes plus tard avec résultat reproductible (Figure 6b). Cette concentration a donc été choisie pour les expériences subséquentes.

La présence de l'iNOS a été évaluée par perfusion latérale de la L-arginine (L-arg), son substrat. Une concentration de 10^{-4} a été choisie, concentration maximale compatible avec son utilisation clinique. Des expériences de vasodilatation du lit précontracté à la phényléphrine par activation de l'ecNOS sont ensuite effectuées à l'acétylcholine (ACh). Une vasodilatation normale à l'acétylcholine témoigne de l'intégrité de la cascade de l'ecNOS, impliquant récepteur membranaire, protéine G phospholipase C, calmoduline et l'enzyme elle-même (Figure 1). La concentration d'acétylcholine permettant d'obtenir une restauration du débit à environ 90% de sa valeur initiale a été déterminée, celle-ci étant de 10^{-6} . La première courbe de vasoconstriction/vasodilatation obtenue à ces doses est reproduite à la Figure 6d.

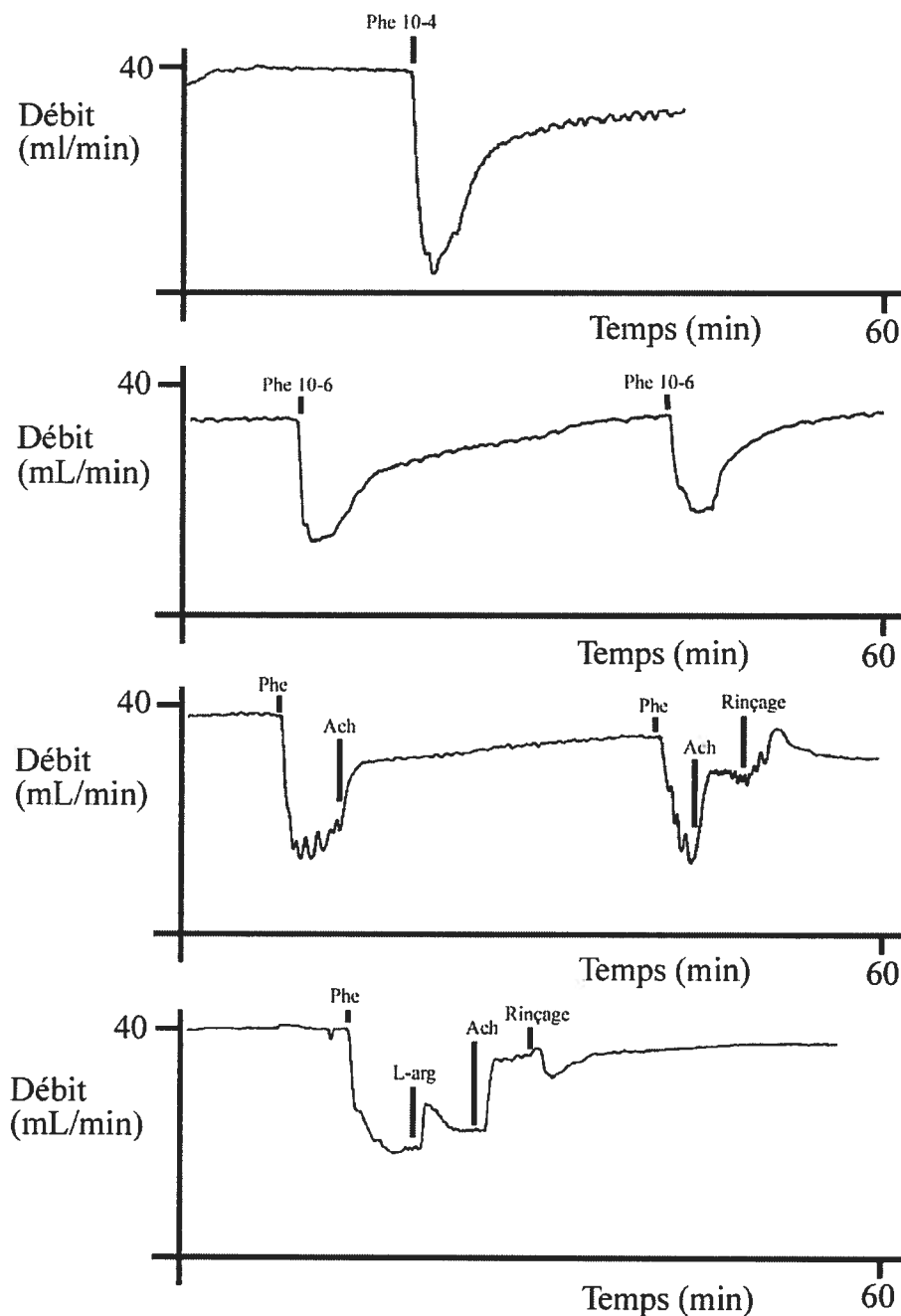


Figure 6. Courbes de contraction-relaxation des expériences initiales. a) contraction avec phényléphrine 10-4. b) contractions répétées avec Phe 10-6. c) contraction-relaxation avec Phe-Ach sans rinçage puis avec rinçage de la chambre d'organe. Le rétablissement du débit de base est plus efficace avec rinçage. d) première contraction relaxation une fois la technique maîtrisée. Phe, phényléphrine, Ach, acétylcholine L-arg, L-arginine.

Des expériences de vasodilatation du lit précontracté à la phényléphrine par activation directe de la GMPc ont finalement été effectuées avec le nitroprussiate de sodium (NPS), un donneur exogène de NO. Cet agent est un agoniste direct de la guanylate cyclase et permet donc de confirmer l'intégrité du muscle lisse après une expérience de réactivité vasculaire avec des agents agissant sur des mécanismes endothéliaux. Contrairement à l'acétylcholine, son action est prolongée et il doit donc être utilisé en fin d'expérience. La concentration minimale permettant de restaurer le débit à environ 100% de sa valeur initiale a donc été déterminée, celle-ci étant de 10^{-6} mmol/L.

Produits et solutions

Toutes les solutions ont été préparées quotidiennement dans l'eau nanopurifiée (filtres nanométriques). La phényléphrine, l'acétylcholine, la L-arginine, le nitroprussiate de sodium, ont été achetés à Sigma Chemicals (St-Louis, MO, É.-U.).

Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en termes de moyenne \pm erreur-type. Une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme étant statistiquement significative.

Résultats

Les expériences préliminaires ont été effectuées sur 19 préparations intestinales provenant d'animaux sains. Un péristaltisme préservé (contractions constantes) a été observé dans la chambre d'organes pour toute la durée des expériences. Le poids moyen de la préparation est passé de 43 ± 5 g au début des expériences à 58 ± 7 g après une heure de perfusion, pour une différence moyenne de 16 ± 4 g.

Les analyses biochimiques et physiologiques qui suivent ont été obtenues chez les 9 derniers animaux (groupe contrôle, $n=9$). L'analyse du liquide affluent révèle une pO_2 à 395 ± 20 mmHg et une pCO_2 à 28 ± 3 mmHg. Les lactates sont indétectables par méthode d'analyse conventionnelle (essai électrochimique après réaction avec le lactate oxidase). L'analyse des liquides effluents révèle une pO_2 de 255 ± 27 mmHg, une pCO_2 de 41 ± 5 mmHg, et un taux de lactate de $0,5 \pm 0,2$ mmol/L.

Les résultats des expériences de réactivité vasculaire sont exprimés à la Figure 7. La réponse de contraction à Phe 10^{-6} a été de $-13,6 \pm 0,9$ mL/min. La vasodilatation à la L-arg 10^{-4} a été de $0,4 \pm 0,6$ mL/min. La vasodilatation à l'ACh 10^{-6} a été de $8,6 \pm 1,1$ ml/min. La restauration du débit par administration de NPS 10^{-6} au lit précontracté avec Phe 10^{-6} , effectuée en fin d'expérience, a été de $97 \pm 5\%$.

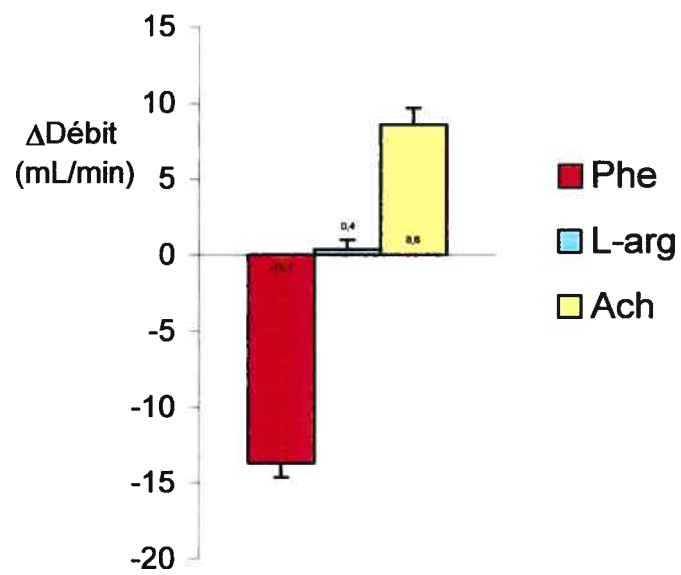


Figure 7. Étude de réactivité vasculaire mésentérique chez le rat sain.

Phe, phényléphrine, L-arg, L-arginine, Ach, acétylcholine.

II- Étude de la réactivité vasculaire mésentérique dans l'endotoxémie chez le rat et évaluation des inhibiteurs du monoxyde d'azote

Matériel et méthodes

Groupes d'étude

Des rats Sprague-Dawley de 300 g ont été utilisés pour toutes les expériences (Laboratoires McGill, Montréal, Canada). Une série de 15 expériences a été nécessaire pour développer le modèle et pour déterminer les concentrations optimales des agents vasoactifs (voir partie I). Six groupes expérimentaux ont été étudiés (Figure 8). Un groupe contrôle (n=9) est constitué d'animaux sains. Un deuxième groupe a reçu une injection de lipopolysaccharide (LPS, extrait d'*Echerishia Coli* B6, Sigma, MO, É.-U.) en intra-péritonéal 4 heures avant l'induction de l'anesthésie (groupe LPS, n=6). Quatre groupes traitement ont été étudiés. Ces animaux ont reçu une injection intra-péritonéale d'un agent thérapeutique 30 minutes avant l'injection de LPS, et donc 4h30 avant l'induction de l'anesthésie. L'inhibiteur non-sélectif des voies du monoxyde d'azote N^G-monométhyl-L-arginine a été utilisé (groupe L-NMMA, 100 mg/kg, n=6). Deux inhibiteurs sélectifs de l'iNOS et un agent guanidiné à faible effet inhibiteur sur les voies du monoxyde d'azote ont été utilisés : aminoguanidine (groupe AMG,

100 mg/kg, n=6) et 1,3-diaminoguanidine (groupe 1-3-DAG, 100 mg/kg, n=6).

Egalement, le monométhylguanidine (groupe MMG, 100 mg/kg, n=6).

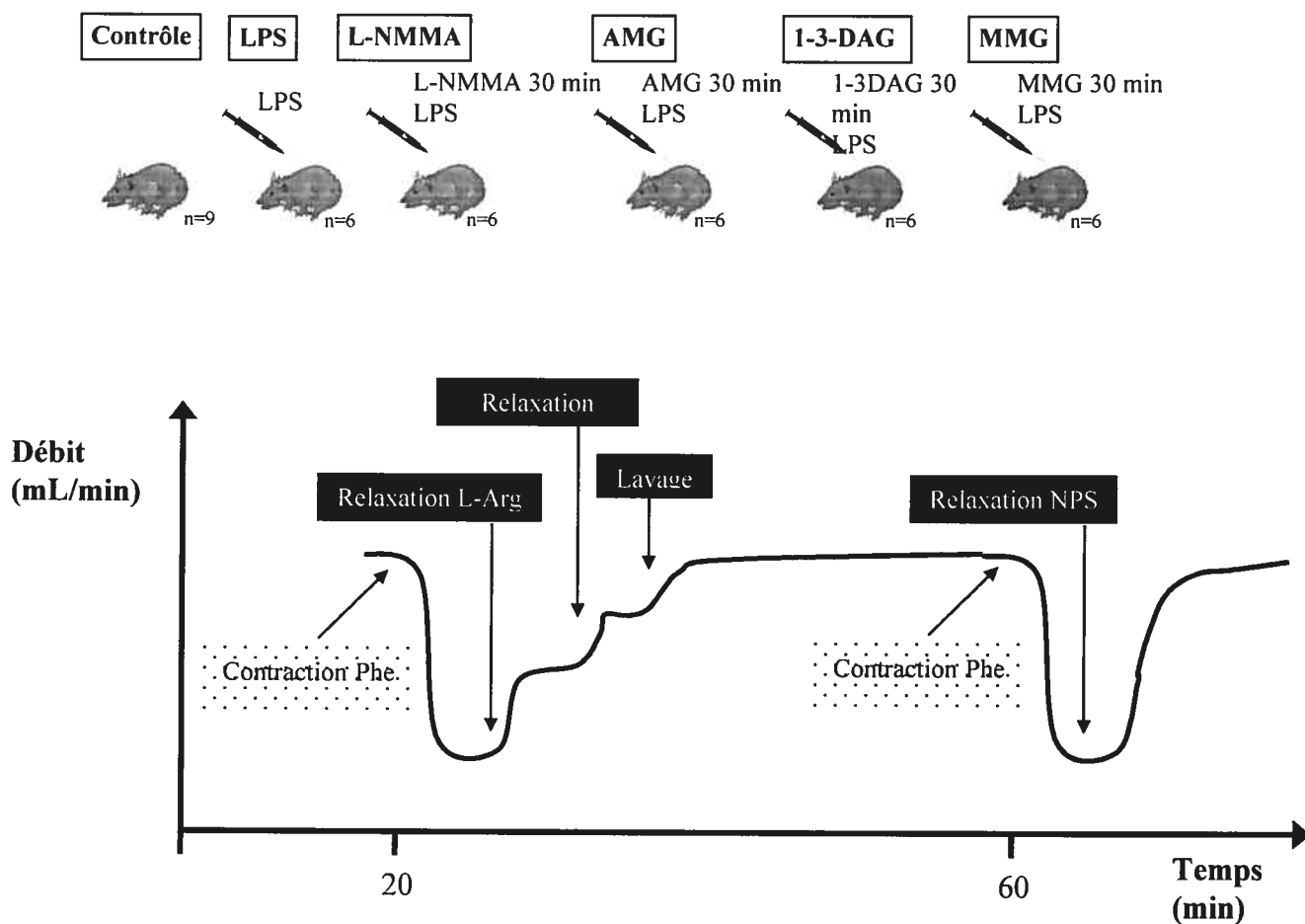


Figure 8. Protocole expérimental de traitement *in vivo*. Après 20 minutes de stabilisation, une contraction avec Phe 10^{-6} puis une relaxation avec L-Arg 10^{-4} puis Ah 10^{-6} est effectuée. La baignoire est rincée (solution physiologique), puis, après 20 minutes de stabilisation, une contraction avec Phe 10^{-6} et relaxation avec NPS est effectuée.

Modèle de perfusion mésentérique

Le modèle de perfusion mésentérique utilisé est décrit ci-haut. Brièvement, l'anesthésie générale est induite grâce à une injection intramusculaire de xylazine (5 mg/kg) et ketamine (75 mg/kg). Une anticoagulation est assurée par une dose intramusculaire d'héparine (5 mg/kg). L'artère iliaque est canulée et la pression artérielle initiale des animaux est notée. L'aorte abdominale est canulée puis l'organe explanté et relié à un système de perfusion par gravité dans lequel il est perfusé d'une solution de Krebs-Ringer modifiée ((mmol/L) : NaCl 118,3; KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, K₂HPO₄ 1,22, CaCl₂ 2,6, NaHCO₃ 25; dextrose 15,0, pO₂ 95%, pCO₂ 5%, 37 °C). L'organe est placé dans une chambre située à 80 cm en-dessous du réservoir de perfusion, ce qui permet d'obtenir une pression de perfusion de 80 cmH₂O. Le système est relié à un débitmètre à ultrasons de 3 mm de diamètre (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, É-U). Les mesures rapportées sont donc exprimées en termes de variations de débit (Δ débit). Les expériences sont menées en présence d'indométhacine (10⁻⁵ M) pour prévenir la synthèse de dérivés endogènes des prostanoïdes.

Études de réactivité vasculaire

Évaluation des inhibiteurs du monoxyde d'azote en pré-traitement in vivo

La séquence de vasoconstriction/vasodilatation optimale a été déterminée par les

études préliminaires (voir Résultats). Les concentrations optimales ont également été déterminées par les expériences initiales, sauf pour la L-arginine qui a été administrée à dose pharmacologique maximale compatible avec son utilisation clinique (10^{-4} M). Après 20 minutes de stabilisation par perfusion de la solution de Krebs-Ringer modifiée, la contractilité du lit vasculaire a été évaluée par une perfusion de phényléphrine 10^{-6} (Figure 7). Après obtention d'un débit stable pendant 2 minutes, la présence de l'iNOS a été évaluée par perfusion latérale de son substrat, la L-arginine (10^{-4} mol/L). L'activité de la voie endothéliale du monoxyde d'azote (ecNOS) a ensuite été évaluée en ajoutant une perfusion latérale d'acétylcholine 10^{-6} . Ces trois perfusions arrêtées, la préparation a été perfusée de Krebs-Ringer modifié pendant 20 minutes. L'intégrité du muscle lisse a finalement été vérifiée par injection de nitroprussiate de sodium (NPS) 10^{-6} , un agoniste direct de la guanylate cyclase (GCs), après précontraction avec phényléphrine (Phe) 10^{-6} .

Analyses biochimiques

La pO_2 , la pCO_2 , et le taux de lactate dans le liquide affluent et effluent ont été mesurés pour toutes les expériences avant et après les injections d'agents vasoactifs. Un prélèvement sanguin a été effectué avant la ligature de l'aorte pour tous les animaux et un dosage des taux de nitrites et nitrates sériques a été effectué par chromatographie liquide à haute pression selon une technique décrite⁸¹. Les échantillons sériques ont été injectés directement dans une chambre contenant une solution de réduction à 95 °C et 6,9 torr d'hélium. Les nitrites/nitrates réduits sont

ensuite condensés et acheminés vers l'analyseur chromatographique (Bendix Inc., modèle 8101).

La solution de réduction des nitrites est à base d'iode de sodium et préparée quotidiennement. La solution de réduction des nitrates est à base de chlorure de vanadium.

Immunohistochimie

Un segment de l'artère mésentérique supérieure a été prélevé à la fin de chaque expérience et fixé dans une préparation de formaline (PBS, *formalin phosphate-buffered saline*). Le spécimen a ensuite été enrobé dans la paraffine. Des analyses qualitatives immunohistochimiques ont été effectuées par technique de marquage à l'immunoperoxydase⁸² en utilisant un anticorps polyclonal de lapin anti-iNOS (Santa Cruz Laboratories, Santa Cruz, CA, É.-U).

Après déparaffinisation, réhydratation et blocage de l'activité endogène de la peroxydase, l'anticorps primaire a été appliqué pendant 60 minutes avec sérum de chèvre 1% dilué dans la solution de PBS. Une concentration équivalente d'un anticorps IgG non-spécifique a été utilisée dans une série d'expériences contrôles. Ensuite, un anticorps de chèvre anti-lapin (Vector Laboratories) a été appliqué pendant 60 minutes. Un marquage à la peroxydase a été effectué avec un complexe avidine-peroxydase. La visualisation de l'anticorps a été établie après 5 minutes

d'exposition à 3,3'-diaminobenzidine 0,05% (Vector Laboratories) dans le Tris-HCL 0,05 mmol/L à pH 7,6 avec 0,003% de peroxyde d'hydrogène. Les vaisseaux ont été contre-marqués par immersion dans une solution d'hématoxyline de Mayer. L'expression d'iNOS est évaluée qualitativement par la présence de taches brunes grâce à un microscope vidéo couleur 3CCD (charge-couple device) adapté à un logiciel de lecture (Adobe Photoshop, Adobe Inc.).

Évaluation des inhibiteurs du monoxyde d'azote en perfusion *ex vivo*

Le L-NMMA et l'AMG ont été évalués lorsqu'administrés pendant 30 minutes en perfusion *ex vivo* dans 4 groupes supplémentaires (Figure 9). Les deux premiers groupes étaient constitués d'animaux sains (groupe contrôle-LNMMA, n=6, groupe contrôle-AMG, n=6) et les deux derniers groupes d'animaux endotoxémiques. Ceux-ci ont reçu une injection de LPS 20 mg/kg 4 heures avant l'anesthésie (groupe LPS-LNMMA, n=6, groupe LPS-AMG, n=6). Les préparations mésentériques ont été effectuées selon la description ci-dessus. Chez ces 4 groupes, après 30 minutes de stabilisation par perfusion de solution de Krebs-Ringer modifiée, une première contraction-relaxation a été effectuée à la phényléphrine, L-arginine puis à l'acétylcholine, tel que décrit pour les expériences précédentes (Figure 8). Une période de stabilisation de 15 minutes a suivi. Pour deux groupes (groupe contrôle-LNMMA, groupe LPS-LNMMA), une perfusion de L-NMMA 10⁻⁴ a ensuite été débutée par port latéral. Après 30 minutes de

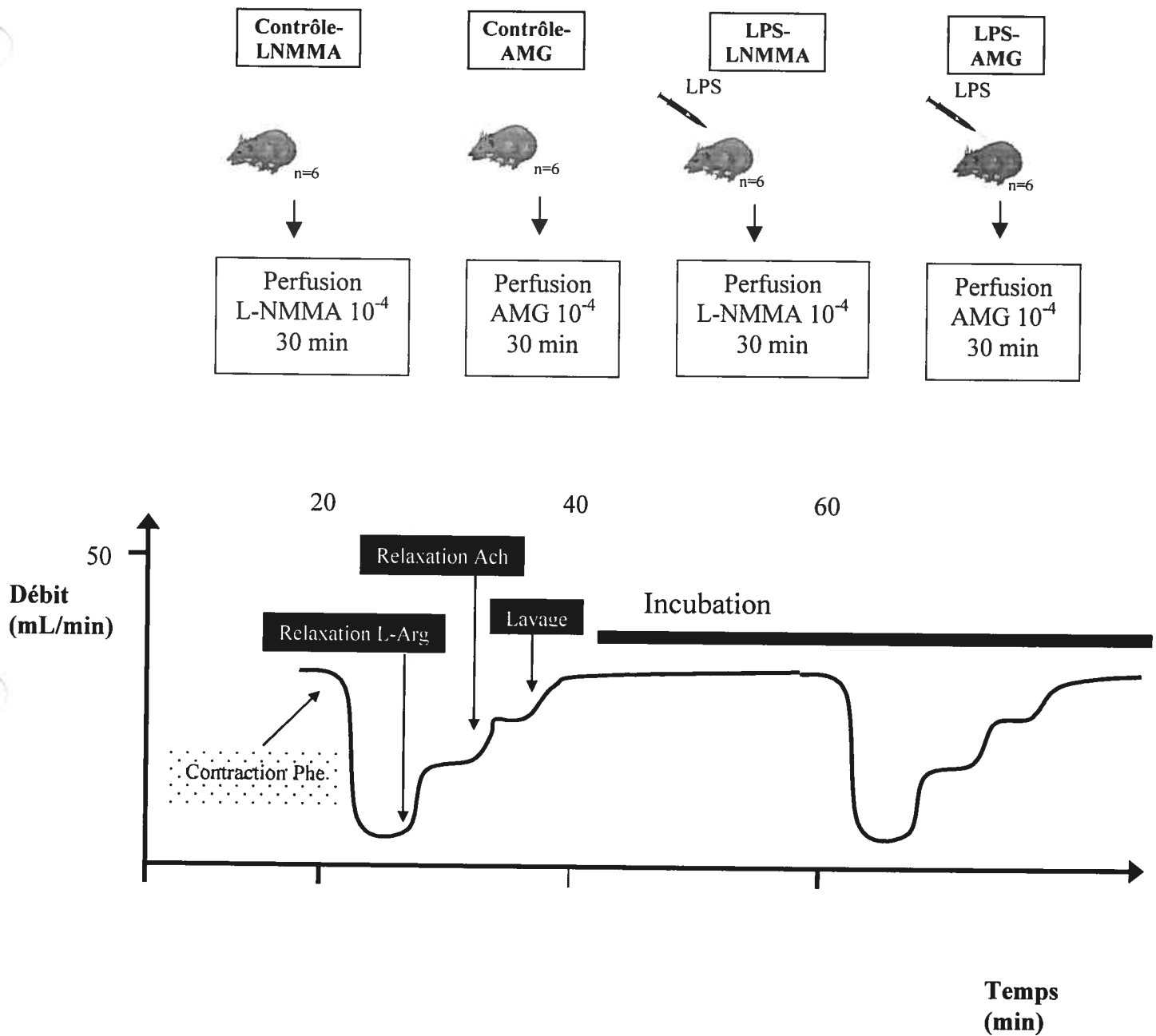


Figure 9. Protocole expérimental de traitement *ex vivo*: contrôle-LNMMA, contrôle-AMG, LPS-LNMMA et LPS-AMG. Après une première contraction-relaxation, une période d'incubation de 30 minutes avec un agent thérapeutique est débutée (AMG 10⁻⁴ ou L-NMMA 10⁻⁴). Une deuxième contraction-relaxation est effectuée. Les deux groupes contrôle n'ont pas reçu d'injection *in vivo*.

perfusion, l'étude de réactivité vasculaire a été répétée de la même façon. Pour les deux autres groupes (groupe contrôle-AMG, groupe LPS-AMG), la préparation a été perfusée pendant 30 minutes avec AMG 10^{-4} .

Produits et solutions

Toutes les solutions ont été préparées quotidiennement dans l'eau nanopurifiée sauf l'indométhacine qui a été dissoute initialement dans une solution de NaCO_3 10^{-5} puis dans l'eau. La phényléphrine, l'acétylcholine, la L-arginine, le nitroprussiate de sodium, l'indométhacine, le lipopolysaccharide E.Coli B6, la N^G -monométhyl-L-arginine, l'aminoguanidine, la 1-3-diamino-guanidine, et le monométhylguanidine ont été achetés à Sigma Chemicals (St-Louis, MO, É.-U.).

Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyennes \pm erreur-type. Les données des mesures biochimiques sont comparées par analyses d'ANOVA. Les variations de débit sont comparées entre les différents groupes d'étude par analyse de variance puis par le test *post oc* de Student-Newman-Keuls. Les données des expériences pré-traitement et post-traitement par perfusion *ex vivo* ont été analysées d'abord individuellement, par test de t pairés. Les deux groupes traitement (L-NMMA et AMG) ont ensuite été comparés par analyse d'ANOVA bidirectionnelle pour

mesures répétées. Une valeur p égale ou inférieure à 0,05 est considérée comme étant statistiquement significative.

Résultats

Études de réactivité vasculaire

Évaluation des inhibiteurs du monoxyde d'azote en pré-traitement *in vivo*

Les résultats sont résumés dans la Figure 10. La réponse à la phényléphrine est nettement diminuée dans le groupe LPS (Δ débit, mL/min, contrôle $-13,7 \pm 0,9$, LPS $-6,3 \pm 2,4$, $p < 0,05$). Cette réponse est restaurée dans tous les groupes pré-traités (Δ débit, mL/min, contrôle $-13,7 \pm 0,9$, LNMMA $-10,5 \pm 2,3$, AMG $-11,0 \pm 3,6$, 1-3-DAG $-8,9 \pm 3,2$, MMG $-9,7 \pm 4,6$, $p = \text{ns}$ pour toutes paires). La réponse à la L-arginine étant pratiquement nulle dans le groupe contrôle, celle-ci est nettement majorée dans le groupe LPS (Δ débit, mL/min, contrôle $0,4 \pm 0,6$, LPS $4,0 \pm 1,1$, $p < 0,05$). Cette réponse est augmentée de façon similaire dans les groupes traités avec LNMMA, 1-3-DAG et MMG (Δ débit, mL/min, LPS $4,0 \pm 1,1$, LNMMA $3,1 \pm 1,9$, 1-3-DAG $3,4 \pm 2,0$, MMG $4,1 \pm 2,3$, $p = \text{ns}$ pour toutes paires) mais nettement diminuée dans le groupe traité avec AMG (Δ débit, mL/min, LPS $4,0 \pm 1,1$, AMG $1,1 \pm 1,3$, $p < 0,05$). La réponse à l'ACh, forte dans le groupe contrôle, est nulle dans le groupe LPS (Δ débit, mL/min, contrôle $8,6 \pm 1,1$, LPS $-0,2 \pm 1,2$, $p < 0,001$). Cette réponse est restaurée dans le groupe AMG (Δ débit, mL/min, LPS $-0,2 \pm 1,2$, AMG $6,4 \pm 2,1$,

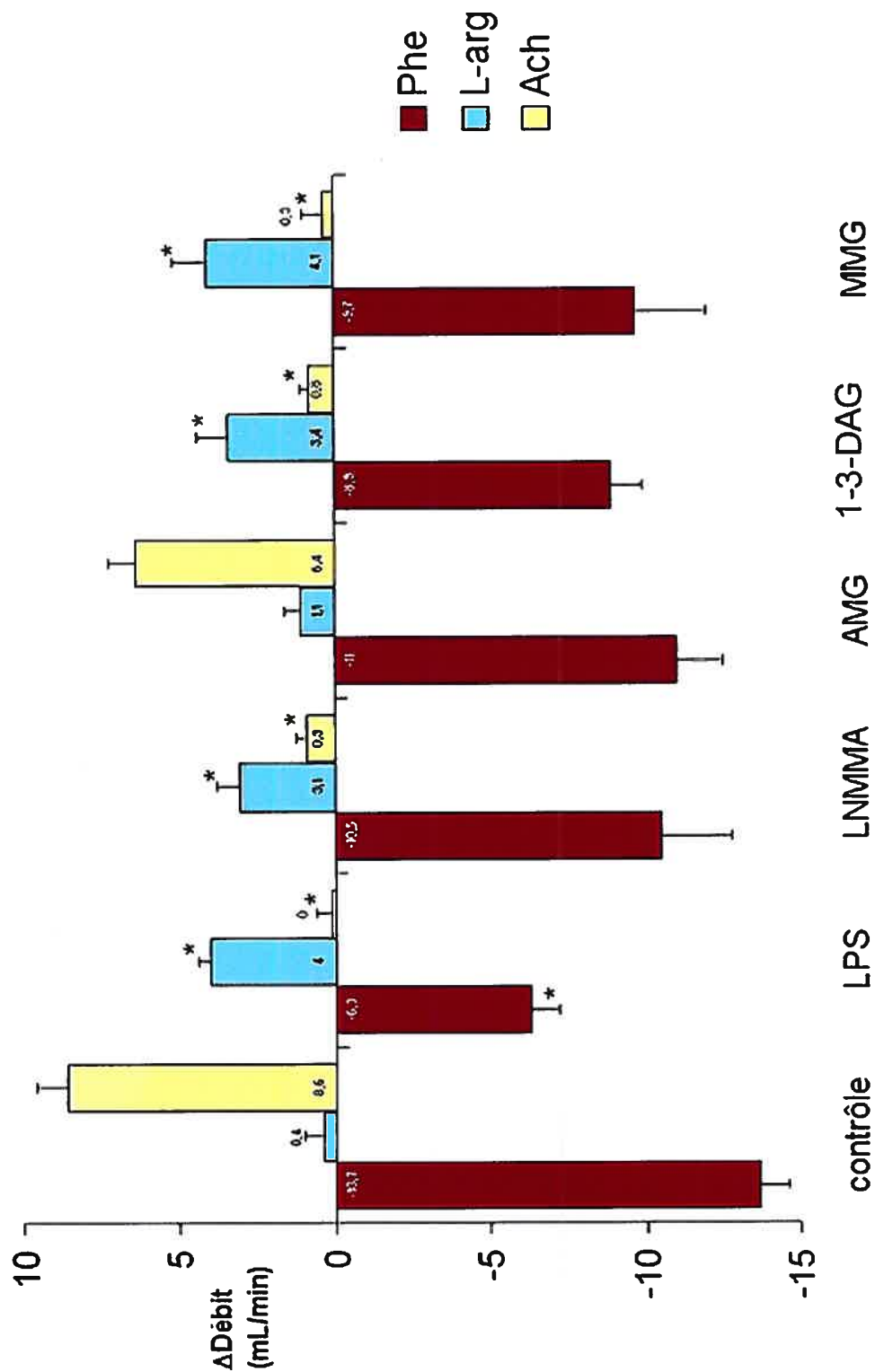


Figure 10. Variations de débit en réponse aux agents vasoactifs pour les expériences de traitement *in vivo*. * $p < 0,05$ vs contrôle. Voir texte pour comparaisons entre les groupes.

$p < 0,05$) dans lequel il n'y a pas de différence statistiquement significative avec la réponse du groupe contrôle (Δ débit, mL/min, contrôle $8,6 \pm 1,1$, AMG $6,4 \pm 2,1$, $p = ns$). La réponse à l'Ach n'est cependant pas restaurée dans les autres groupes traités (Δ débit, mL/min, contrôle $8,6 \pm 1,1$, LNMMA $0,5 \pm 0,3$, 1-3-DAG $0,4 \pm 0,3$, MMG $0,2 \pm 0,8$, $p < 0,05$ pour tous les groupes vs contrôle). L'administration de NPS a révélé une restauration du débit à plus de 90% de sa valeur initiale pour toutes les expériences.

Analyses biochimiques

L'analyse du liquide affluent révèle une pO_2 à 400 ± 30 mmHg et une pCO_2 à 30 ± 3 mmHg. L'analyse des liquides effluents révèle une pO_2 de 240 ± 30 mmHg, une pCO_2 de 45 ± 9 mmHg, un taux de lactate de $0,5 \pm 0,3$ mmol/L. Les différences entre les groupes ne sont pas statistiquement significatives. Les concentrations des nitrites et nitrates sériques sont résumés dans les Figures 11a et 11b. Les nitrates se sont élevés de façon significative dans le LPS, cette élévation n'étant pas observée dans les groupes pré-traités avec L-NMMA, AMG et 1-3-DAG (μM , contrôle 18 ± 10 , LPS 233 ± 58 , $p < 0,05$, L-NMMA 70 ± 20 , $p = ns$, AMG 40 ± 5 , $p = ns$, 1-3-DAG 130 ± 20 , $p = ns$, MMG, 240 ± 60 , $p < 0,05$). Ces agents préviennent donc l'élévation des nitrates sériques. Le MMG n'a eu aucun impact sur la réduction de la production de nitrates. La même distribution a été observée lors du dosage des nitrites (μM , contrôle $0,6 \pm 0,1$, LPS $4,4 \pm 0,8$, $p < 0,05$, L-NMMA $0,9 \pm 0,3$, AMG $0,8 \pm 0,2$, $p = ns$, 1-3-DAG $2,1 \pm 0,3$, $p = ns$, MMG, $3,7 \pm 1,1$, $p < 0,05$). L'élévation des nitrites sériques est donc prévenue par L-NMMA, AMG et 1-3-DAG.

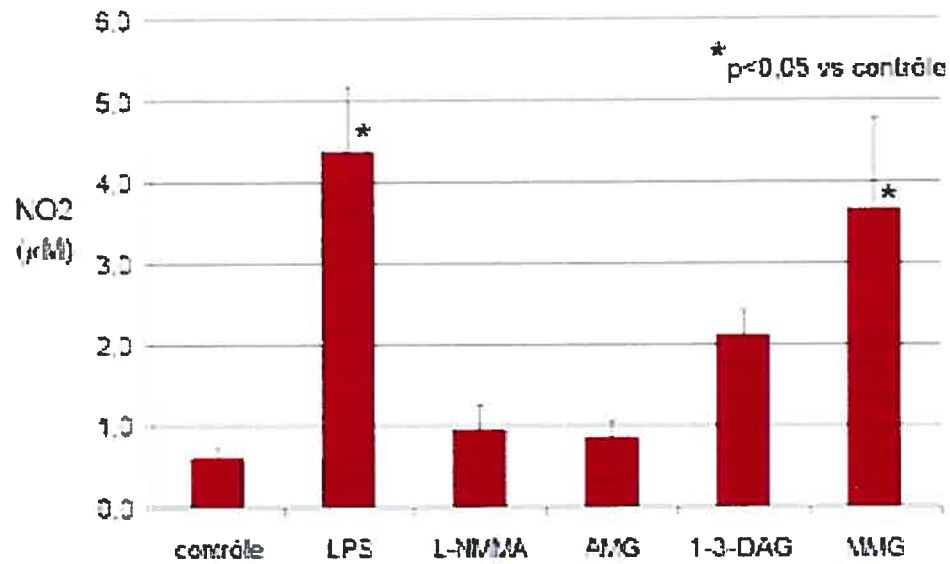


Figure 11a. Dosages des nitrites sériques pour les expériences de traitement *in vivo*.

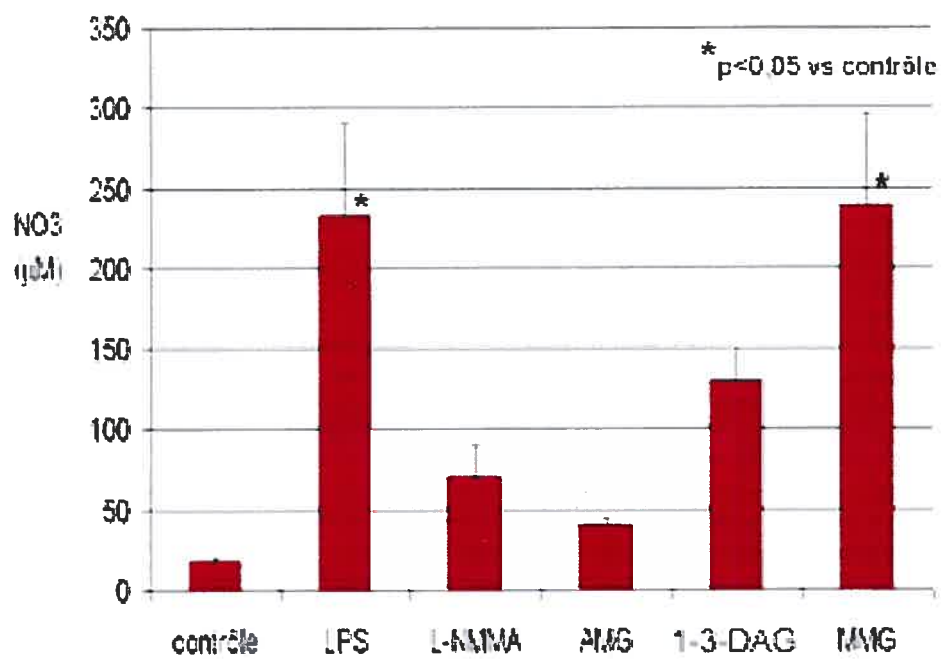


Figure 11b. Dosage des nitrates sériques pour les expériences de traitement *in vivo*.

Immunohistochimie

Le marquage à l'immunoperoxydase des segments proximaux d'artère mésentérique exposés à un anticorps anti-NOS2 (iNOS) est démontré dans la Figure 12. Les taches brunes représentent un marquage positif. Le groupe contrôle s'est avéré négatif, et les cinq groupes endotoxémiques, soit les groupes LPS, L-NMMA, AMG, 1-3-DAG et MMG, se sont avérés positifs.

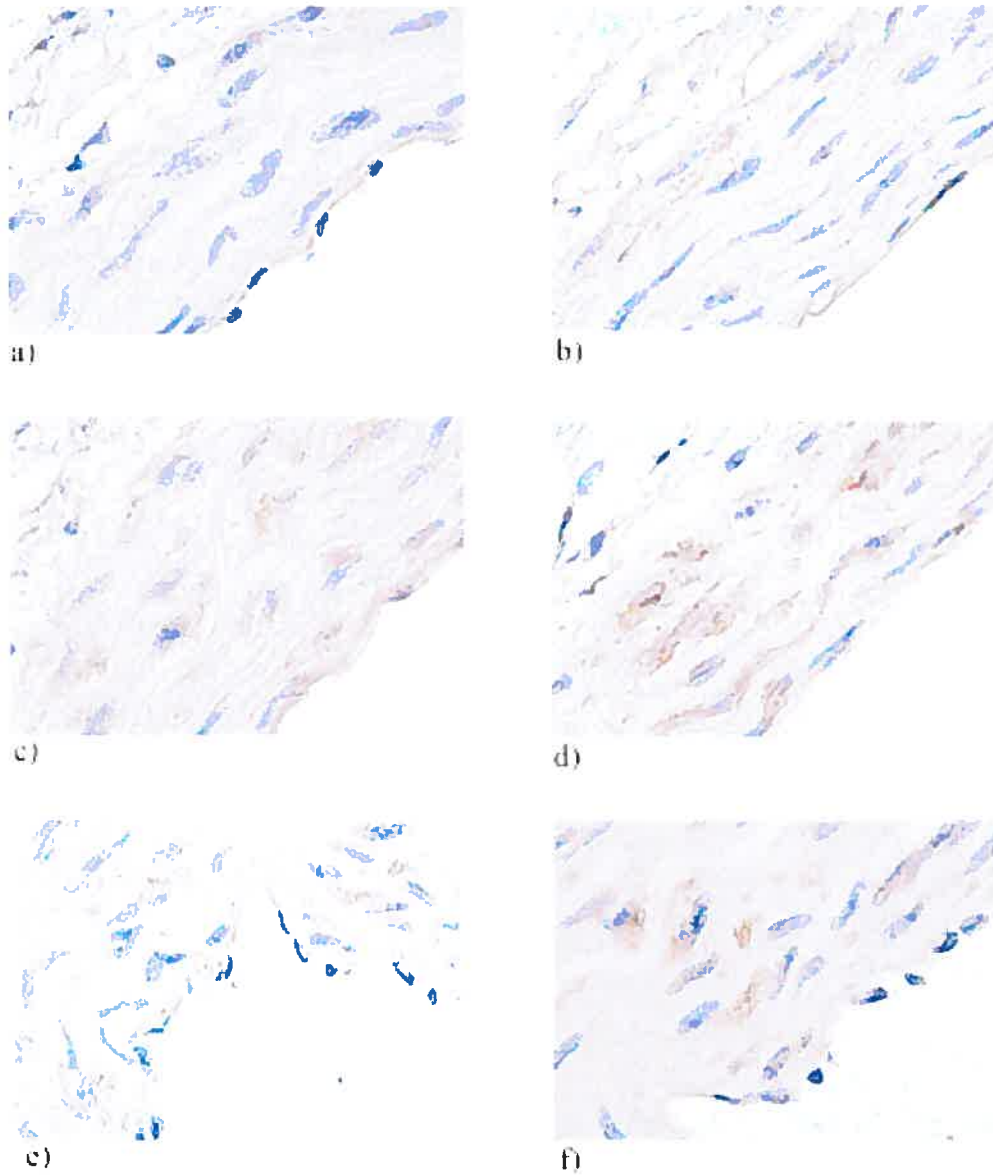


Figure 12. Marquage immunohistochimique des artères mésentériques avec un anticorps polyclonal pour l'iNOS pour les groupes de l'expérience de traitement *in vivo*. a) contrôle b) LPS c) LNMMA d) 1-3-DAG f) MMG.

Évaluation des inhibiteurs du monoxyde d'azote en perfusion *ex vivo*

Les résultats des expériences de réactivité vasculaire après 30 minutes de perfusion *ex vivo* sont résumés au Tableau 1 et à la Figure 13. Dans le groupe perfusé avec L-NMMA, on note une tendance à l'augmentation de la contraction à la phényléphrine (Δ débit, mL/min, pré-traitement $-7,5 \pm 1,0$, post-traitement $-11,3 \pm 1,0$, $p=0,06$) et une augmentation de la vasodilatation à la L-arginine après traitements (Δ débit, mL/min, pré-traitement $3,9 \pm 0,3$, post-traitement $9,3 \pm 1,3$, $p=0,01$). L'augmentation de la vasodilatation à l'acétylcholine est également statistiquement significative. Dans le groupe perfusé avec AMG, une tendance à l'augmentation de la contractilité est notée après traitements (Δ débit, mL/min, pré-traitement $-6,3 \pm 0,9$, post-traitement $-9,2 \pm 1,1$, $p=0,1$), cette augmentation n'étant pas statistiquement significative. La vasodilatation à la L-arginine est diminuée (Δ débit, mL/min, pré-traitement $4,0 \pm 0,4$, post-traitement $1,1 \pm 0,3$, $p=0,003$) et la réponse à l'acétylcholine améliorée, de façon statistiquement significative (Δ débit, mL/min, pré-traitement $-0,7 \pm 0,4$, post-traitement $3,5 \pm 0,9$, $p=0,009$). L'intégrité du muscle lisse a été établie pour toutes les expériences par confirmation d'une vasodilatation avec NPS 10-6.

**Tableau 1. Réponses aux agents vasoactifs avant et après perfusion
d'inhibiteurs des voies de du NO administrée ex vivo pendant
30 minutes : comparaisons individuelles avant et après la perfusion**

Groupe d'étude	pré-traitement	post-traitement	Δ	p
	mL/min		ml/min	
Contrôle L-NMMA (n=4)				
phe	-13,0±2,2	-9,5±1,5	3,5±1,3	0,07
L-arg	-1,2±0,4	1,1±0,3	-2,3±1,0	0,02
Ach	9,8±2,9	7,1±1,5	-2,2±1,7	0,14
Contrôle AMG (n=10)				
phe	-14,1±1,1	-9,6±1,6	4,6±1,0	0,002
L-arg	0,2±0,8	-0,4±0,8	0,5±0,7	0,5
Ach	8,7±1,5	6,5±0,9	2,2±0,8	0,03
LPS-L-NMMA (n=5)				
phe	-7,5±1,0	-11,3±1,0	-3,9±1,5	0,06
L-arg	3,9±0,3	9,3±1,3	-5,4±1,3	0,01
Ach	-0,4±0,8	1,7±1,2	-2,1±1,7	0,27
LPS-AMG (n=7)				
phe	-6,3±0,9	-9,2±1,1	-2,9±1,6	0,1
L-arg	4,0±0,4	1,1±0,3	2,9±0,6	0,003
Ach	-0,7±0,4	3,5±0,9	-4,2±1,1	0,009

*Les 2 groupes controles n'ont pas reçu de LPS.

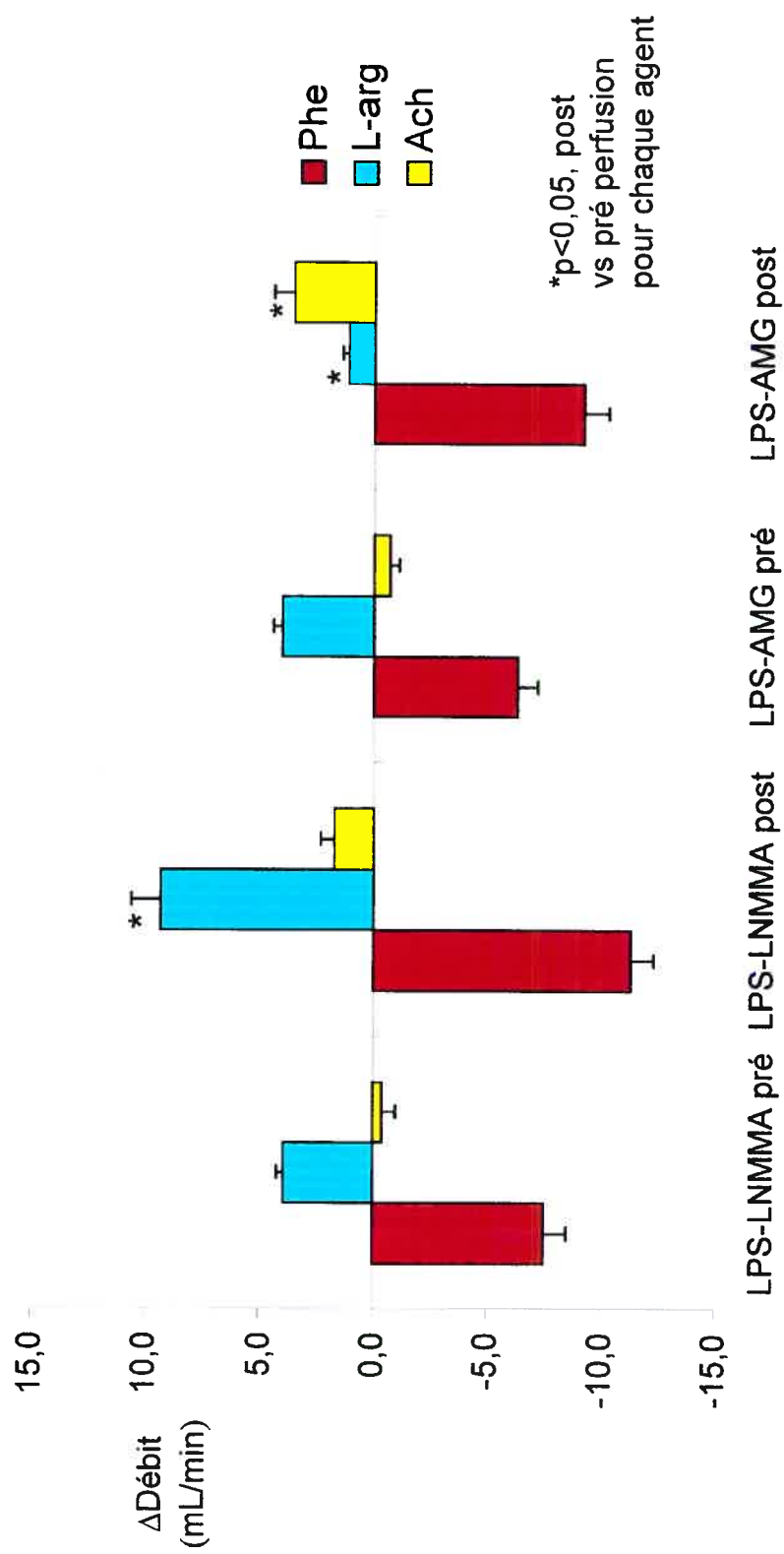


Figure 13. Réactivité vasculaire avant et après traitement ex vivo avec L-NMMA et AMG

Discussion

Modèle pour l'étude de la réactivité vasculaire mésentérique

Dans la première partie de ce travail, nous avons développé un nouveau modèle d'étude de la réactivité vasculaire chez le rat. Dans les expériences de validation initiales puis dans cette première étude dans l'endotoxémie, ce modèle a démontré trois qualités principales: il s'apparente à la physiologie *in vivo*, il génère des résultats reproductibles et il est simple d'utilisation.

Les modèles existants de réactivité vasculaire systémique exigent des manipulations des artères qui les éloignent de leurs conditions physiologiques. Le modèle de tension isométrique sur des anneaux vasculaires étudie la réactivité d'un vaisseau isolé et non-perfusé. Le modèle de perfusion mésentérique de McGregor demande l'exclusion d'une grande partie du lit vasculaire. Le tissu de soutien est réséqué et la résistance veineuse est exclue. Le modèle que nous avons développé élimine ces lacunes en préservant l'intestin dans son ensemble, de son apport sanguin au niveau de l'aorte à son retour sanguin au niveau de la veine porte. Le débit constaté à pression physiologique représente le quart du débit cardiaque de l'animal et les résultats qu'il génère reflètent donc la contractilité et la conductibilité d'une proportion très grande du lit systémique. Les vaisseaux étudiés, hormis l'aorte et la veine porte, ne sont pas manipulés. Leur intégrité anatomique est assurée, et leur intégrité physiologique en est accrue : la fiabilité de

ce modèle en terme de reproduction de l'état physiologique lui confère donc un avantage par rapport aux modèles existants. L'artère mésentérique inférieure n'a toutefois pas été canulée dans ce modèle malgré que le colon et son retour veineux porte aient été gardés. L'avantage d'éviter d'exclure le colon est que la manipulation du lit vasculaire mésentérique est ainsi minimal. Cependant, il est possible qu'une lésion colique ischémique soit engendrée par le fait que l'artère mésentérique inférieure ne soit pas perfusée. L'absence d'élévation des taux de lactates au niveau de l'effluent veineux révèle toutefois que cette lésion est probablement négligeable.

La reproductibilité des modèles existants, lorsqu'utilisés adéquatement, a été démontrée dans plusieurs contextes cliniques. Le modèle que nous présentons s'est également distingué par sa reproductibilité. En effet, lorsque les résultats sont exprimés en terme de variations de débit, la variabilité a été restreinte et des résultats significatifs ont pu être obtenus avec un nombre d'animaux limité. En effet, il n'a fallu que 6 animaux par groupe pour démontrer une diminution de la contractilité, une vasodilatation à la L-arginine, et une atteinte de la réponse à l'acétylcholine induite par l'endotoxémie. La stabilité des débits de base avant et après les expériences de réactivité vasculaire a permis d'effectuer une deuxième évaluation et de procéder à des études thérapeutiques *ex vivo*. Cela permet des analyses statistiques par mesures répétées, qui peuvent ajouter à la richesse des résultats en ce que chaque sujet devient son propre contrôle.

Le modèle que nous présentons est également facile d'utilisation. Une fois la technique maîtrisée, il nous a permis d'effectuer 8 expériences par jour, soit environ un groupe d'étude complet, en n'employant qu'un opérateur et un technicien. Les matériaux sont peu coûteux. Une chambre confectionnée sur mesure a toutefois été nécessaire. Les animaux choisis sont faciles de manipulation et la technique de dissection a été maîtrisée après environ 10 expériences. En comparaison avec les modèles dans lesquels les artères de résistance sont étudiées de manière isolée, le modèle de perfusion mésentérique est très accessible puisqu'il n'exige pas une manipulation fine de ces vaisseaux de très petit calibre.

L'atteinte de la réactivité vasculaire mésentérique dans l'endotoxémie

Notre étude suggère que la voie endothéliale constitutive du monoxyde d'azote est fortement atteinte dans l'endotoxémie. Dans le groupe LPS, la réponse de vasodilatation à l'acétylcholine est pratiquement nulle. Une légère contraction a été notée (Figure 9). Cette contraction est due à la stimulation des récepteurs cholinergiques du muscle lisse, qui provoque sa contraction. Ces résultats corroborent l'idée acceptée que les états inflammatoires comme le choc septique entraînent une dysfonction endothéliale. Ils suggèrent même que dans ces situations, le contrôle endothélial de régulation du débit est complètement aboli. Ceci pourrait mener à des phénomènes de malperfusion mésentérique et porter atteinte à la fonction barrière de la muqueuse intestinale. Cette atteinte pourrait expliquer en partie la translocation bactérienne accrue décrite récemment dans

plusieurs états d'inflammation aiguë, tel le choc inflammatoire relié à l'usage de la circulation extra-corporelle en chirurgie cardiaque et vasculaire³⁶.

Les résultats présentés ici ne permettent pas de décrire le mécanisme menant à l'inactivité de l'ecNOS dans l'endotoxémie. Le modèle de perfusion mésentérique permettra toutefois des études mécanistiques par administration d'autres agents de vasodilatation par stimulation de l'ecNOS, comme la bradykinine, qui utilise une cascade enzymatique différentes de l'acétylcholine, ou le calcium ionophore (A23187), un analogue de la calmoduline qui permet de stimuler l'ecNOS sans l'intermédiaire de récepteur membranaire.

Les inhibiteurs des voies du monoxyde d'azote : une avenue thérapeutique dans l'inflammation aiguë

Les résultats de cette étude corroborent ceux de travaux précédents qui ont démontré qu'une inhibition de la synthèse non-contrôlée du monoxyde d'azote dans le choc septique restaure la contractilité des lits vasculaires systémiques et augmente la résistance périphérique. La capacité des inhibiteurs des voies du monoxyde d'azote à restaurer le contrôle endothélial de la relaxation demeure un sujet controversé. Dans notre modèle de perfusion mésentérique, l'aminoguanidine a prévenu l'abolition de la réponse à l'acétylcholine causée par l'endotoxémie. Ce travail démontre donc que cet agent permet de préserver la fonction de la synthèse endothéliale constitutive du monoxyde d'azote. La 1-3-DAG, et le MMG, malgré

qu'ils améliorent également la contractilité du lit mésentérique, n'ont eu qu'un impact minime sur l'inhibition de la synthèse inductible du monoxyde d'azote (iNOS). Le L-NMMA, malgré qu'il ait diminué la production de monoxyde d'azote tel que suggéré par l'analyse des nitrites et nitrates sériques, n'a pu empêcher complètement la vasodilatation lors de l'administration de L-arginine. Aussi, la réponse à l'acétylcholine chez les animaux endotoxémiques pré-traités avec L-NMMA est abolie, ce qui peut être relié à une inhibition incomplète de l'iNOS (malgré l'utilisation d'une dose thérapeutique maximale) mais plus probablement à l'action d'inhibition de l'ecNOS de cet agent non-sélectif. La démonstration de l'inhibition complète de l'iNOS nécessiterait des études de quantification des produits de dégradations du NO, nitrites et nitrates, dans des préparations cellulaires.

Les résultats obtenus avec le L-NMMA en pré-traitement sont en désaccord avec la littérature précédente. Selon les études sur macrophages isolés, à ces doses, la puissance du L-NMMA est semblable à celle de l'aminoguanidine en terme d'inhibition de l'iNOS, ce qui n'a pas été le cas. Cette discordance peut être expliquée par un effet pharmacologique ou par une différence de contexte expérimental. Les macrophages isolés et les cellules endothéliales étudiées dans leur milieu naturelle n'ont probablement ni la même concentration d'ecNOS ni le même potentiel de synthèse d'iNOS ce qui pourrait expliquer la différence d'impact des agents thérapeutiques que nous avons étudié. Nous avons utilisé des doses semblables des deux agents dans ces expériences. Nous n'avons cependant

pas mesuré la concentration plasmatique de ces agents. Malgré que ces deux agents aient un profil pharmacologique apparenté, il n'est pas exclu qu'un effet pharmacodynamique ait favorisé l'aminoguanidine. Par exemple, ces agents ont des solubilité différente en milieux aqueux et lipidique et donc une différence de biodisponibilité a pu avantager un agent ou l'autre. Il est également possible que la discordance entre nos résultats et ceux obtenus dans des expériences sur cellules ou sur vaisseaux isolés soient reliés au contexte expérimental. En effet, dans notre modèle, l'intestin et son lit vasculaire sont viables pour toute la durée des expériences. L'intégrité des interactions entre les différentes structures anatomiques et donc le contexte pathophysiologique est préservé. Ceci peut avoir un impact important sur l'activité des enzymes impliquées dans l'inflammation et sur la capacité des agents thérapeutiques d'atteindre ces enzymes et de moduler leur action. De tels phénomènes peuvent favoriser un agent thérapeutique et non d'autres et expliquer les discordances entre nos résultats et ceux des autres groupes.

L'inhibition de l'iNOS et le rétablissement d'une vasodilatation dépendante de l'ecNOS par l'aminoguanidine dans l'endotoxémie a été possible de deux façons : lorsqu'administrée précocément, *in vivo*, avant l'induction du choc, et lorsqu'administrée tardivement, *ex vivo*, en perfusant pendant 30 minutes l'intestin d'un animal ayant été en choc endotoxémique profond. Nous avons également démontré que l'action de l'aminoguanidine et des autres inhibiteurs des voies du monoxyde d'azote étudiés n'avaient aucun impact sur l'expression de l'iNOS. En effet, l'évaluation marquage immunohistochimique de l'iNOS a démontré qu'elle

est exprimée de façon aussi importante chez les animaux endotoxémiques ayant reçu un pré-traitement avec l'un de ces agents. Les agents évalués n'ont donc pas d'impact sur l'induction de l'iNOS. Leur effet est strictement relié à une inhibition de l'activité de l'enzyme. Telle qu'attendue, l'efficacité de l'aminoguanidine a donc été observée lorsqu'administrée tardivement. Ceci est cohérent avec la compréhension actuelle de la pathophysiologie d'atteinte de la réactivité vasculaire reliée au choc septique. Celle-ci est reliée à la présence de monoxyde d'azote en quantité importante et constamment renouvelée. Une inhibition efficace de l'iNOS, source principale de monoxyde d'azote, peut avoir un effet thérapeutique rapide puisque l'action du monoxyde d'azote est de très courte durée.

L'utilité des inhibiteurs des voies du monoxyde d'azote dans ces situations cliniques demeure controversée. L'inhibiteur de la guanylate cyclase, le bleu de méthylène, est utilisé dans le traitement de la vasoplégie reliée au choc septique ou au syndrome post-circulation extra-corporelle en chirurgie cardiaque. Cet agent inhibe la guanylate cyclase et son action s'étend donc à toutes les voies du monoxyde d'azote. L'augmentation des résistances périphériques lors de son utilisation dans les états inflammatoires a été démontrée chez l'animal et son effet chez l'humain corrobore ces résultats. Il n'a cependant pas démontré jusqu'ici aucun avantage sur la survie ou la morbidité. Le L-NMMA, lorsqu'utilisé chez l'humain, a également augmenté le tonus vasculaire systémique et diminué le besoin d'agents vasopresseurs adrénergiques. Il a cependant été associé avec une diminution des indices de perfusion périphérique et à une baisse du débit cardiaque.

Cet inhibiteur non-sélectif des voies du monoxyde d'azote ne peut rendre aux lits vasculaires périphériques leur capacité d'autorégulation puisque celle-ci dépend de l'intégrité de la voie constitutive du monoxyde d'azote, qu'il a inhibé de façon marquée dans notre modèle d'endotoxémie. Ceci pourrait expliquer la diminution de la perfusion périphérique observée chez l'humain.

Les inhibiteurs sélectifs de l'iNOS ne présentent pas ce même potentiel délétère. Théoriquement, leur effet se limitant pratiquement à l'inhibition de l'iNOS seule, ils permettent une restauration de l'intégrité de la voie endothéliale du monoxyde d'azote. Cet avantage a été confirmé dans le cadre expérimental de notre modèle. Il doit cependant être considéré avec réserve. En effet, la voie inductible du monoxyde d'azote n'est pas une voie « pathologique » au départ. Il s'agit d'une réponse de défense de l'organisme dont l'activation exagérée peut entraîner une vasoplégie éventuellement néfaste. Son rôle protecteur est probablement nécessaire, tant pour ce qui est de la préservation de réactivité vasculaire que pour ces effets cytoprotecteurs. Une inhibition contrôlée de cette voie inductible est donc probablement souhaitable. Cette forme de traitement pourrait nécessiter une évaluation de l'activité de l'iNOS ou une évaluation non-invasive de la réactivité vasculaire du sujet.

Conclusion

Nous avons donc développé et validé un modèle de perfusion mésentérique permettant d'évaluer, dans un contexte rapproché de l'état physiologique, l'atteinte de la réponse vasculaire dans le choc septique. De façon spécifique, ce modèle nous a permis d'étudier l'atteinte du lit vasculaire mésentérique dans l'endotoxémie. Nous avons mis en évidence une diminution marquée de la contractilité et une abolition de la capacité endothéliale de vasodilatation, qui traduisent une perte de l'autorégulation du débit sanguin de l'intestin. Ce modèle expérimental de choc nous a également permis d'évaluer l'impact de l'inhibition non-sélective et sélective des voies du monoxyde d'azote dans l'endotoxémie. Le L-NMMA, non-sélectif, malgré qu'il restaure efficacement la contractilité vasculaire et limite la relâche de monoxyde d'azote de la voie induite, bloque également le contrôle endothélial de la vasodilatation en inhibant l'ecNOS, la voie constitutive de régulation du tonus vasculaire. L'aminoguanidine, sélective, a également restauré efficacement la contractilité vasculaire et limité la relâche de monoxyde d'azote par l'iNOS. Elle a également prévenu la perte de la réponse à l'acétylcholine de l'ecNOS lorsqu'administrée précocément et restauré cette réponse lorsqu'administrée tardivement. Elle a donc potentiellement contribué à préserver le contrôle endothélial du tonus vasculaire dans ce modèle de choc vasoplégique expérimental. Malgré qu'elle n'ait été utilisée en clinique à ce jour, elle est hydrosoluble et sa structure est similaire au L-NMMA, déjà utilisé chez

l'humain. Cet agent présente donc un intérêt potentiel dans le traitement des états inflammatoires entretenus par la voie inductible du monoxyde d'azote.

Références

- ¹ Groeneveld ABJ, Bronsveld W, Thijs LG, Hemodynamic determinants of mortality in human septic shock, *Surgery* 99:140-152 (1985).
- ² Rosoff L, Weil M, Bradley EC, Berne CJ, Hemodynamic and metabolic changes associated with bacterial peritonitis, *American Journal of Surgery*, 114:180-189 (1967).
- ³ Nyström PO, The systemic inflammatory response syndrome, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41 Suppl. A, 1-7 (1998).
- ⁴ Nyström PO, The systemic inflammatory response syndrome, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41 Suppl. A, 1-7 (1998).
- ⁵ Dinarello CA, Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock, *Chest* 112:321S-329S (1997).
- ⁶ Haeney MR, The role of the complement cascade in sepsis, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41 Suppl. A, 41-46 (1998).
- ⁷ Nevriere R, Chagnon MJL, Lebleu N, Millien JP, Wattel F, Skeletal muscle microvascular blood flow and oxygen transport in patients with severe sepsis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 153:191-195 (1996).
- ⁸ Schöffel U, Seller T, Lausen M, Ruf G, Farthmann EH, Monitoring of the inflammatory response in early peritonitis, *The American Journal of Surgery*, 157:567-572 (1989).
- ⁹ Parratt JR, Myocardial and circulatory effects of E. coli endotoxin; modification of responses to catecholamines, *British Journal of Pharmacology*, 47:12-25 (1973).
- ¹⁰ Glauser MP, The inflammatory cytokines. New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock, *Drugs* 52 Suppl. 2:9-17 (1996).
- ¹¹ Fleming I, Gray GA, Julou-Schaeffer G, Parratt JR, Stoclet JC, Incubation with endotoxin activates the L-arginine pathway in vascular tissue, *Biochemical and biophysical research communications*, 171:562-568 (1990).
- ¹² Boyle WA, Parvathaneni LS, Bourlier V, Sauter C, Laubach VE, Cobb JP, iNOS gene expression modulates microvascular responsiveness in endotoxin-challenged mice, *Circulation Research*, 87:e18-e24, (2000).
- ¹³ Stoclet JC, Fleming I, Gray G, Julou-Schaeffer G, Schneider F, Schott C, Schott C, Parratt JR, Nitric oxide and endotoxemia, *Circulation*, 87 suppl.5:v77-v80 (1993).
- ¹⁴ Salvemini D, Korb R, Änggard E, Vane J, Immediate release of a nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by escherichia coli lipopolysaccharide, *Proc Natl Acad Sci* 87:2593-2597 (1990).
- ¹⁵ Evans T, Carpenter A, Kinderman H, Cohen J, Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome, *Circulatory Shock* 41:77-81 (1993).
- ¹⁶ Wakabayashi I, Hatake K, Kakishita E, Nagai K, Diminution of contractile response of the aorta from endotoxin-injected rats, *European Journal of Pharmacology*, 141-117-122 (1987).

-
- ¹⁷ Schneider F, Schott C, Stoclet JC, Julou-Schaeffer G, L-arginine induces relaxation of small mesenteric arteries from endotoxin-treated rats, *European Journal of Pharmacology*, 211:269-272 (1992).
- ¹⁸ Julou-Schaeffer G, Gray GA, Fleming I, Schott C, Parratt JR, Stoclet JC, Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway, *American Journal of Physiology*, 259: h1038-1043 (1990).
- ¹⁹ Julou-Schaeffer G, Gray GA, Fleming I, Schott C, Parratt JR, Stoclet JC, Activation of the L-arginine-nitric oxide pathway is involved in vascular hyporeactivity induced by endotoxin, *Journal of cardiovascular Pharmacology* 17 (suppl.3): s207-s212 (1991).
- ²⁰ Lorente JA, Landin L, Pablo R, Renes E, Liste D, L-arginine pathway in the sepsis syndrome, *Critical Care Medicine* 21:1287-1295 (1993).
- ²¹ Stoclet JC, Fleming I, Gray G, Julou-Schaeffer G, Schneider F, Schott C, Schott C, Parratt JR, Nitric oxide and endotoxemia, *Circulation*, 87 suppl.5:v77-v80 (1993).
- ²² Schott CA, Gray GA, Soclet JC, Dependence of endotoxin-induced vascular hyporeactivity on extracellular L-arginine, *British Journal of Pharmacology*, 108:38-43 (1993).
- ²³ Brady AJB, Poole-Wilson PA, Circulatory failure in septic shock, Nitric oxide: too much of a good thing?, *British heart Journal* 70:103-105 (1993).
- ²⁴ Luo CC, Chen HM, Chiu CH, Lin JN, Chen JC. Effect of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester on intestinal permeability following intestinal ischemia-reperfusion injury in a rat model, *Biol Neonate*, 80:60-63(2001).
- ²⁵ Zamora R, Vodovotz Y, Aulak KS, Kim PK, Kane JM 3rd, Alarcon L, Stuehr DJ, Billiar TR, A DNA microarray study of nitric oxide-induced genes in mouse hepatocytes: implications for hepatic heme oxygenase-1 expression in ischemia/reperfusion, *Nitric Oxide*, 7:165-186 (2002).
- ²⁶ Wei XQ, Charles AG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY, Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase, *Nature*, 375:408-411 (1995)
- ²⁷ MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N, Chen H, Mudgett JS, Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase, *Cell*, 81:641-650 (1995).
- ²⁸ Suzuki Y, Deitch EA, Mishima S, Lu Q, Xu D, Inducible nitric oxide synthase gene knockout mice have increased resistance to gut injury and bacterial translocation after an intestinal ischemia-reperfusion injury, *Crit Care Med*, 28:3692-3696 (2000).
- ²⁹ Harvey RD, Belevych AE, Muscarinic regulation of cardiac ion channels, *Br J Pharmacol*, 139: 1074-1084 (2003).
- ³⁰ Prado G, Taylor L, Zhou X, Ricupero D, Mierke DF, Polgar P, Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors, *J Cellular Physiol*, 193:275-286 (2002).

- ³¹ Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN, Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction, *Pharmacol Ther*, 92:179-212 (2001).
- ³² Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature* 327:524-526 (1987).
- ³³ Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S, Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine, *Nature* 333:664-666 (1988).
- ³⁴ Moncada S, Palmer RM, Higgs EA, Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine, a pathway for the regulation of cell function and communication, *Biochemical Pharmacology*, 38:1709-1715 (1989).
- ³⁵ Fleming I, Julou-Scharffer G, Gray GA, Parratt JR, Stoclet JC, Evidence that an L-arginine/nitric oxide elevation of tissue cyclic GMP content is involved in depression of vascular reactivity by endotoxin, *British Journal of Pharmacology* 103:1047-1052 (1991).
- ³⁶ Schneider F, Bucher B, Schott C, Andre A, Julou-Schaeffer G, Stoclet JC, Effect of bacterial lipopolysaccharide on function of rat small femoral arteries, *American Journal of Physiology*, 266:H191-198 (1994).
- ³⁷ Bogle RG, McLean PG, Ahluwalia A, Vallance P, Impaired vascular sensitivity to nitric oxide in the coronary microvasculature after endotoxaemia, *British Journal of Pharmacology*, 130:118-124 (2000).
- ³⁸ Piepot HA, Boer C, Groeneveld J, Van Lambalgen AA, Sipkema P, Lipopolysaccharide impairs endothelial nitric oxide synthesis in rat renal arteries, *Kidney International* 57:2502-2510 (2000).
- ³⁹ Szabo C, Mitchell JA, Thiemermann C, Vane JR, Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock, *British Journal of Pharmacology*, 108:786-792 (1993).
- ⁴⁰ Myers PR, Wright TF, Tanner MA, Adams HR, EDRF and nitric oxide production in cultured endothelial cells: direct inhibition by E.Coli endotoxin, *American Journal of Physiology*, 262:h710-h718 (1992).
- ⁴¹ Buga GM, Singh R, Pervin S, Rogers NE, Schmitz DA, Jenkinson CP, Cederbaum SD, Ignarro LJ, Arginase activity in endothelial cells: inhibition by N^G-hydroxy-L-arginine during high output NO production, *American Journal of Physiology*, 271:h1988-1998 (1996).
- ⁴² Ruvolo G, Greco E, Speziale G, Nitric oxide formation during cardiopulmonary bypass, *Annals of Thoracic Surgery* 57:1055-1057 (1994).
- ⁴³ Knowles RG, Salter M, Brooks SL, Moncada S, Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat, *Biochemical and biophysical research communications* 172:1042-1048 (1990).
- ⁴⁴ DiRosa M, Radomski M, Carnuccio R, Moncada S, Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages, *Biochemical and biophysical research communications*, 172:1246-1252 (1990).

-
- ⁴⁵ Smith REA, Palmer RMJ, Mondaca S, Coronary vasodilatation induced by endotoxin in the rabbit isolated perfused heart is nitric oxide-dependent and inhibited by dexamethasone, *British Journal of Pharmacology* 104:5-6 (1991).
- ⁴⁶ Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S, Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells, *Proc Natl Acad Sci* 87:10043-10047 (1990).
- ⁴⁷ Thiemermann C, Vane J, Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo, *European Journal of Pharmacology* 182: 591-595 (1990).
- ⁴⁸ Gray GA, Schott C, Julou-Schaeffer G, Fleming I, Parratt JR, Stoclet JC, The effect of inhibitors of the L-arginine/nitric oxide pathway on endotoxin-induced loss of vascular responsiveness in anaesthetized rats, *British Journal of Pharmacology* 103:1218-1224 (1991).
- ⁴⁹ Thiemermann C, Ruetten H, Wu CC, Vane JR, The multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat: attenuation of liver dysfunction by inhibitors of nitric oxide synthase, *British Journal of Pharmacology* 116:2845-2851 (1995).
- ⁵⁰ Nava E, Salazar FJ, Comparative effects of nitric oxide synthesis inhibition and catecholamine treatment in a rat model of endotoxin shock, *European Journal of Clinical Investigation* 27:673-679 (1997).
- ⁵¹ Kilbourn RG, Jubran A, Gross SS, Griffith OW, Levi R, Adams J, Lodato RF, Reversal of endotoxin-mediated shock by N^G-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, *Biochemical and biophysical research communications* 172:1132-1138 (1990).
- ⁵² Wright CE, Rees DD, Moncada S, Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock, *Cardiovascular research* 26:48-57 (1992).
- ⁵³ Klabunde RE, Ritger RC, N^G-monomethyl-L-arginine (NMA) restores arterial blood pressure but reduces cardiac output in a canine model of endotoxic shock, *Biochemical and biophysical research communications* 178:1135-1140 (1991).
- ⁵⁴ Ruetten H, Thiemermann C, Prevention of the expression of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine or aminoethyl-isothiourea in macrophages and in the rat, *Biochemical and biophysical research communications* 225: 525-530 (1996).
- ⁵⁵ Wu CC, Ruetten H, Thiemermann C, Comparison of the effects of aminoguanidine and N^ω-nitro-L-arginine methyl ester on the multiple organ dysfunction caused by endotoxaemia in the rat, *European Journal of Pharmacology*, 300:99-104 (1996).
- ⁵⁶ Dahm PL, Thorne J, Myhre E, Grins E, Martensson L, Blomquist S, Intestinal and hepatic perfusion and metabolism in hypodynamic endotoxic shock. Effect of nitric oxide synthase inhibition, *Acta Anaesthesiol Scand* 43:56-63 (1999).
- ⁵⁷ Ruetten H, Southan GJ, Abate A, Thiemermann C, Attenuation of endotoxin-induced multiple organ dysfunction by 1-amino-2-hydroxy-guanidine, a potent inhibitor of inducible nitric oxide synthase, *British Journal of Pharmacology*, 118:261-270 (1996).

- ⁵⁸ Hayashi Y, Sawa Y, Fukuyama N, Nakazawa H, Matsuda H, Inducible nitric oxide production is an adaptation to cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response, *Annals of Thoracic Surgery*, 72:149-155 (2001).
- ⁵⁹ Schneider F, Lutun P, Hasselman M, Stoclet JC, Tempé JD, Methylene blue increases systemic vascular resistance in human septic shock, *Intensive Care Medicine* 18:309-311 (1992).
- ⁶⁰ Leyh RG, Kofidis T, Strüber M, Fisher S, Knobloch K, Wachsmann B, Hagl C, Simon, AR, Haverich A, Methylene blue: the drug of choice for catecholamine-refractory vasoplegia after cardiopulmonary bypass? *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 125:1426-1431 (2003).
- ⁶¹ Petros A, Lamb G, Leone A, Moncada S, Bennett D, Vallance P, Effects on a nitric x synthase inhibitor in humans with septic shock, *Cardiovascular Research* 28:34-39 (1994).
- ⁶² Kilbourn RG, Jubran A, Gross SS, Griffith OW, Levi R, Adams J, Lodato RF, Reversal of endotoxin-mediated shock by N^G-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, *Biochemical and biophysical research communications* 172:1132-1138 (1990).
- ⁶³ Mulligan MS, Hevel JM, Marletta MA, Ward PA, Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:6338 (1991).
- ⁶⁴ Corbett JA, Tilton RG, Chang K, Hasan KS, Ido Y, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster JR, Williamson JR, McDaniel ML, Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction, *Diabetes*, 41: 552 (1992).
- ⁶⁵ Nichols K, Staines W, Rubin S, Krantis A, Distribution of nitric oxide synthase activity in arterioles and venules of rat and human intestines, *American Journal of Physiology*, 267:G270-G275 (1994).
- ⁶⁶ Yao YM, Redl H, Bahrami S, Schlag G, The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure, *Inflammation Research* 47:201-210 (1998).
- ⁶⁷ Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Heliadis N, Herodotou A, Hatjopoulou E, Petridou E, Sarris K, The implication of nitric oxide in the process of bacterial translocation, *International Surgery* 85:23-26 (2000).
- ⁶⁸ Ohri SK, Becket J, Brannan J, Keogh BE, Taylor KM, Effects of cardiopulmonary bypass on gut blood flow, oxygen utilization, and intramucosal pH, *Ann Thorac Surg* 57:1193-9 (1994).
- ⁶⁹ Hua TC, Moochhala SM, Role of nitric oxide in hemorrhagic shock-induced bacterial translocation, *Journal of Surgical Research* 93:247-256 (2000).
- ⁷⁰ Nilsson H, Sjoblom N, Distension-dependent changes in noradrenaline sensitivity in small arteries from the rat, *Acta Physiologica Scandinavia* 125:429-435 (1985).
- ⁷¹ Coats P, Hillier C, Determination of an optimal axial-length tension for the study of isolated resistance arteries on a pressure myograph, *Experimental Physiology* 84:1085-1094 (1999).

-
- ⁷² McGregor DD, The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat, *Journal of Physiology* 177:21-30 (1965).
- ⁷³ Nichols AJ, Wilson AC, Hiley CR, Effects of chemical sympatectomy with 6-hydroxydopamine on cardiac output and its distribution in the rat, *European Journal of Pharmacology* 109:263-268 (1985).
- ⁷⁴ Warner TD, Simultaneous perfusion of rat isolated superior mesenteric arterial and venous beds: comparison of their vasoconstrictor and vasodilator responses to agonists, *British Journal of Pharmacology* 99:427-433 (1990).
- ⁷⁵ Heinemann A, Stauber RE, Therole of inducible nitric oxide synthase in vascular hyporeactivity of endotoxin-treated and portal hypertensive rats, *European Journal of Pharmacology*, 278:87-90 (1995).
- ⁷⁶ Mitchell JA, Kohlhaas KL, Sorrentino R, Warner TD, Murad F, Vane JR, Induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat mesentery : lack of effect on action of vasoconstrictors, *British journal of Pharmacology* 109:265-270 (1993).
- ⁷⁷ Fruchterman TM, Spain DA, Wilson MA, Harris PD, Garrison RN. Selective microvascular endothelial cell dysfunction in the small intestine following resuscitated hemorrhagic shock Shock, 10:417-22 (1998).
- ⁷⁸ Jackson EK, Campbell WB, The in situ blood perfused rat mesentery : a model for assessing modulation of adrenergic neurotransmission, *European Journal of Pharmacology* 66:217-224 (1980).
- ⁷⁹ Eberl T, Steinlechner R, Hengster P, Herold M, Schrocksnadel H, Salvenmoser W, Rhomberg M, Gnaiger E, Margreiter R, Assessment of endothelial preservation in human cell cultures, *Ann Thorac Surg*, 62:526 (1996).
- ⁸⁰ Cartier R, Pellerin M, Hollmann C, Pelletier LC, Effects of pressure and duration of hyperkalemic infusions on endothelial function, *Ann Thorac Surg* 55:700 (1993).
- ⁸¹ Braman RS, Hendrix SA, Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection, *Anal Chem* 61: 2715-2718 (1989).
- ⁸² Norris PJ, Charles IG, Scorer CA, Emson PC, Studies on the localization and expression of nitric oxide synthase using histochemical techniques, *Histochem J* 27:745-56 (1995).

