

Université de Montréal

**La dysfonction endothéliale des artères
coronaires dans l'hypertrophie ventriculaire gauche**

Par

Olivier Malo

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

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

Novembre, 2001

© Olivier Malo, 2001



W
4
N58
2002
N. 015

**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

Ce mémoire intitulé :

**La dysfonction endothéliale des artères
coronaires dans l'hypertrophie ventriculaire gauche**

présenté par

Olivier Malo

**a été évalué par un jury composé des personnes
suivantes :**

**Louis Dumont
président-rapporteur**

**Louis P. Perrault
directeur de recherche**

**Jocelyn Dupuis
membre du Jury**

SOMMAIRE

L'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) due à l'augmentation de la post-charge peut compliquer la protection myocardique durant la chirurgie. La présence d'une dysfonction endothéliale peut nuire à la perfusion et à la récupération du myocarde après l'ischémie. L'objectif de cette étude est d'identifier les mécanismes responsables de la dysfonction endothéliale des artères coronaires dans un modèle d'HVG chez le porc réalisé via une thoracotomie gauche pour une période de 24 heures et de 60 jours. Un gradient minimal de 15 mmHg est créé par un cordon ombilical 3 cm au-dessus des ostia coronariens. La fonction et la masse du ventricule gauche sont mesurées par échocardiographie transthoracique et par angiographie avant, 24 heures, 1 mois et 2 mois après la chirurgie. La biodisponibilité du NO est évaluée par le dosage du GMP cyclique et des nitrites et nitrates plasmatiques. Des expériences en chambre d'organe sont utilisées pour évaluer la fonction endothéliale des artères coronaires. Après une contraction au PGF 2α , il y a une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium à la sérotonine (couplés aux protéines Gi) et à la bradykinine (couplés aux protéines Gq) ($P < 0.05$) mais non en présence de BK avec N ω -L-arginine (L-Na). Il y a une diminution de la biodisponibilité du NO ($P < 0.05$). Rapidement après le développement de l'HVG, il y a une altération des relaxations dépendantes de l'endothélium des artères coronaires et de la production du NO qui peut compromettre la perfusion myocardique lors de la période périopératoire.

Mots clés : Hypertrophie ventriculaire gauche — Artères coronaires — Endothélium — NO — EDHF

ABSTRACT

Left ventricular hypertrophy (LVH) is a morphological adaptive increase in myocardial mass in response to chronic work overload, which may complicate myocardial protection during surgery. A concomitant endothelial dysfunction may reduce perfusion and hamper myocardium recovery leading. The objective of this study was to assess the presence of endothelial dysfunction in coronary arteries in a porcine model of LVH. Banding was performed through a left thoracotomy for 24 hours and 2-month periods. A minimal gradient of 15 mmHg was created by an umbilical tape 3 cm above the coronary ostia. LV function and mass were documented by transthoracic echocardiography and hemodynamic studies before the surgery, 1 and 2 months after the surgery. Organ chamber experiments were used to evaluate the nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarizing pathways in endothelial cells of coronary arteries. The bioavailability of NO was measured with by cGMP and plamatic nitrite and nitrate. After contraction to PGF2a, there was a significant decrease in endothelium-dependent relaxations to serotonin (5-HT, coupled to Gi-protein) and to bradykinin (BK, coupled to Gq-protein), but not in the presence of BK with Nw-L-arginin (L-NA). Production of NO from coronary arteries in LVH was decreased ($P<0.05$). Early after the development of LVH, NO production from coronary arteries is impaired and may compromise myocardial perfusion in the perioperative period.

Key words : Left ventricular hypertrophy — Coronary artery — Endothelium — NO — EDHF

TABLE DES MATIÈRES

-	Identification des membre du jury.....	ii
-	Résumé.....	iii
-	Abstract.....	iv
-	Table des matières.....	v-vi
-	Liste des figures.....	vii-viii
-	Liste des abréviations.....	ix-x
-	Chapitre 1 : Introduction.....	1-3
-	Chapitre 2 : La fonction endothéliale.....	4
	2. Le rôle de l'endothélium.....	5
	2.1 Les facteurs relaxants dépendants de l'endothélium.....	6
	2.1.1 Le monoxyde d'azote (NO).....	6-9
	2.1.2 La prostacycline.....	9-10
	2.1.3 Le facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium (EDHF).....	10-11
	2.2 Les facteurs contractants dépendants de l'endothélium.....	11
	2.2.1 L'endothéline.....	11-13
	2.2.2 L'angiotensine.....	13-14
	2.2.3 Les radicaux libres.....	14-15
-	Chapitre 3 : Rôle de l'endothélium dans les pathologies cardiovasculaires.....	16
	3.1 L'endothélium régénéré.....	17-18
	3.2 Hypercholestérolémie et athérosclérose.....	18-21
	3.3 Hypertension artérielle systémique.....	21-24
	3.4 Hypertrophie ventriculaire.....	25-26
	3.5 Insuffisance cardiaque.....	26-29

3.6 Transplantation cardiaque.....	29-31
Chapitre 4 : Approche thérapeutique de la dysfonction endothéliale.....	32
4.1 L-arginine et BH ₄	33-34
4.2 Les antioxydants.....	34-35
4.3 Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et l'endothéline.....	35-37
- Contribution originale.....	38-86
- Discussion.....	87-97
- Bibliographie.....	98-125
- Appendices.....	126-134

LISTE DES FIGURES

Chapitre 2

Figure 1 : Les différents facteurs relaxants et contractants dépendants de l'endothélium. AA = acide arachidonique ; Ach = acétylcholine ; ATII = angiotensine II ; BK = bradykinine ; COX = cyclooxygénase ; ECE = enzyme de conversion de l'endothéline ; EDHF = facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium ; ET-1 = endothéline-1 ; O_2^- = anions superoxyde ; P = purines ; PGI_2 = prostacycline ; NO = monoxyde d'azote ; T = thrombine ; TA_2 /Endo = récepteur TP; VP= vasopressine ; TXA_2 = thromboxane A_2 ; 5-HT = récepteur sérotonine; α = alpha-adrénergique (Vanhoutte PM. Say NO to ET. J Auton Nerv Syst 2000;81 :271-277).....5

Figure 2 : La libération et les rôles de l'endothéline-1 (ET-1) au niveau de la paroi vasculaire. AA = acide arachidonique ; AVP = vasopressine arginine ; cAMP = adénosine monophosphate cyclique ; GMPc = guanosine monophosphate cyclique ; ECE = enzyme de conversion de l'endothéline ; ET_A et ET_B = récepteur de l'endothéline-1 ; K_{ca}^{+2} = canaux potassium Ca_2^{+2} dépendant ; NO = monoxyde d'azote ; NOS = oxyde nitrique synthase ; PGI_2 = prostacycline ; X = précurseur inconnu. (Vanhoutte PM. Say NO to ET. J Auton Nerv Syst 2000;81 :271-277).....12

Chapitre 3

Figure 3 : Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et les facteurs de relaxation dépendants de l'endothélium. En inhibant l'enzyme de conversion de l'angiotensine, exprimée à la surface endothéliale, les inhibiteurs de l'ACE préviennent la synthèse de l'angiotensine II, un puissant vasoconstricteur, et la dégradation de la bradykinine, un puissant vasodilatateur. La bradykinine via l'activation du récepteur B_2 entraîne la libération de NO et de l'EDHF par les cellules endothéliales. GMPc : GMP cyclique ; (Mombouli JV, Vanhoutte

PM. Endothelial dysfunction : from physiology to therapy. J Moll Cell Cardiol 1999 ;31 :61-74).....	36
--	----

Appendices

Figure 4 : Courbe dose-réponse 5-HT en présence de L-arginine (10^{-4})...	127
Figure 5 : Courbe dose-réponse BK en présence de L-arginine (10^{-4}).....	128
Figure 6 : Courbe dose-réponse 5-HT en présence du 6-méthyltétrahydroptérine (10^{-4})	129
Figure 7 : Courbe dose-réponse BK en présence du 6-méthyltétrahydroptérine (10^{-4})	130
Figure 8 : Distribution des lésions d'hyperplasie intimale après 2 mois de cerclage aortique	131
Figure 9 : Contenu plasmatique en peroxinitrites après 2 mois de cerclage aortique	132
Figure 10 : Courbe dose-réponse 5-HT en présence de la SOD (150 U/ml) et de CAT (1200 U/ml)	133
Figure 11 : Courbe dose-réponse BK en présence de la SOD (150 U/ml) et de CAT (1200 U/ml)	134

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT : Sérotonine
5-HT_{1D} : Récepteur sérotonine
ADP : Adénosine diphosphate
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ANG II : Angiotensine II
ATP: Adenosine triphosphate
B₂ : Récepteur bradykinine
BH₄ : 5, 6, 7, 8-Tétrahydrobioptérine
BK : Bradykinine
COX : Cyclooxygénase
ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine
ECE : Enzyme de conversion de l'endothéline
EDCF : Facteur contractant dépendant de l'endothélium
EDHF : Facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium
EDRF : Facteur relaxant dépendant de l'endothélium
EET : Acide époxyeicosatriénoïques
EIA : Enzyme immunoessai
eNOS : NO synthase endothéliale
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HVG : Hypertrophie ventriculaire gauche
iNOS : NO synthase inductible
L-Na : Nω-L-arginine
NAC : N-acétylcystéine
NADH : Nicotinamide adénine déshydrogénase
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
nNOS : NO synthase neuronale
NO : monoxyde d'azote
NO₂⁻ : Nitrite

NO_3^- : Nitrate

O_2 : Oxygène

O_2^- : Anion superoxyde

OONO^- : Peroxynitrite

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes

SOD : Superoxyde dismutase

SHR : Rat spontanément hypertendu

TNF : Facteur de nécrose tumorale

VG : Ventricule gauche

Chapitre 1

INTRODUCTION

L'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) secondaire à une sténose aortique ou à l'hypertension artérielle représente l'adaptation morphologique majeure du cœur en réponse à une augmentation de la post-charge. Une surcharge de pression chronique est présente chez 23% des hommes et 33% des femmes de plus de 59 ans (1) et elle est associée à un taux de mortalité de 3-5% provoqué par des complications périopératoires (2). L'augmentation de la masse myocardique requiert une augmentation du flot coronarien pour maintenir la fonction cardiaque ce qui complique la protection myocardique périopératoire à cause d'une déficience de la perfusion sousendocardique et d'un gradient transmyocardique plus élevé (3). De plus, il y a une augmentation de la dysfonction post-ischémique qui implique le sous-endocarde chez des chiens avec une hypertrophie ventriculaire gauche qui induit une diminution de la fonction du ventricule gauche (4) à cause de la relation entre la fonction myocardique et le flot coronarien (5). La présence d'une dysfonction endothéliale pourrait aggraver la situation en diminuant la perfusion durant l'arrêt cardiaque et nuire à sa récupération lors de la reperfusion le rendant plus susceptible à l'ischémie. La dysfonction endothéliale résulte en une réponse vasodilatatrice et vasoconstrictrice anormale aux agents humoraux ou aux médiateurs libérés par les cellules endothéliales ce qui compromet la perfusion des tissus. Ces altérations rendent le myocarde plus susceptible à l'ischémie, d'autant plus que la réserve coronarienne est réduite dans l'HVG (6). Plus récemment, il a été démontré que la relaxation du ventricule gauche qui dépend de l'endothélium est réduite dans un modèle de surcharge de pression malgré une réponse préservée au NO exogène (7). Donc, une dysfonction endothéliale systémique et des artères coronaires a été décrite dans l'hypertension artérielle systémique et dans l'hypertrophie ventriculaire gauche secondaire, mais les altérations des voies de transduction de la cellule endothéliale n'ont pas été décrites dans un modèle plus proche de l'humain. La caractérisation de ces mécanismes et le développement de stratégies pour renverser ou prévenir les altérations de la

fonction endothéliale des artères coronaires dans l'hypertrophie ventriculaire gauche sont des éléments clés à étudier considérant la mortalité reliée aux difficultés de la protection myocardique durant la chirurgie en présence de cette pathologie.

La découverte par Furchgott et Zawadzki du rôle obligatoire joué par les cellules endothéliales dans la relaxation d'organes isolés en réponse à l'acétylcholine (8) a initié une quête scientifique majeure quant au rôle central de l'endothélium dans la fonction physiologique normale de la paroi vasculaire. Rapidement, il est devenu évident que les réponses dépendantes de l'endothélium étaient médiées par la libération de substances diffusibles (facteurs de relaxation et facteurs contractants dépendants de l'endothélium) par les cellules endothéliales. Les prochaines pages concernent la sécrétion de substances vasoactives par les cellules endothéliales entraînant des modifications aiguës du tonus de cellules musculaires lisses et expliqueront qu'une dysfonction des cellules endothéliales peut soustendre ou accompagner plusieurs maladies cardiovasculaires majeures et que l'endothélium est une cible pharmacologique de choix pour le développement d'approches préventives et thérapeutiques.

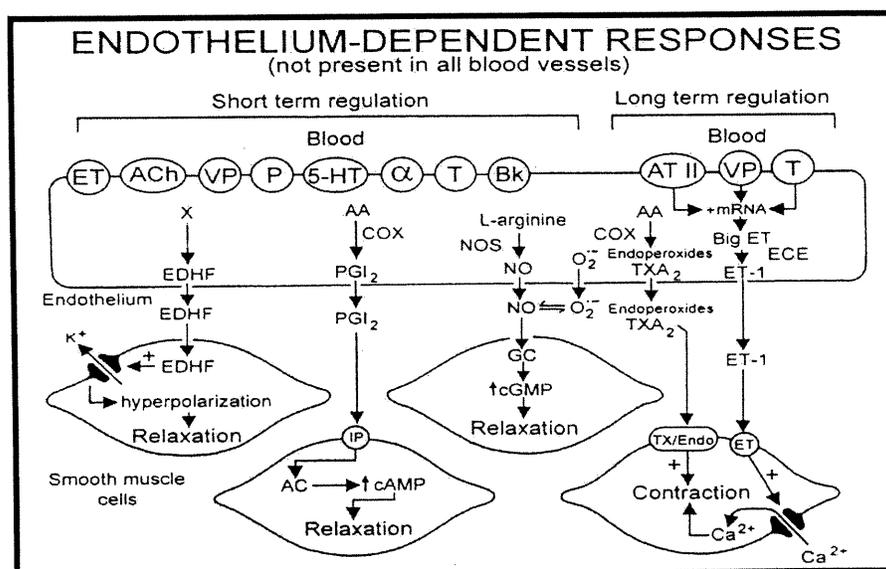
Chapitre 2

LA FONCTION ENDOTHÉLIALE

2. Le rôle de l'endothélium

L'endothélium normal contribue à la régulation du tonus vasomoteur et au maintien d'une surface non thrombogénique, agit en tant que barrière sélective contrôlant la perméabilité et le transport des macromolécules pour aider au métabolisme de plusieurs facteurs circulants dans le sang ou générés au niveau local, et contribue au contrôle de la prolifération du muscle lisse sous-jacent et à régler l'adhésion et l'extravasation des neutrophiles, monocytes et lymphocytes. Ces propriétés sont dues à la capacité des cellules endothéliales à percevoir les stimuli humoraux et hémodynamiques et sont sous-tendus par trois mécanismes de base : 1) la sécrétion de facteurs dépendants de l'endothélium, 2) l'expression à la surface membranaire de la cellule de protéines de couplage, de molécules d'adhésion, d'enzymes (enzymes de conversion) et 3) de changements morphologiques. Les cellules endothéliales libèrent de multiples substances qui induisent soit une vasodilatation ou une vasoconstriction du muscle lisse vasculaire sous-jacent dont les principales sont le monoxyde d'azote, la prostacycline, le facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium, la thromboxane A₂, les endoperoxydes, les anions superoxydes et l'endothéline (Figure 1).

Figure 1



2.1 Les facteurs relaxants dépendants de l'endothélium

2.1.1. Le monoxyde d'azote (NO)

La substance diffusible, labile et non prostanoloïde qui médie la réponse dépendante de l'endothélium à l'acétylcholine, décrite par Furchgott et Zawadzki (8) est le monoxyde d'azote (NO) (9). Le NO est formé à partir de la L-Arginine, sous l'action d'une enzyme exprimée constitutivement dans les cellules endothéliales appelée NO synthase endothéliale ou eNOS (10). L'activation de la eNOS dépend de la concentration intracellulaire des ions calciques dans la cellule endothéliale, de la calmoduline, et requiert du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) et de la 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH₄) pour son activité optimale. Une concentration optimale de BH₄ est requise pour l'activité de la eNOS, donc essentielle à la production de NO (11). De plus, une réduction de la biodisponibilité du BH₄ est associée aux pathologies vasculaires ce qui lui confirme un rôle important dans le système cardiovasculaire (12). En effet, le BH₄ est un cofacteur critique pour la eNOS et paraît collaborer à la liaison de la L-arginine avec l'enzyme (13). La eNOS est inhibée de façon compétitive par des analogues de la L-arginine tel que le N^G-monométhyl-L-arginine ou le N^G-nitro-L-arginine. En plus de cette enzyme présente dans les cellules endothéliales normales, deux autres isoformes de cette enzyme sont connus : une neuronale (nNOS) et une forme inductible (iNOS) qui est indépendante du calcium et qui peut être observée au niveau du muscle lisse vasculaire et des leucocytes après exposition à des endotoxines, tel le facteur de nécrose tumorale (TNF) et autres cytokines. Le NO diffuse vers les cellules du muscle vasculaire lisse, et entraînent leur relaxation en stimulant une enzyme cytosolique, la guanylate-cyclase soluble, qui induit une augmentation de 3'-5'-guanosine monophosphate cyclique (GMP cyclique) (Figure 1). Comme second messager, le GMP cyclique est responsable de la plupart des effets biologiques du NO. Le GMP cyclique

active une protéine kinase dépendante de ce dernier qui entraîne la phosphorylation des canaux calciques ce qui diminue la concentration intracellulaire des ions calciques dans les cellules du muscle lisse vasculaire (14). Cette dernière est associée avec l'inhibition de l'appareil contractile. La production de NO est un facteur majeur de la relaxation dépendante de l'endothélium des artères musculaires isolées, incluant les artères coronaires, systémiques, mésentériques, pulmonaires et cérébrales. Son importance *in vivo* est suggérée par les observations selon lesquelles les inhibiteurs de la eNOS provoquent la vasoconstriction dans la plupart des lits vasculaires, et une augmentation de la pression artérielle systémique, à la fois chez les animaux et chez l'humain (15). Le NO contribue donc à la balance entre la vasodilatation et la vasoconstriction qui détermine le tonus vasculaire.

Le NO ne provoque pas seulement la dilatation des vaisseaux, mais inhibe l'adhésion et l'aggrégation des plaquettes (action synergique avec la prostacycline) (16) et empêche également la croissance et la prolifération du muscle lisse vasculaire (17). Le NO libéré par les cellules endothéliales des artères coronaires joue un rôle spécifique sur la fonction myocardique en favorisant la relaxation myocardique et la fonction diastolique, en réduisant la consommation d'oxygène, par un effet inotropique positif et négatif, et a l'inhibition de la réponse β -adrénergique (7). Il influence également l'influx calcique du sarcolemme et le rythme cardiaque (7).

La production du NO est influencée également par des stimuli humoraux et physiques. Parmi les stimuli physiques, les forces de cisaillement provoquées par l'écoulement du sang le long des parois vasculaires, sont les facteurs principaux qui régissent la production locale de NO. En effet, la vasodilatation dépendante du flot est dépendante de l'endothélium *in vivo* (18). Des études de bioessais ont montré qu'une augmentation du débit et la pulsatilité stimulent la production de NO et de prostacycline par l'endothélium des vaisseaux perfusés (19). La vasoconstriction d'artères induite par

l'élévation de la pression endoluminale peut être évitée par l'enlèvement de l'endothélium et est due en partie à une production diminuée de NO (20).

De nombreux médiateurs neurohumoraux peuvent entraîner la libération de NO par une activation de récepteurs endothéliaux spécifiques. Ces substances endogènes capables de stimuler cette relâche sont soit des hormones circulantes (catécholamines, vasopressine), des autacoïdes générés au niveau de la paroi vasculaire (bradykinine, histamine) ou des médiateurs produits par les plaquettes (sérotonine, adénosine diphosphate [ADP]), ou formés lors de la coagulation (thrombine) (21;22). Les récepteurs pour ces composés sont en relation avec la production de NO par différentes protéines de couplage. Par exemple, dans les cellules endothéliales porcines, les récepteurs α_2 -adrénergiques, sérotoninergiques et thrombinergiques sont couplés à des protéines G_i sensibles à la toxine de la coqueluche, alors que pour l'ADP et la bradykinine, ces récepteurs médient la production de NO par l'activation de protéines G_q qui ne sont pas sensibles à la toxine de la coqueluche (23).

Du point de vue physiologique, ces substances, produites durant l'aggrégation plaquettaire, sont d'importants producteurs de NO. Cette conclusion est basée sur le constat que, dans plusieurs espèces, dont l'homme, l'aggrégation plaquettaire induit une relaxation dépendante de l'endothélium et que la présence d'endothélium inhibe de façon substantielle la vasoconstriction induite par la thromboxane A_2 et la sérotonine dérivées des plaquettes. Il existe deux médiateurs majeurs de la réponse endothéliale aux plaquettes : la sérotonine et l'adénosine diphosphate (ADP), qui agissent respectivement sur les récepteurs $5-HT_{1D}$ sérotoninergiques et P_2 -purinergiques. L'action endothéliale de la thrombine et des produits plaquettaires est cruciale pour le rôle protecteur joué par l'endothélium normal contre une coagulation inappropriée. De ce fait, l'aggrégation plaquettaire locale avec sa relâche inévitable de sérotonine et d'ADP en plus

de la production de thrombine (la cause de l'activation locale de la cascade de la coagulation) entraîne une libération locale massive de NO, qui diffuse vers le muscle lisse sous-jacent, induit sa relaxation, donc la dilatation de l'artère. Cette réaction aide à éliminer les microagrégats. La libération de NO dans la lumière du vaisseau inhibe également l'adhésion plaquettaire, éliminant le danger immédiat d'occlusion vasculaire. Par ailleurs, la barrière endothéliale prévient la diffusion des substances vasoconstrictrices dérivées des plaquettes (surtout la thromboxane A_2 et la sérotonine) vers le muscle lisse vasculaire. Par conséquent si la barrière endothéliale est supprimée, par exemple secondairement à un traumatisme, il y a interruption de la rétroaction et l'aggrégation se poursuit par la libération constante de sérotonine et de thromboxane A_2 , qui vont tous deux, en l'absence d'endothélium, avoir un accès illimité au muscle lisse vasculaire. Le muscle lisse se contracte et le vaisseau s'occlut pour constituer la phase vasculaire de l'hémostase (21-24).

2.1.2. La prostacycline

La prostacycline, un produit majeur de la cyclooxygénase vasculaire, est formée principalement au niveau des cellules endothéliales, mais également dans la média et l'adventice, en réponse aux forces de cisaillement, à l'hypoxie et à plusieurs médiateurs qui libèrent aussi le NO. La prostacycline provoque la relaxation du muscle lisse vasculaire en activant l'adénylate cyclase soluble et en augmentant la production de 3'-5' adénosine monophosphate cyclique (AMP cyclique) (25) (Figure 1). Dans la plupart des lits vasculaires, la contribution de la prostacycline à la relaxation dépendante de l'endothélium est négligeable, et son effet est essentiellement additif à celui du NO. De plus, ces deux substances agissent en synergie pour inhiber l'aggrégation plaquettaire (26). La prostacycline facilite la libération du NO par les cellules endothéliales (27). De plus, l'action de la prostacycline au niveau du muscle lisse vasculaire est amplifiée par le NO. En effet,

l'augmentation du GMP cyclique inhibe la phosphodiesterase qui dégrade l'AMP cyclique. Donc, le NO prolonge de façon indirecte la demi-vie du second messenger de la prostacycline (27).

2.1.3. Le facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium (EDHF).

Les études électrophysiologiques réalisées sur diverses artères, dont l'artère coronaire humaine, démontrent que l'acétylcholine et d'autres vasodilatateurs dépendants de l'endothélium comme la bradykinine provoquent des hyperpolarisations et des relaxations dépendantes de l'endothélium, qui sont dues à un facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium diffusible (EDHF) différent du NO et de la prostacycline (28). Dans certains vaisseaux sanguins, l'EDHF possède les caractéristiques des acides épixyeicosatriénoïques (EET), formés à partir de l'acide arachidonique par l'action du cytochrome P-450 (29). L'isoforme CYP9 du cytochrome P-450 a été identifié comme le principal producteur de l'EDHF (30).

L'hyperpolarisation des cellules du muscle lisse induite par l'EDHF est médiée par une augmentation du flux des ions potassium via des canaux potassium ATP-dépendants (31) (Figure 1). Comme pour le NO, la libération du facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium nécessite aussi une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire dans les cellules endothéliales.

La contribution de l'hyperpolarisation à la relaxation vasculaire dépendante de l'endothélium varie en fonction de la taille de l'artère et est plus importante au niveau des microvaisseaux (32). Dans les artères de gros calibre, les deux médiateurs contribuent néanmoins aux relaxations dépendantes de l'endothélium, mais le NO prédomine en situation normale. Néanmoins, dans ces artères, l'EDHF peut médier des relaxations dépendantes de l'endothélium quasi normales lorsque la synthèse de NO est inhibée. Donc,

la contribution de l'EDHF peut être importante lors d'altérations de la voie du NO et peut servir de système de recharge pour la régulation du tonus vasculaire lorsque la production ou l'activité du NO sont réduites (33).

2.2. Les facteurs contractants dépendants de l'endothélium

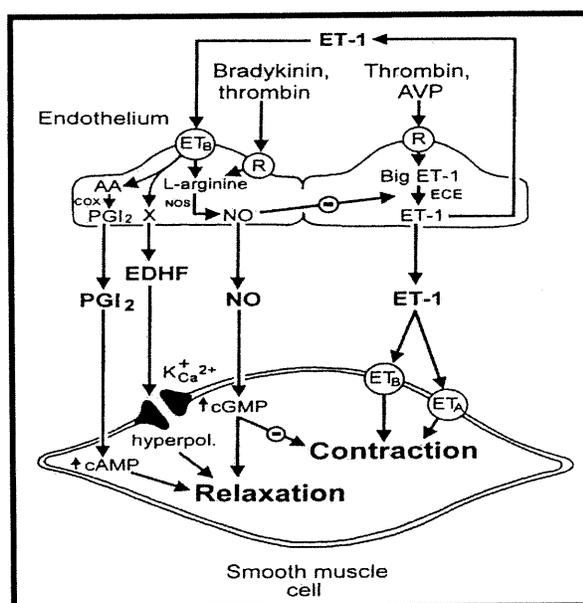
Dans certaines conditions, l'endothélium peut initier une vasoconstriction par la libération de substances diffusibles. Les contractions dépendantes de l'endothélium peuvent être expliquées soit par la suppression de la libération du NO, soit par la production de substances vasoconstrictrices diffusibles (EDCF). Les EDCF identifiés à ce jour comprennent les anions superoxydes (qui agissent en éliminant le NO), les endoperoxydes, le thromboxane A₂, et l'endothéline-1 (Figure 1) (34).

2.2.1 Endothéline

Les cellules endothéliales produisent la pro-hormone, la big-endothéline, et expriment l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) pour produire l'endothéline-1 (ET-1). L'endothéline est considérée comme le plus puissant vasoconstricteur (35). Ce dernier joue probablement un rôle dans la modulation à long terme du tonus vasculaire. La libération d'endothéline est stimulée par la thrombine, l'interleukine-1, le facteur de croissance β_1 , les produits des plaquettes et les neurohormones comme la vasopressine et les catécholamines. Cependant, la synthèse d'endothéline-1 par les cellules endothéliales est inhibée par la production de NO (27). Le NO inhibe l'expression et la production de l'ET-1 (Figure 2) (36). Les concentrations sanguines d'ET-1 sont faibles en conditions normales et provoquent une vasodilatation à basses concentrations, par l'activation des récepteurs ET_B exprimés à la surface des cellules endothéliales (37). La stimulation de ces derniers provoque la libération de NO, de prostacycline et d'EDHF (36). À des concentrations plus élevées, l'endothéline-1 provoque des contractions

prolongées via l'activation des récepteurs ET_A et ET_B localisés sur les cellules du muscle lisse vasculaire (38). Le récepteur ET_A médie la vasoconstriction et la prolifération du muscle lisse vasculaire (Figure 2).

Figure 2



Une surproduction du peptide endothéline-1 par les cellules endothéliales serait contrée, en conditions normales par une production accrue de NO qui inhibe immédiatement la génération d'endothéline et son effet vasoconstricteur (36). Cette rétroinhibition de la production et de l'action de l'endothéline n'est pas seulement limitée à l'action de l'oxyde nitrique, mais implique également à la libération de la prostacycline et de l'EDHF (39).

Dans un modèle expérimental d'hypercholestérolémie, la dysfonction endothéliale n'est pas seulement associée à une diminution de l'activité du NO mais également à une augmentation de l'activité de l'ET-1, suggérant que ce déséquilibre soit responsable du développement précoce de l'athérosclérose (38). Dans un modèle *in vivo* de surcharge de pression, le développement de l'hypertrophie cardiaque est partiellement inhibé par l'utilisation d'un antagoniste sélectif du récepteur ET_A , le BQ123 (40). Ceci

peut suggérer un rôle de l'ET-1 dans le développement de l'hypertrophie mais son rôle exact dans la physiopathologie de l'hypertrophie ventriculaire et de l'hypertension artérielle systémique est encore très controversé.

2.2.2. Angiotensine II

Les cellules endothéliales expriment les récepteurs de l'angiotensine II (Ang II) (41) dans certains lits vasculaires. La stimulation des récepteurs endothéliaux AT_1 couplés à la phospholipase C libèrent le NO et la prostacycline qui inhibent l'effet vasoconstricteur de l'angiotensine II (27). L'activation des récepteur AT_2 et des récepteurs de l'angiotensine (1-7) entraîne la relaxation dépendante de l'endothélium à la bradykinine (42). L'angiotensine (1-7) est un métabolite de l'angiotensine I qui s'accumule lors de l'inhibition de l'enzyme de conversion (27). De plus, il agit comme un inhibiteur endogène de l'enzyme de conversion qui potentialise l'effet de la bradykinine sur l'endothélium vasculaire via les récepteurs B_2 (27). Également, il inhibe l'expression du gène du récepteur AT_1 est inhibé par le monoxyde d'azote (27). Au niveau des cellules du muscle lisse vasculaire, l'angiotensine II a plusieurs effets dont une vasoconstriction et une stimulation de la prolifération cellulaire via les récepteurs AT_1 (43). L'angiotensine II stimule également la production de radicaux libres via la NADH/NADPH oxydase au niveau du muscle lisse vasculaire qui piège le NO (44). Il augmente aussi l'expression et la libération de l'endothéline par les cellules musculaires lisses pour produire une vasoconstriction plus importante (27).

Dans l'hypertension artérielle, une augmentation plasmatique et tissulaire de l'Ang II a été documentée. L'angiotensine II stimule la libération de ET-1 des cellules endothéliales mais le NO inhibe l'expression et la production de l'ET-1. En présence d'une dysfonction endothéliale, la production du NO est réduite ce qui peut augmenter la génération d'ET-1 et initier une réponse

vasoconstrictrice via la voie de l'Ang II. Donc, l'angiotensine II n'agit pas seulement via la voie de l'endothéline mais augmente également le stress oxydatif via la NADH/NADPH oxydase, un mécanisme important dans le développement des maladies cardiovasculaires (45).

2.2.3. Les radicaux libres

Les radicaux libres, dérivés de l'oxygène, sont impliqués dans la pathophysiologie de plusieurs maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose, l'hypercholestérolémie, l'hypertension et les lésions d'ischémie-reperfusion (46). Le terme stress oxydatif est souvent utilisé pour exprimer une condition où les cellules endothéliales sont exposées à un niveau excessif d'anions superoxydes (O_2^-). La source majeure de radicaux libres est la NADH/NADPH oxydase localisée au niveau des cellules endothéliales et du muscle lisse vasculaire (46). Son activité est réglée par les cytokines, l'angiotensine II, l'étirement qui sont tous impliqués dans la pathogénèse de maladies vasculaires reliée au stress oxydatif (46). Une autre source vasculaire potentielle du stress oxydatif est la eNOS. Des études récentes ont démontré que cette enzyme est en mesure de produire des radicaux libres en absence de ses co-facteurs importants soient la L-arginine et la tétrahydrobioptérine (46). Une production pathologique excessive de O_2^- au sein des cellules endothéliales entraîne une réaction rapide avec le monoxyde d'azote pour former des peroxynitrites ($OONO^-$) (47). Les peroxynitrites sont de puissants oxydants et participent au dommage cellulaire (48). L'effet majeur des radicaux libres est la peroxydation des lipides qui mènent à une augmentation de la perméabilité membranaire des cellules endothéliales qui peut être impliquée dans la détérioration de la fonction endothéliale. Les cellules possèdent cependant la capacité de se défendre contre le stress oxydatif grâce à des mécanismes antioxydants incluant : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathione peroxydase et la glutathione réductase (49). Comme les radicaux

libres dérivés de l'endothélium détruisent le NO ou réagissent avec celui-ci (Figure 1) (50), les antioxydants comme la SOD améliorent les relaxations dépendantes de l'endothélium (51). D'autres constituants cellulaires connus jouent un rôle important dans la défense contre les radicaux libres : les vitamines C et E (14). Le monoxyde d'azote participe également à la détérioration de la fonction endothéliale par la réaction avec le O_2^- pour former un puissant oxydant, les peroxydrites ($ONOO^-$) (52). En absence de BH_4 , la eNOS devient une source majeure d'anions superoxydes plutôt que de produire du NO (53). L'augmentation de la génération de O_2^- au niveau de la paroi vasculaire inhibe plusieurs fonctions physiologiques du NO : la régulation du flot, l'inhibition de l'adhésion et de l'aggrégation des plaquettes et le contrôle de la croissance cellulaire (46). Les radicaux libres induisent une dysfonction endothéliale des artères coronaires chez le porc par le déplacement de la courbe dose-réponse de la relaxation dépendante de l'endothélium à la bradykinine sans affecter cependant la relaxation maximale (54). Les radicaux libres peuvent donc directement influencer le signal de transduction des protéines G. Subséquemment, une augmentation du stress oxydatif peut provoquer un découplage fonctionnel des protéines G (23).

Chapitre 3

RÔLE DE L'ENDOTHÉLIUM DANS LES PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES

L'endothélium, via diverses voies de signalisations, joue un rôle majeur dans l'homéostasie cardiovasculaire et dans la fonction des organes. Son emplacement stratégique entre les cellules musculaires lisses et le sang explique que c'est une cible facile pour les agressions diverses en rapport avec les facteurs de risque cardiovasculaires. Dans plusieurs types de pathologies cardiovasculaires (l'hypertension, l'hypercholestérolémie, l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque), les cellules endothéliales perdent leur fonctionnalité. Ce dysfonctionnement se manifeste sous la forme d'une altération des relaxations dépendantes de l'endothélium, qui est due à une libération ou une action diminuée des EDRFs et/ou à une tendance accrue à provoquer des contractions dépendantes de l'endothélium.

3.1 L'endothélium régénéré

Le processus normal de vieillissement induit un turnover et une régénération des cellules endothéliales qui résulte en une fonction anormale. En effet, la durée de vie normale des cellules endothéliales humaines adultes a été estimée à environ 30 ans (55). Après, les cellules sont en période de sénescence et sont remplacées par un endothélium régénéré. Cependant, ces cellules régénérées ont perdu une partie de leur capacité à libérer des EDRF en particulier en réponse à l'aggrégation plaquettaire et la thrombine (56). Cette conclusion repose sur des études animales *in vivo* dans lesquelles la régénération et les caractéristiques des réponses dépendantes de l'endothélium ont été monitorisées après la dénudation de l'endothélium (57;58). La régénération de l'endothélium est satisfaisante mais l'endothélium régénéré n'est plus capable de prévenir les contractions induites par l'aggrégation plaquettaire. En effet, l'endothélium régénéré a une réponse altérée à la sérotonine et à d'autres substances utilisant la voie des protéines G_i , sensibles à la toxine de la coqueluche, qui contrôle la libération d'EDRF. Dans les cellules endothéliales régénérées en culture,

l'expression des protéines G_i est normale mais leur activité est réduite (59). La perte de cette réponse est sélective aux relaxations médiées par les protéines G_i et ne s'applique pas aux réponses dépendantes de l'endothélium à l'ADP ou à la bradykinine. La zone d'endothélium régénéré devient un site de prédilection pour l'amorce de vasoconstriction exagérée en réponse à la sérotonine (60). D'un point de vue clinique, il en résulte des vasospasmes, des thromboses et de l'athérombose (14).

3.2 Hypercholestérolémie et athérosclérose

L'hypercholestérolémie a été la première pathologie associée avec une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium (61). Chez des animaux tel que le lapin, l'hypercholestérolémie induite par une diète riche en graisse et/ou en cholestérol induit une altération des relaxations dépendantes de l'endothélium (62;63). En revanche, les relaxations indépendantes de l'endothélium à la nitroglycérine, au nitroprussiate de sodium et à l'adénosine sont normales ou seulement légèrement altérées. Une détérioration progressive des relaxations dépendantes de l'endothélium est également observée chez les lapins génétiquement hyperlipédimiques (64). Les relaxations dépendantes de l'endothélium sont également réduites dans la microcirculation coronaire des animaux hypercholestérolémiques et des primates avec athérosclérose (65;66).

Les relaxations dépendantes de l'endothélium sont également altérées chez les humains porteurs d'athérosclérose et/ou d'hyperlipidémie au niveau des artères coronaires épicaudiques et des artères périphérique (67). Cette conclusion repose sur des études effectuées sur des artères isolées prélevées chez des receveurs de transplantation cardiaque, dans lesquelles les relaxations dépendantes de l'endothélium sont altérées dans les segments athérosclérotiques par rapport aux segments sains (68). Des études coronarographiques ont montré que les artères coronaires avec

lésions athérosclérotiques se contractaient à l'injection d'acétylcholine, alors que l'acétylcholine produit une vasodilatation ou une absence de changement du diamètre coronaire chez les patients normaux (69). Des études avec des inhibiteurs de la voie L-arginine-NO (bleu de méthylène, hémoglobine libre et le Ng-monométhyl-L-arginine), suggèrent que les dilatations coronaires induites par l'acétylcholine sont médiées principalement par le NO (70;71). Ces artères sont capables de se dilater en réponse à la nitroglycérine. De ce fait, les vasoconstrictions paradoxales à l'acétylcholine des artères athérosclérotiques suggèrent l'apparition d'une dysfonction endothéliale avec perte de l'effet vasodilatateur du NO pour enrayer l'effet constricteur direct de l'acétylcholine au niveau du muscle lisse vasculaire.

Cette dysfonction endothéliale survient même en l'absence d'épaississement intimal et est un événement précoce et pathologique de l'athérogénèse (72-74). Les réponses anormales à l'acétylcholine sont directement liées aux facteurs de risque de la maladie coronarienne, et le degré de vasoconstriction (ou de vasodilatation) à l'acétylcholine varie de façon linéaire avec le taux de cholestérol (75). La dysfonction endothéliale survient de façon prédominante au niveau des embranchements coronariens ce qui peut expliquer la prédisposition de ces sites, au flot turbulent, à développer de l'athérosclérose (76). L'endothélium est également dysfonctionnel dans les microvaisseaux des patients athérosclérotiques aussi bien dans le réseau coronaire que dans la circulation périphérique (77;78).

À cause de la prédominance du NO dans les relaxations dépendantes de l'endothélium, particulièrement dans les artères de fort calibre, plusieurs groupes se sont intéressés aux altérations potentielles de la voie L-arginine-NO pour expliquer les réponses réduites à l'acétylcholine et autres agonistes dans l'athérosclérose. Les mécanismes possibles incluent une disponibilité diminuée de la L-arginine intracellulaire, des altérations des mécanismes du

signal de transduction, des modifications de l'expression ou de l'activité de la eNOS, ou une destruction accrue du NO (79). Une disponibilité diminuée de la L-arginine paraît peu probable, puisque les cellules endothéliales contiennent des concentrations de ce substrat mille fois supérieures (concentration millimolaire) à celles optimales pour l'activité de la eNOS (concentration micromolaire). Cependant, un défaut de transport intracellulaire amènerait une biodisponibilité réduite de la L-arginine qui pourrait être responsable de la diminution de la libération de NO par les cellules endothéliales.

Au stade précoce de l'athérosclérose, la dysfonction endothéliale apparaît limitée à la voie dépendante des protéines G_i , qui sont sensibles à la toxine de la coqueluche, qui mène à la formation de NO ; la capacité des cellules endothéliales régénérées, à produire une ADP-ribosylation de la toxine coqueluche est réduite après une exposition chronique à de fortes concentrations de cholestérol (80). Par conséquent, dans les artères coronaires de porcs hypercholestérolémiques, les relaxations dépendantes de l'endothélium évoquées par les agents activant les protéines G_i sensibles à la toxine de la coqueluche sont réduites. Les lipoprotéines de faible densité oxydées qui sont considérées plus athérogéniques que les LDL natives, *in vitro*, induisent une dysfonction endothéliale sélective similaire pour les stimuli activant la voie des protéines G_i sensibles à la toxine de la coqueluche, alors qu'à haute concentration, elles inhibent également les relaxations dépendantes de l'endothélium évoquées par des stimuli indépendants des récepteurs (A23187) (81).

Le mécanisme le plus important de la réduction des relaxations dépendantes de l'endothélium est une libération diminuée de NO. Néanmoins, au fur et à mesure que la maladie progresse et que l'artère s'épaissit et devient plus rigide, il apparaît de plus en plus difficile pour le NO d'atteindre le muscle lisse vasculaire qui a encore la capacité de se relâcher.

La dysfonction endothéliale est probablement un des principaux responsables de la progression de l'athérosclérose (55). Un des mécanismes majeurs dans l'altération des relaxations dépendantes de l'endothélium médiés par le NO est sa destruction par les anions superoxydes. Des études démontrent que l'atteinte des relaxations dépendantes de l'endothélium dans l'hypercholestérolémie est provoquée par un déséquilibre entre la production de NO et les O_2^- ce qui entraîne la formation de radicaux libres (46). Cette hypothèse stipule que le vieillissement et l'exposition prolongée aux forces de cisaillement, couplés aux facteurs de risque tels que l'hypertension artérielle systémique, le tabagisme, et le stress, accélèrent le vieillissement de l'endothélium et de ce fait, le processus de régénération endothéliale. Ainsi, des zones de plus en plus grandes d'endothélium deviennent incapables de résister à l'adhésion et à l'aggrégation plaquettaire, et répondent moins bien à la formation de thrombine. L'effet de rétroaction du NO (et de la prostacycline) diminue de façon constante, alors que les facteurs vasoconstricteurs (sérotonine et thromboxane A₂) sont libérés en plus grande quantité en même temps que des facteurs de croissance tel que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), qui est probablement responsable de l'initiation des changements morphologiques caractéristiques de l'athérosclérose (82;83).

3.3 Hypertension artérielle systémique

Les relaxations dépendantes de l'endothélium sont réduites dans les artères de différents modèles animaux pathologiques. De même, dans la circulation de l'avant-bras des patients hypertendus, la réponse vasodilatatrice à l'injection intraartérielle d'acétylcholine est atténuée (84-86). Ces constatations suggèrent que la libération d'EDRF est diminuée dans les vaisseaux hypertendus.

Des inhibiteurs de la eNOS peuvent causer une augmentation soutenue de la pression artérielle chez des animaux intacts et une vasoconstriction périphérique chez des humains normotendus (87). Puisque ces inhibiteurs causent une vasoconstriction moindre de l'avant-bras des hypertendus par rapport aux sujets normotendus (88-90), une réduction de l'efficacité de la voie L-arginine-NO pourrait contribuer à l'augmentation caractéristique de la résistance périphérique de l'hypertension chronique. Une conclusion similaire pourrait expliquer la baisse de la diminution des réponses dépendantes de l'endothélium dans les vaisseaux isolés des animaux hypertendus. Par exemple, dans l'aorte de rat Dahl avec hypertension sodium-dépendante, les relaxations dépendantes de l'endothélium à l'acétylcholine sont diminuées ce qui suggère une libération diminuée de NO (91).

Cependant, les réponses du muscle lisse vasculaire aux donneurs de NO sont également diminuées ce qui implique que la réponse diminuée à l'acétylcholine est due en partie à une réactivité moindre du muscle vasculaire chez l'hypertendu aux médiateurs endothéliaux (92). Toutes les réductions des relaxations dépendantes de l'endothélium à l'acétylcholine observées chez les animaux hypertensifs et chez les humains ne peuvent être attribuées à des anomalies de la voie L-arginine-NO. En effet, dans les artères de rats spontanément hypertendus (SHR), des réponses diminuées sont observées malgré des libérations normales d'EDRF (93). La réponse aux vasodilatateurs dépendants de l'endothélium peut être normalisée par des inhibiteurs de la cyclooxygénase (COX) (94). De ce fait dans ce modèle d'hypertension, la diminution des réponses dépendantes de l'endothélium est plutôt expliquée par la production concomitante de NO et d'EDCF, avec une destruction du NO par ces facteurs contractants par réaction chimique (95). De même, une libération diminuée d'EDHF pourrait aussi contribuer aux relaxations dépendantes de l'endothélium anormales (96).

Puisque les atteintes des relaxations dépendantes de l'endothélium sont corrigées par un traitement anti-hypertenseur approprié (97), ces diminutions des relaxations dépendantes de l'endothélium ne doivent pas être vues comme étant la principale cause de l'augmentation de pression artérielle (98). De plus, chez les patients hypertendus, la réponse vasoconstrictrice périphérique aux inhibiteurs de la eNOS est normalisée par les agents anti-hypertenseurs (99). Dans les artères de jeunes rats SHR, la relaxation à l'acétylcholine devient progressivement altérée à mesure que la pression artérielle augmente (100). Ceci suggère que la perte partielle des relaxations dépendantes de l'endothélium peut résulter du vieillissement précoce du vaisseau sanguin exposé de façon chronique à des pressions de distension plus élevées. Si ceci est vrai, la diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium ne joue probablement pas un rôle de premier plan dans l'initiation de l'hypertension. Cependant au stade tardif de la maladie, elle pourrait jouer un rôle dans le maintien d'une résistance périphérique élevée ou favoriser l'apparition de complications telle que l'athérosclérose (101). Le vieillissement prématuré pourrait expliquer la réduction des hyperpolarisations dépendantes de l'endothélium observées dans les artères hypertendus, puisque ce type de réponse diminue de façon marquée avec l'âge même chez les animaux normotendus (102).

Dans les anneaux quiescents d'aorte de rat SHR, l'acétylcholine cause des contractions dépendantes de l'endothélium. Des contractions similaires sont obtenues également en réponse à l'acide arachidonique, la sérotonine, l'endothéline et les nucléotides adénines (100). La libération d'EDCF causée par la sérotonine et l'ADP pourrait expliquer pourquoi la présence d'endothélium ne diminue pas les contractions induites par l'aggrégation plaquettaire dans l'aorte des rats SHR, comme elle le fait dans les vaisseaux de contrôles normotendus (103). Un EDCF dépendant de la cyclooxygénase est impliqué puisque ces réponses peuvent être prévenues par l'indométhacine. Cette libération d'EDCF expliquerait pourquoi des

relaxations anormales à l'acétylcholine sont observées dans l'aorte et les artères de résistance (100) du rat SHR. La même chose pourrait être vraie pour certains types d'hypertension humaine, telle que l'hypertension artérielle essentielle, puisque dans ce cas, l'administration locale d'indométhacine normalise la réponse vasodilatatrice à l'injection intraartérielle d'acétylcholine (86).

Les contractions dépendantes de l'endothélium dans l'aorte de rat SHR sont augmentées par des inhibiteurs de la eNOS et par l'oxyhémoglobine (qui inactive le NO) mais pas par le bleu de méthylène (qui inhibe la guanylate cyclase soluble et les relaxations causées par le NO). L'interprétation logique de ces constatations est que l'EDCF libéré par l'endothélium hypertendu interagit de façon chimique avec le NO et que les deux médiateurs s'inactivent l'un l'autre (104). Une telle interaction chimique expliquerait certainement la diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium malgré une libération normale d'EDRF et une réactivité normale du muscle lisse vasculaire dans l'aorte de rat SHR aux donneurs exogènes de NO en l'absence d'endothélium (100).

Les réponses à l'acétylcholine, l'acide arachidonique et les nucléotides adénines ne sont pas prévenues par des inhibiteurs de thromboxane synthase mais sont abolies par des antagonistes des récepteurs endoperoxyde/thromboxane (105). De ce fait, l'EDCF impliqué serait un endoperoxyde. La libération accrue de prostaglandine H₂ chez le rat SHR pourrait résulter d'une plus grande expression de la cyclooxygénase (99) et/ou d'une altération du métabolisme des endoperoxydes en prostanoides. En plus d'une production accrue d'endoperoxydes, une altération de la réactivité du muscle lisse vasculaire pourrait contribuer aux contractions dépendantes de l'endothélium (99). Dans le cas des contractions dépendantes de l'endothélium médiées par l'endothéline, le médiateur endothélial impliqué semble être la thromboxane A₂.

3.4 Hypertrophie ventriculaire

La sténose valvulaire aortique induit plusieurs changements adaptatifs au niveau du cœur, entre autres l'augmentation des forces de cisaillements et le développement de l'hypertrophie. L'induction de la perturbation du flot coronarien affecte la morphologie et la fonction des cellules endothéliales (106) additionné à la compression des vaisseaux par l'hypertrophie. Le flot coronarien est diminué dans un modèle canin de surcharge de pression et six mois après la levée de la surcharge de pression, le flot coronarien est toujours anormal (107). Plusieurs études démontrent une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium des artères coronaires dans l'hypertension artérielle et dans l'HVG (1). La capacité vasodilatatrice peut être réduite jusqu'à 25% (108). Mais d'autres auteurs ont démontré que le flot coronarien était anormale de façon préférentielle au niveau du sousendocarde (3). Jusqu'à présent les mécanismes impliqués sont inconnus : aucune étude n'est disponible pour démontrer que la diminution de la vasodilatation de l'arbre coronarien dans l'HVG est due à une altération des récepteurs ou à des changements structuraux des artérioles (1). Ces observations peuvent s'expliquer par les réponses hétérogènes démontrées dans les artères épocardiques et dans la microcirculation coronarienne dans l'hypertension artérielle (109). La quasi totalité de l'endothélium au niveau de l'aorte est perdue (20-25%) (110) dans un modèle de rat suite à l'augmentation des forces de cisaillement et la régénération de l'endothélium ne survient que sept jours après la sténose permanente (111). L'endothélium régénéré ne possède pas les mêmes capacités vasodilatatrices que l'endothélium normal (112). Les patients hypertendus avec une hypertrophie ventriculaire gauche secondaire démontrent un remodelage des artères coronaires et une diminution de la réserve coronarienne dépendante et indépendante de l'endothélium (113). Dans un modèle d'hypertrophie ventriculaire gauche, la réserve coronarienne sous-endocardique est réduite : ceci peut être relié à des altérations de la voie de signalisation NO-

GMP cyclique (114). La stimulation de la voie NO-GMP cyclique est diminuée dans un modèle *in vivo* d'HVG avec dysfonction systolique ventriculaire gauche chez le rat (115). De plus, ce modèle chronique de surcharge de pression n'est pas associé avec une diminution de l'expression de la eNOS au niveau du ventricule gauche, ni à une réduction du niveau de GMP cyclique (115). En revanche, une diminution du niveau de GMP cyclique a été démontré dans un modèle expérimental de surcharge de pression chez le rat (116). D'autres altérations comme celle de la eNOS peuvent être responsables de la diminution des capacités vasodilatatrices dans ce modèle. L'expression de l'enzyme est réduite dans les cardiomyocytes mais non au niveau des cellules endothéliales de la microcirculation coronarienne chez les rats spontanément hypertendus (SHR) (117). Dans un modèle de surcharge de pression chez le cochon d'Inde, la relaxation du ventricule gauche dépendante de l'endothélium est réduite, malgré une réponse préservée au NO exogène (7).

3.5 Insuffisance cardiaque

Une étude (118) a rapporté une diminution des relaxations induites par l'acétylcholine dans les artères fémorales isolées de chien après le développement d'insuffisance cardiaque induite par surstimulation ventriculaire. Cependant, ces altérations des vasodilatations dépendantes de l'endothélium dépendent du lit vasculaire étudié, de l'espèce, et du temps auquel elles sont étudiées après l'induction ou le diagnostic de l'insuffisance cardiaque (119). Considérant l'hétérogénéité des résultats entre les expériences animales *ex vivo*, et les études animales *in vivo* et chez l'humain, il n'y a pas de concordance parfaite. Les études animales portent plutôt sur les gros vaisseaux de conductance, tandis que les vaisseaux de résistance sont ciblés dans les études cliniques. De plus, l'impact sur les relaxations dépendantes de l'endothélium dépend également du mode

d'induction de l'insuffisance cardiaque congestive et du lit vasculaire étudié (120).

Chez le chien conscient avec insuffisance cardiaque induite par surstimulation ventriculaire (pacing), la dilatation des artères et de la microcirculation coronaires en réponse à l'acétylcholine est altérée. Ceci est associé avec une diminution significative de la production de nitrites (121). Chez les chiens avec insuffisance congestive, la réponse vasoconstrictrice au N^G-monométhyl-L-argine (un inhibiteur de la synthèse de monoxyde d'azote) est réduite (122). Dans les vaisseaux de résistance des chiens sous anesthésie avec insuffisance cardiaque induite par surstimulation ventriculaire, les réponses vasodilatatrices à l'acétylcholine et à l'adénosine diphosphate sont toutes deux diminuées, ce qui suggère que la diminution de la réactivité n'est pas limitée à l'activation des récepteurs muscariniques (122). Donc, chez le chien en insuffisance cardiaque congestive, une atténuation de la libération endothéliale de NO survient. Cependant, cette conclusion ne s'applique pas nécessairement aux autres modèles pathologiques animaux (119). Chez les patients avec insuffisance cardiaque congestive, les vasodilatations induites par l'acétylcholine, la métacholine et la sérotonine sont diminuées dans les vaisseaux de résistance suggérant une diminution de la libération de NO lorsque stimulé par les agonistes (123). La vasodilatation peut être normalisée par la L-arginine (124).

Les observations précédentes suggèrent fortement que la libération de NO par les artères épocardiques et de la microcirculation coronaires sont réduites dans l'insuffisance cardiaque. Dans les vaisseaux de conductance de ces patients, il existe une diminution à la fois des réponses dépendantes (augmentation du flot) et indépendantes (nitroglycérine) de l'endothélium ce qui suggère que la sensibilité du muscle lisse au NO est réduite. Donc, les altérations structurales de l'arbre vasculaire peuvent compliquer la dysfonction endothéliale. Puisqu'une correction de cette incapacité des

vaisseaux à se dilater survient suite au traitement à long terme avec des inhibiteurs d'enzyme de conversion chez des patients avec une insuffisance cardiaque légère à modérée (125), l'effet sur l'endothélium semble être une conséquence plutôt qu'une cause de cette pathologie puisque l'altération de la fonction endothéliale est réversible.

Une diminution de la libération de NO dans l'insuffisance cardiaque congestive pourrait également expliquer une réduction de la compli-ance artérielle observée chez ces patients (126;127). Les mécanismes, la signification et l'impact étiologique de la dysfonction endothéliale dans l'insuffisance cardiaque ne sont pas clairs. Plusieurs maladies coexistent avec l'insuffisance cardiaque incluant la maladie coronarienne, l'hypertension et le diabète, et elles peuvent toutes entraîner une perturbation des relaxations dépendantes de l'endothélium.

En plus des atteintes des vasodilatations dépendantes de l'endothélium, l'augmentation des taux circulants d'endothéline-1 qui survient dans l'insuffisance cardiaque congestive pourrait avoir un rôle déterminant. En effet, les changements des niveaux plasmatiques d'endothéline-1 sont intimement liés à d'autres altérations des niveaux de neurohormones comme la vasopressine ou la norépinéphrine qui libèrent, *in vitro*, de l'endothéline (128). De ce fait, en fonction des maladies associées, les taux plasmatiques d'endothéline augmentent de 2 à 5 fois chez les patients en insuffisance cardiaque congestive (129).

Un EDCF dépendant de la cyclooxygénase (101) pourrait être aussi libéré dans l'insuffisance cardiaque. En effet, chez les chiens et les humains avec insuffisance cardiaque, la réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine est augmentée par l'inhibition de la cyclooxygénase par l'indométhacine (130). Le rétablissement de la réponse à l'acétylcholine par les inhibiteurs de

l'enzyme de conversion chez les patients avec insuffisance cardiaque congestive modérée est probablement liée à la cyclooxygénase (131;132).

La libération augmentée des vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium est probablement une conséquence plutôt qu'une cause de l'insuffisance cardiaque. La réduction des forces de cisaillement induite par la baisse du débit cardiaque dans l'insuffisance cardiaque pourrait entraîner une diminution chronique de la libération de NO (101). Les forces de cisaillement modulent non seulement la production de NO mais aussi celle d'endothéline-1 (101;133;134). Dans des conditions physiologiques, le NO serait continuellement libéré entraînant une diminution de la libération d'endothéline-1 (101;135). De ce fait, la modulation de la production de ces deux médiateurs endothéliaux observée dans l'insuffisance cardiaque pourrait être expliquée en partie par la réduction chronique du débit cardiaque.

3.6 Transplantation cardiaque.

De nombreux facteurs peuvent contribuer à léser l'endothélium au cours de la procédure de transplantation cardiaque. Des traumatismes mécaniques, la période de préservation et les solutions de préservation cardiaque ainsi que la séquence ischémie-reperfusion peuvent mener à une atteinte de l'endothélium (136-138). La perte de l'endothélium suivie de régénération endothéliale pourrait également contribuer à diminuer la capacité vasodilatatrice des artères coronaires (139;140). Les régimes immunosuppresseifs utilisés après la greffe et particulièrement la cyclosporine A, peuvent diminuer la libération des facteurs relaxants dérivés de l'endothélium des artères épicaudiques et de résistance (141). D'autres facteurs tels que l'hypercholestérolémie liée au traitement avec les corticostéroïdes, l'hypertension artérielle suivant le traitement chronique avec la cyclosporine ainsi que des infections à cytomégalovirus des cellules

endothéliales, impliqués dans l'athérogénèse, peuvent tous aggraver le problème.

La vasodilatation dépendante de l'endothélium à l'acétylcholine est altérée chez la majorité des patients 1 an après la greffe. Des études fonctionnelles utilisant l'injection intracoronarienne d'acétylcholine dès le 16^{ème} jour et à 5 semaines après l'implantation suggèrent que les dommages endothéliaux surviennent précocement après la greffe malgré l'absence de rejet à la biopsie myocardique (142;143). La dysfonction endothéliale des artères coronaires détectée à 2 semaines après l'implantation est prédictive du développement d'hyperplasie intimale 1 an après la greffe tel que diagnostiquée par l'échographie intravasculaire intracoronarienne (144). Les relaxations dépendantes de l'endothélium médiées par des récepteurs sont diminuées après la greffe tel que démontré par des études fonctionnelles chez des receveurs de greffon utilisant la substance P et l'acétylcholine (145). Une diminution des réponses à la substance P et une diminution de la dilatation dépendante du flot est retrouvée dans les coronaires épicaudiques des greffés présentant une athérosclérose accélérée du greffon comparées à ceux qui ont des coronaires saines à la coronarographie.

La perte de la capacité vasodilatatrice peut également être constatée au niveau de segments épicaudiques apparemment sans lésion vasculaire (146). Des études utilisant l'échographie intravasculaire ont également montré que les épaissements intimaux associés avec la maladie coronarienne du greffon induisent des changements proportionnels dans le flot sanguin myocardique, dans la vasomotricité coronaire et dans la réserve de flot myocardique (147;148). Kobashigawa et ses collaborateurs ont également démontré que la réponse coronarienne hyperhémique est altérée durant le rejet aigu et que cette anomalie peut être corrigée par le traitement immunosupresseur. Le degré de dilatation dépendante du flot est préservé dans les coronaires de composition quasi normale mais est atténué dans les

coronaires présentant un épaissement intimal (149). Un épaissement de plus de 0.3 mm est associé à une évolution défavorable et au développement d'athérosclérose accélérée du greffon cardiaque (150).

La fonction du muscle lisse vasculaire est préservée dans la plupart des cas puisque l'épaissement intimal ne diminue pas la réactivité des vaisseaux de conductance et de résistance à l'injection de vasodilatateurs indépendants de l'endothélium chez les patients avec cœurs normaux à l'angiographie (151). En effet, la plupart des études ont montré que les agents exerçant un effet direct sur le muscle lisse vasculaire comme le nitroprussiate de sodium et la nitroglycérine sont préservées après transplantation tandis que les réponses dépendantes de l'endothélium sont altérées. Quelques études ont cependant démontré des atteintes des réponses dépendantes et indépendantes de l'endothélium, la plupart du temps à des stades tardifs de l'évolution du rejet chronique.

Une dysfonction endothéliale a été documentée lors du rejet aigu au cours duquel des vasospasmes sévères se sont manifestés (152;153). Une altération spécifique des récepteurs muscariniques (M_2) situés sur l'endothélium vasculaire a également été identifiée dans ce type de dysfonction aiguë liée au rejet (154). Fait intéressant, certaines de ces altérations de la vasodilatation peuvent être corrigées avec le traitement du rejet ce qui suggère que l'endothélium peut récupérer sa capacité vasodilatatrice si l'insulte immunologique est enrayée à temps (155). Cette observation est concordante avec celle du groupe de Anderson qui a montré que des altérations de la fonction endothéliale vasodilatatrice présentes peu après la greffe peuvent récupérer même en présence de changements modérés au niveau de l'intima, ce qui suggère que l'état de la fonction endothéliale peut varier au gré de la nature épisodique de l'agression immunologique (156).

Chapitre 4

APPROCHE THÉRAPEUTIQUE DE LA DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE

4.1. L-arginine et BH₄

Les perturbations de la voie de la L-arginine-NO sont impliquées dans une multitude de pathologies cardiovasculaires via différents mécanismes comme une diminution de la biodisponibilité des cofacteurs nécessaire à la NO synthase endothéliale pour la formation de l'oxyde nitrique. Un traitement avec la L-arginine (157) ou la tétrahydrobioptérine (158) améliorent les relaxations dépendantes de l'endothélium suggérant une déficience du co-substrat de la eNOS ou un de ses cofacteurs. L'ajout du substrat du NO, la L-arginine a des effets bénéfiques tant chez les animaux que chez les humains (159). L'injection orale de L-arginine pendant 10 semaines prévient le développement de l'hyperplasie intimale au niveau des artères coronaires et atténue l'aggrégation plaquettaire à la surface endothéliale chez le lapin hypercholestérolémique (159). De plus, l'addition de L-arginine supplémentaire normalise les relaxations dépendantes de l'endothélium à l'acétylcholine dans la microcirculation coronarienne et l'aorte de lapins hypercholestérolémiques (160;161). Chez les patients hypercholestérolémiques, la L-arginine améliore les réponses à l'acétylcholine dans la microcirculation coronaire mais elle est sans effet dans les artères de fort calibre comme les artères coronaires épicaudiques (77). La différence de sensibilité à la L-arginine entre les vaisseaux de résistance et de conductance peut s'expliquer par l'hétérogénéité des récepteurs membranaires entre les différents lits vasculaires. Également, la contribution de l'EDHF aux relaxations dépendantes de l'endothélium varie selon les lits vasculaires et les artères de gros et petit calibre (55). Le NO est prédominant dans les artères coronaires épicaudiques alors que l'EDHF est dominant dans la microcirculation coronaire (55). Dans un modèle de sténose aortique supracoronaire chez le rat, un traitement à la L-arginine augmente la concentration de GMP cyclique cardiaque mais ne modifie pas la masse myocardique (115).

La reconnaissance de la tétrahydrobioptérine comme un cofacteur crucial pour l'activité de la eNOS offre une approche thérapeutique intéressante. Plusieurs études ont démontré qu'un supplément de BH₄ peut améliorer les relaxations dépendantes de l'endothélium chez des patients présentant de l'athérosclérose (162) et une maladie coronarienne (163). Dans l'hypercholestérolémie, l'altération des relaxations dépendantes de l'endothélium est améliorée par l'ajout supplémentaire de BH₄ suggérant que sa déficience joue un rôle dans cette pathologie (158). Ces données démontrent le potentiel d'une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement de la dysfonction endothéliale dans les maladies cardiovasculaires.

4.2. Les antioxydants

Le stress oxydatif étant impliqué dans la dysfonction endothéliale plusieurs études ont examiné le rôle des antioxydants sur la fonction endothéliale et dans la prévention des maladies cardiovasculaires. L'administration intraartérielle d'acide ascorbique (la vitamine C) améliore la relaxation dépendante de l'endothélium de l'artère brachiale chez les fumeurs, les patients avec hypercholestérolémie et les patients souffrants d'une défaillance cardiaque (159). De plus, une infusion intraveineuse de vitamine C augmente les relaxations dépendantes de l'endothélium dans les artères coronaires épicaudiques dans l'hypertension artérielle (164). L'utilisation conjointe de l'acide ascorbique et du BH₄ entraîne la stabilisation de la tétrahydrobioptérine au sein des cellules endothéliales et la production du NO (165). Un autre antioxydant, la superoxyde dismutase (SOD), augmente les relaxations dépendantes de l'endothélium dans diverses conditions pathologiques comme l'hypercholestérolémie, le diabète, l'hypertension et le tabagisme (166). L'utilisation de la vitamine E (α -tocophérol) peut à la fois améliorer la fonction vasomotrice, inhiber l'aggrégation des plaquettes,

prévenir le développement de l'athérosclérose et diminuer le risque d'incidence de maladies coronariennes (14).

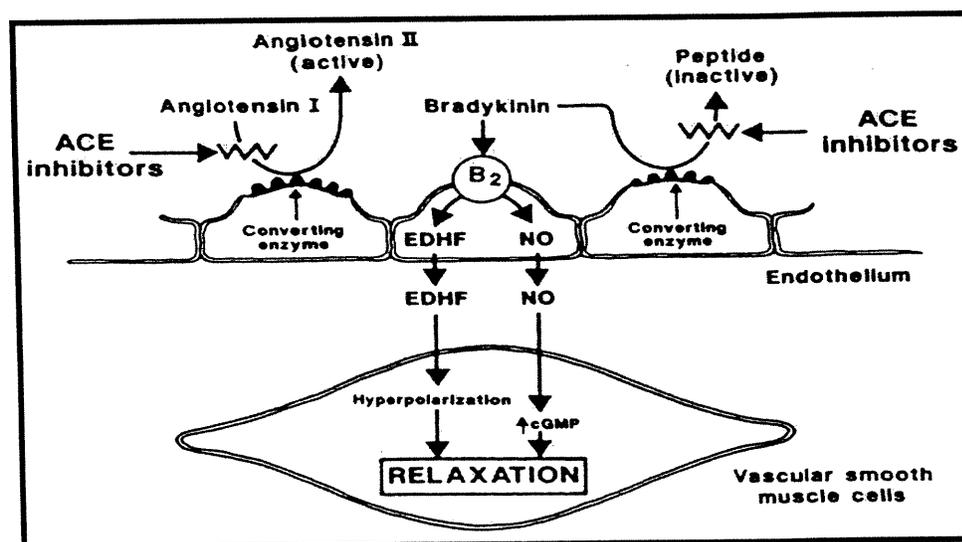
L'administration intrartérielle de N-acétylcystéine (NAC) améliore la vasodilatation dépendante de l'endothélium des artères coronaires et fémorales chez des patients athérosclérotiques (167). La N-acétylcystéine est un antioxydant. Il semble que le NAC exerce son rôle bénéfique par deux voies. La première proviendrait de son action directe neutralisatrice des radicaux libres et la seconde, en augmentant les stocks intracellulaires de glutathion. Alors que l'utilisation de la NAC par injection intraartérielle n'a aucun effet sur la vasodilatation au niveau de l'avant bras (168), l'addition de ce thiol reflète l'importance des effets néfastes des radicaux libres sur la fonction vasculaire. Cependant, des études complémentaires seront nécessaires afin d'élucider les effets bénéfiques des antioxydants sur la fonction endothéliale vu l'ensemble de ces résultats contradictoires.

4.3. Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et de l'endothéline

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) sont utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle et de la défaillance cardiaque (169). Un traitement avec un inhibiteur de l'ECA améliore les relaxations dépendantes de l'endothélium au niveau des artères coronaires épiscopales (170). De plus, l'inhibition de cette enzyme empêche également la production d'endothéline-1 par les cellules endothéliales via la voie de l'angiotensine II (171). L'inhibition de la dégradation de la bradykinine augmente également la production de monoxyde d'azote via les protéines G_q (Figure 3). Les inhibiteurs de l'ECA produisent en partie leur effet cardioprotecteur en augmentant la bradykinine (172) (Figure 3). Mombouli et al ont rapporté que l'utilisation des inhibiteurs de l'ECA augmentent de 10 fois la concentration de bradykinine menant à la libération

du NO et de l'EDHF dans les artères coronaires de chiens (173). Les inhibiteurs de l'ECA améliorent la relaxation dépendante de l'endothélium chez des rats génétiquement hypertendus (174). Wiemer et al ont rapporté une amélioration de la fonction endothéliale après 15 mois de traitement avec un antagoniste des récepteur AT_1 chez des rats génétiquement hypertendus (175). Cette étude démontre qu'une grande partie de l'effet cardioprotecteur des antagonistes AT_1 est médié par les récepteurs AT_2 , pouvant ainsi entraîner la libération de NO (172).

Figure 3



Les inhibiteurs de l'ECA entraînent une régression de l'hypertrophie ventriculaire gauche dans des modèles expérimentaux (176) et humains (177). Des études plus récentes ont démontré que les antagonistes de l'angiotensine II peuvent produire des effets similaires (172). Une étude analogue a également démontré une régression identique de l'HVG à la fois avec l'utilisation des antagonistes des récepteurs AT_1 et des inhibiteurs de l'ECA, chez le rat après 6 semaines de sténose de l'aorte ascendante (178). Ito et al ont récemment démontré que l'hypertrophie induite par l'angiotensine est partiellement bloquée par un antagoniste des récepteurs ET_A (40). Mais

le rôle exact de l'endothéline dans l'hypertrophie ventriculaire et dans l'hypertension artérielle est encore très nébuleux. Ces études démontrent que l'utilisation des inhibiteurs de l'ECA, les antagonistes des récepteurs AT_1 et les antagonistes des récepteurs ET_A sont des traitements prometteurs pour la régression de l'hypertrophie mais également dans l'amélioration de la fonction endothéliale.

Mais avant tout, il existe d'autres traitements de la dysfonction endothéliale qui visent la prévention et le traitement des facteurs de risque responsable des maladies cardiovasculaires. Par exemple, l'exercice physique améliore la fonction endothéliale en augmentant la sensibilité des artères coronaires aux effets dépendants de l'endothélium à la bradykinine (179). Le traitement de la dyslipidémie améliore les fonctions endothéliales systémique et coronariennes. Le traitement de l'hypertension artérielle par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion améliore la fonction endothéliale. Le tabagisme aigu ou chronique cause aussi une dysfonction endothéliale en augmentant le stress oxydatif. Donc, le traitement de la dysfonction endothéliale peut se faire en ciblant les facteurs de risque de la maladie vasculaire.

Contribution originale

Specific alterations of endothelial signal transduction pathways of porcine epicardial coronary arteries in left ventricular hypertrophy

Olivier Malo, *†Michel Carrier, *Yan Fen Shi, *‡Jean-Claude Tardif,
*‡Jean-Francois Tanguay, *†‡ Louis P. Perrault

**Research Center, †Department of Surgery; ‡Department of Medicine;
Department of Pharmacology, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec,
Canada*

Running Title: Endothelial Dysfunction in LVH

Address correspondence and reprint requests to Dr. L. P. Perrault,
Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street East,
Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330 (3471);
Fax: (514) 376-1355; E-mail lpperrau@icm.umontreal.

Abstract

Background – Left ventricular hypertrophy (LVH) is the morphological adaptive increase in myocardial mass in response to chronic pressure overload. LVH secondary to aortic stenosis and systemic hypertension is commonly encountered in cardiac surgical patients. The presence of a concomitant coronary endothelial dysfunction can reduce myocardial protection during surgery particularly in the subendocardium and result in an impairment of global LV function. The objective of this study was to characterize the specific alterations of endothelial signal transduction of epicardial coronary arteries in a porcine model of LVH by assessment of the NO and EDHF mediated pathways.

Methods – Aortic banding was performed through a left thoracotomy inducing a 15 mmHg gradient by tying an umbilical tape around the ascending aorta 3 cm above the coronary ostia. Development of LVH was documented by measuring LV function and mass by transthoracic echocardiography and hemodynamic studies were performed before the procedure and 24 hours, 1 and 2 months after aortic banding. Vascular reactivity studies of epicardial coronary arteries were performed in standard organ chamber experiments to assess the NO mediated and the EDHF mediated relaxations. The bioavailability of NO was assessed with an enzyme immunoassay and production of NO by measurement of plasmatic nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) levels by chemoluminescence.

Results – After 2 months of aortic banding, there was a significant increase in LV weight/body ratio ($P < 0.05$) confirming the development of LVH. There was a significant increase in LV diastolic and end-diastolic pressure and decrease in dP/dT ($P < 0.05$) with no significant difference in coronary pressures. After contraction to $PGF2\alpha$, there was a significant decrease in endothelium-dependent relaxations to serotonin (5-HT, an agonist which binds to 5HT_{1d} receptors coupled to Gi-proteins) and to bradykinin (BK, an agonist that binds to B₂ receptors coupled to Gq-proteins) ($P < 0.05$ for both). There was no significant difference in endothelium-dependent, receptor dependent relaxations to the calcium ionophore A23187 (NO pathway). There was no statistically significant decrease of relaxations in the presence of BK and $N\omega$ -L-arginine (L-NA) between groups (EDHF pathway). The cGMP content from coronary arteries after 60 days of aortic banding decreased significantly from 72.5 ± 13.6 to 35.3 ± 11.8 pmol/mg proteins ($P < 0.05$ vs control). The total plasmatic levels of NO_x decreased significantly from 1.8 ± 0.2 to 1.2 ± 0.1 % ($P < 0.05$ vs control) after 60 days of aortic banding.

Conclusion – In this porcine model of aortic banding, chronic pressure overload is associated with the development of significant left ventricular hypertrophy with an endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries. This dysfunction involves both Gi and Gq-protein mediated relaxations with preserved expression and capacity of eNOS but decreased nitric oxide bioavailability and plasmatic content while the

EDHF pathway is intact. These alterations may compromise myocardial perfusion in the perioperative period and are a prime targets for improving the results of cardiac surgery in patients with LVH.

Keys Words: Left ventricular hypertrophy - Nitric oxide - EDHF - Coronary

Introduction

Left ventricular hypertrophy (LVH) is the main structural adaptation of the heart in response to an increased afterload. Chronic pressure overload is a frequent clinical finding affecting 23% of men and 33% of women over the age of 59 years and is most commonly due to aortic stenosis or systemic arterial hypertension (1). Myocardial protection at the time of surgery may be compromised because of the increased myocardial demand in coronary blood flow to maintain ventricular function in the presence of greater myocardial mass, subendocardial perfusion deficiency and greater transmural gradient (2). Although outcomes have greatly improved due to advance in myocardial protection strategies, cardiac surgery and aortic valve procedures are still associated with substantial morbidity due to perioperative myocardial infarction and suboptimal myocardial protection translating into a 3 to 5% mortality rate for primary surgery (3). The presence of a coronary endothelial dysfunction in patients with LVH could compound the situation by further reducing perfusion during cardiac arrest and hamper myocardial recovery at the time of reperfusion which could lead to global impairment of the left ventricular function. This problematic has been documented in dogs with left ventricular hypertrophy (4) in which an enhanced postischemic myocardial dysfunction involving preferentially the subendocardium has been observed due to an impairment of coronary flow-myocardial function relationship (5).

Clinical and experimental studies have reported alterations of coronary endothelium-dependent vasodilatation induced by different agonists such as acetylcholine, adenosine, substance P in LVH (5-7). Endothelial dysfunction refers to impairment of the main properties of the endothelium including relaxation of smooth muscle cells (vasodilatation), anticoagulant and anti-inflammatory properties of the endothelium. Loss of endothelium-derived nitric oxide (NO) is one of the main alterations of vascular function (8) which impairs endothelium-dependent LV relaxation in a moderate pressure-overload LVH models despite a preserved response to exogenous nitric oxide (NO) (9). Although the presence of systemic and coronary endothelial dysfunction have been documented in systemic arterial hypertension and LVH, the precise alterations in the signal transduction of endothelial cells have not been described in a large animal model with LVH relevant to cardiac surgery. Characterization of these mechanisms and development of strategies for reversal or prevention of this coronary endothelial dysfunction are key issues, considering the morbidity related to the difficulty in myocardial protection in these patients. With these observations in mind, the objectives of the present study was to characterize the specific alterations of endothelial signal transduction of epicardial coronary arteries in a porcine model of LVH secondary to aortic banding by assessment of the NO and EDHF mediated pathways.

Materials and Methods

Animals

Thirty-one Landrace swine weighing 28.6 ± 1.8 kg of either sex were maintained and tested in accordance with recommendations of the guidelines on the care and use of laboratory animals issued by the Canadian Council on Animal Research and the guidelines of the Animal Care, and were approved by a local committee. Four groups were studied: the control group consisted of swine sacrificed by exsanguination without aortic banding; the sham group underwent left thoracotomy without aortic banding, one group had aortic banding for a duration of 24 hours and the fourth group had aortic banding for a duration of 60 days.

Surgical Procedure

Pigs were anesthetized with intramuscular injection mixture of ketamine (20 mg/kg; Rogarsetic, QC, Canada) and xylazine (2 mg/kg; Rompun, ON, Canada). Swines were artificially ventilated with an O₂/air mixture. Respiratory control was maintained by frequent determinations of arterial blood gases. Acidosis was balanced with 8.4% sodium bicarbonate (Abbott Laboratories, QC, Canada). Light anesthesia was supported by halotane 1% v/v (Halocarbon Laboratories, NJ, USA).

Hair was shaved in the operative field, the skin was surgically disinfected and intramuscular antibiotics (3 ml/45 kg; trivetrim, Shering-Plough, QC, Canada) were administered. A catheter was placed in an auricular vein for

intravenous infusion during the operation. A thoracotomy was performed in the third intercostal space on the left side. The ascending aorta and the pulmonary artery were carefully separated. An umbilical tape was placed 3 cm above the coronary ostia of the aorta, gently constricted to obtain a systolic gradient of 15 mm Hg (measured by monitoring of the systemic arterial pressure distally to the banding site) and then tied. The pericardium was left opened and the chest were closed in multiple layers.

Experimental Groups

Control group

Hearts from normal 4-month old swine (40 kg) not submitted to aortic surgery or to left thoracotomy, receiving the same tranquilizing agent for sacrifice, were excised through a median sternotomy (n=6).

Sham group

Hearts from swine submitted to left thoracotomy without aortic banding and sacrificed 2 months after surgery were excised through a median sternotomy (n=5).

24 hours aortic banding group

Hearts from swine submitted to aortic banding and sacrificed 24 hours after the surgery were excised through a median sternotomy. Two 24-hour

banding hearts were excluded because the coronary arteries failed to contract to potassium chloride or to prostaglandin F_{2α} (n=5).

60 Days aortic banding group

Hearts from swine submitted to aortic banding and sacrificed after 60 days of aortic banding were also excised through a median sternotomy. Six animals were excluded due to death from sepsis and infection (n=9).

Echocardiographic studies

Transthoracic echocardiography was performed before surgery and at 24 hours, 1 week, 1 and 2 months. Pigs were sedated with the same anesthesia (see above) for serial echocardiographic examinations. A 2.5 Megahertz phased-array transducer and a standard echocardiographic system (Sonos 1000 Hewlett-Packard, Andover, MA, USA) were used. A 2-D guided M-mode of the left ventricle and 2-dimensional apical 4-chamber and 2-chamber views were performed and recorded on videotape for off-line measurements.

The left ventricular end-diastolic and end-systolic diameters were measured on M-mode. The left ventricular fractional shortening (FS) was calculated as (end-diastolic diameter minus end-systolic diameter) / end-diastolic diameter X100. The thickness of the interventricular septum (IVS) and left ventricular posterior wall (LVPW) were measured on M-mode at end-diastole during a single cardiac cycle. Left ventricular mass was calculated using the following formula: LV mass = 1.05 [(D+LVPW+IVS)³ - D³]-14 g, where D represents left ventricular end-diastolic diameter. Left

ventricular end-diastolic and end-systolic volumes were calculated using the Simpson method. The ejection fraction was calculated as (end-diastolic volume minus end-systolic volume) / end-diastolic volume X100.

Baseline measurements of the ascending aorta diameter were obtained 1 cm above the aortic valve. After aortic banding, aortic diameters were measured between the aortic valve and the banding point, and 1 cm above the banding point.

Hemodynamics studies

Hemodynamic measurements of the left ventricle were performed by insertion of a 6 or 7-Fr pigtail catheter in the femoral artery, after which a guiding catheter was advanced into the ascending aorta and placed in each coronary ostium to measure intracoronary pressures. The guiding catheter was then advanced in the left ventricle across the aortic valve to measure left intraventricular pressures. All studies were performed at baseline and 1 and 2 months after surgery.

Sacrifice and Coronary Harvesting

After 24 h or 60 days of aortic banding, the swine were anesthetized using the same approach as for the aortic banding. Sacrifice was performed by exsanguination and the thorax reopened to explant the heart, which was rapidly weighed to determine the total weight of the heart used in the heart weight and body weight ratio and placed in a Krebs-bicarbonate solution for harvesting of coronary arteries. The epicardial coronary arteries were

dissected free from the adventitial tissue and divided into rings (4 mm wide; 16 rings per animal). Rings from the left anterior descending, left circumflex and right coronary arteries were used randomly.

Organ Chamber Experiments

The endothelial function of rings from controls and from swine submitted to aortic banding was studied in organ chambers as previously described in our laboratory (10). Each preparation was stretched to the optimal point of its active length-tension curve (usually 3.5 g), as determined by measuring the contraction to potassium chloride (30 mM) at different levels of stretch and was then allowed to stabilize for 90 min. A maximal contraction was determined with potassium chloride (60 mM) and the baths were then washed. Rings were excluded if they failed to contract to potassium chloride (exclusion rate of less than 5%). All studies were performed in the presence of indomethacin (10^{-5} mol/L, to exclude the production of endogenous prostanoids), propranolol (10^{-7} mol/L, to prevent the activation of β -adrenergic receptors) and ketanserin (10^{-6} mol/L, incubated 45 minutes before the addition of to block 5HT₂ receptors). After 45 minutes of stabilization, prostaglandin F_{2a} (range 2×10^{-6} to 3×10^{-5} mol/L) was added to achieve contraction averaging 50% of the maximal contraction to KCl (60 mM). Except for potassium chloride, no rings were exposed to more than one agonist in the course of the experiments.

NO pathway

The NO mediated-relaxation pathway was studied by constructing concentration-response curves to serotonin (5-HT, 10^{-10} to 10^{-5} mol/L, an agonist binding to 5-HT_{1D} receptors coupled to Gi-proteins), and bradykinin (BK, 10^{-12} to 10^{-6} mol/L, an agonist binding to B₂ receptors coupled to Gq-proteins leading to the release of NO and EDHF). Endothelium-dependent, receptor independent, mediated relaxations were studied with the calcium ionophore A23187 (10^{-9} to 10^{-6} mol/L).

EDHF pathway

The EDHF-mediated relaxations were studied by constructing concentration-response curves to bradykinin (10^{-12} to 10^{-6} mol/L) in the presence and absence of N ω -L-Arginine (L-Na, 10^{-4} M, a non reversible NO synthase inhibitor) incubated for 45 minutes before application of BK.

Endothelium-independent relaxations

Endothelium-independent relaxations were studied by constructing concentration-response curves to sodium nitroprusside (SNP, 10^{-10} to 10^{-5} M, an exogenous NO donor).

Coronary artery Cyclic GMP content.

Basal levels of cGMP content of epicardial coronary arteries in control and swine submitted to aortic banding were measured. Segments were frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until the measurement of cGMP levels.

The samples were subsequently pulverized and resuspended in trichloroacetic solution (TCA; 6.25% w/v) to precipitate tissue proteins. After centrifugation, the supernatant was washed with diethylether to preserve cGMP and eliminate TCA. Finally, the samples were heat dried with nitrogen to obtain purified cGMP. cGMP levels were measured using an enzyme immunoassay (EIA) system with acetylation based on rabbit anti-cGMP antibody (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada). The levels were adjusted to the quantity of proteins measured in the tissue using the Bradford microassay technique (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada).

Measurement of total plasmatic Nitrite and Nitrate levels (NO_x)

NO production was assessed from NO_x levels present in plasma samples of aortic banding and control groups. Blood samples were drawn from swine aorta in EDTA to prevent coagulation and subsequently centrifuged. The isolated plasma was then frozen and kept at -70°C until analysis. NO₂⁻ was reduced to NO using iodide and acetic acid while NO₃⁻ and NO₂⁻ was reduced using vanadium (III) and hydrochloric acid. A Serviers 280 NO analyser (Serviers instruments Inc., Boulder, Colorado), combined with the NO analysis™-liquid program, was used to obtain the nitrite and nitrate concentrations in the different samples.

Silver Nitrate studies of endothelial coverage.

Silver nitrate staining of segments of epicardial coronary arteries after 24 hours and 60 days of aortic banding was performed to assess the endothelial coverage. The rings were first fixed for 10 minutes in a paraformaldehyde buffer (4%). They were then washed for 1 minute in a HEPES sucrose buffer solution. Silver nitrate 0.25% was applied for 1 minute. Washing was performed for 1 minute before a second fixation for 2 minutes. The rings were exposed to ultraviolet light for 2 to 4 hours in a cacodylate buffer solution. Preparations were read by a blinded investigator and representative photomicrographs were taken.

Endothelial (eNOS) nitric oxide synthase expression.

In brief, after fixation in Tissuetek and preserved at -70°C with a subsequent fixation in formaldehyde 1%, a bovine antibody specific for eNOS is used for the ABC technique (Avidin-Biotin-Complex immunoperoxidase method) with nickel enhancement and the expression of eNOS is compared in control and treated coronary arteries by an independent evaluator.

Drugs

All solutions were prepared daily. Bradykinin, 5-hydroxytryptamine creatinine sulfate (serotonin), calcium ionophore A23187, indomethacin, ketanserin, N ω -L-arginine, L-arginine and sodium nitroprusside were purchased from

Sigma Chemical Co. (ON, Canada). Propranolol was purchased from Biomol Research Laboratories Inc. (Plymouth Meeting, PA, USA) and prostaglandin F_{2α} from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA).

Statistical Analysis

Relaxations and contractions are expressed as a percentage of the maximal contraction to prostaglandin F_{2α} for each group and expressed as mean ± standard error of the mean (SEM); n refers to the number of animals studied. ANOVA studies were performed to compare concentration-response curves. The Newman-Keuls test was used as the *post-hoc* test. Student's *t*-test for paired/unpaired observations was used for the comparison of the plasmatic NO_x concentration and the basal production of GMP_c. Differences were considered to be statistically significant when the value of *P* was <0.05.

Results

Morphological data, echocardiographic measurements and hemodynamic studies.

Morphological, echocardiographic and hemodynamic data are presented in Table 1, 2 and 3. There was a statistically significant 36% increase of the heart/body weight ratio after 60 days of aortic banding compared with the control group (*P*<0.05). There was a statistically significant 21% increase in the left ventricle/body weight ratio after 60 days of aortic banding compared with the control group (*P*<0.05). There was a statistically significant increase

in left ventricular mass after 60 days of aortic banding compared with the control group ($P<0.05$).

There was a statistically significant reduction of left ventricular diameters and volumes after 60 days of aortic banding. There were no statistically significant changes in left ventricular ejection fraction between groups. There was a statistically significant increase in left ventricular diastolic and end-diastolic pressures 2 months after aortic banding ($P<0.05$) compared with the control group. There was a statistically significant decrease of the dP/dT ($P<0.05$). There were no statistically significant changes in coronary pressures measured after 60 days of aortic banding.

Vascular Reactivity in Hypertrophied Hearts

Contraction

There were no significant differences in the amplitude of the contraction to potassium chloride (60 mM) between the 4 groups. There were no significant differences in the amplitude of the contractions to prostaglandin $F_{2\alpha}$ between all groups. There were no statistically significant differences in the concentration of prostaglandin $F_{2\alpha}$ needed to achieve the target level of contraction in coronary rings from swine submitted to aortic banding compared to the control and sham groups (Table 4).

Endothelium-Dependent Relaxations

NO mediated-relaxation pathway.

There was a statistically significant decrease in endothelium-dependent relaxations to 5-HT in rings from the 2 months aortic banding group compared with the control, sham and 24-hour banding groups (Figure 1a). There was a statistically significant decrease in endothelium-dependent relaxations to bradykinin in rings from the 2-month aortic banding group compared with all groups ($P < 0.05$) (Figure 1b). There were no statistically significant differences in endothelium-dependent relaxations to the calcium ionophore A23187 between coronary rings from all groups (Figure 1c).

Endothelium-dependent EDHF mediated pathway:

There were no statistically significant differences in the endothelium-dependent relaxations attributed to the EDHF in presence of BK and L-NA as measured by the comparison of the delta between the relaxation to BK alone and that to BK in the presence of L-NA between the 2 month banding group versus the control group (Figure 2a, Figure 2b).

Endothelium-Independent Relaxations

There were no statistically significant differences in endothelium-independent relaxations to the NO donor SNP in coronary rings 60 days after aortic banding with and without endothelium compared with the control group (Figure 3).

cGMP content of coronary arteries and plasmatic nitrite and nitrates.

There was a statistically significant decrease of cyclic GMP content in coronary arteries after 60 days of aortic banding from 72.5 ± 13.6 to 35.6 ± 11.8 pmol/mg proteins ($P < 0.05$ versus control). There was a statistically significant decrease of plasmatic nitrite and nitrates levels after 60 days of aortic banding compared to controls (Figure 4).

Silver Nitrate Staining

Silver nitrate staining of the endothelium showed no evidence of endothelial cell denudation with preservation of the normal cobblestone pattern of the endothelium in coronary artery rings after two months of aortic banding (Figure 5).

eNOS expression

eNOS immunohistochemistry showed no evidence of the decreased expression of the protein compared to control coronary artery rings after 60 days of aortic banding (Figure 6).

Discussion

The major findings of the present study are that 1) in this porcine model of aortic banding, chronic pressure overload is associated with the development of significant left ventricular hypertrophy with an endothelial dysfunction of

epicardial coronary arteries. 2) This dysfunction involves both Gi and Gq-protein mediated relaxations with preserved expression and capacity of eNOS to release NO but decreased nitric oxide bioavailability and plasmatic content of nitrite and nitrate. 3) The EDHF pathway and the endothelial coverage of the coronary arteries are intact.

Echocardiographic and Hemodynamic studies

The development of left ventricular hypertrophy by 60 days of aortic banding was documented by echocardiography as shown by the significant increase in the thickness of the interventricular septum and the left ventricular posterior wall. These findings are confirmed by the morphological measurements which showed a significant increase in the LV mass after 2 months of pressure overload and the significant increase in LV to body mass indicating a significant LVH. Cardiac hypertrophy is the normal adaptive response to pressure overload which normalizes wall stress by increasing muscle mass to maintain pump function (1;11;12). With the development of LVH induced by pressure overload after 60 days of aortic banding, there is a significant increase of LV diastolic and end-diastolic pressure and decrease in dP/dT similar to the echocardiographic features described in clinical series of patients with LVH (11;13;14).

NO is known to have an antihypertrophic effect on the myocardium and on vascular smooth muscle cells (9), raising the possibility that impaired NO activity in this model, as suggested by the significant decreases in NO

bioavailability and production, may promote the progression of LVH. Paracrine release of NO from coronary microvascular endothelial cells enhances myocardial relaxation and diastolic left ventricular function (15;16). This phenomenon has been described by McCarthy et al who showed a direct impact of coronary endothelial dysfunction on LV contractile function in a guinea pig model (9). In human with severe pressure-overload hypertrophy, intracoronary injection of the exogenous NO donor SNP improve diastolic function by reducing LV end-diastolic pressure (16). The marked decreased release of NO by epicardial coronary arteries after 60 days of aortic banding could contribute to the impairment of global left ventricular diastolic function observed in this study.

Although LVH is the initial compensatory mechanism, it is ultimately followed by a progressive decline in LV function and cardiac failure (5). In this early stage of compensated LVH, the cardiac work remains normal as seen by the ejection fraction is around 57% compared to 35% for patients with heart failure (14). In this LVH model, there was no increase in LV systolic pressure but a decreased dP/dT suggesting the reduction of the contractile state of the LV. This experimental swine model of pressure-overload LVH results in a compensated LVH after 60 days of aortic banding with a significant decrease of LV diastolic function and preservation of systolic function. The reduction in NO activity may be responsible for the later stages of LVH and development of cardiac failure (5). The lack of significant changes in coronary pressures in the presence of this experimental supravalvular aortic banding rules out the

effect of pathological changes in shear stress, flow pattern as well as low cardiac output as the cause of the epicardial coronary dysfunction and decreased endothelium-dependent relaxations.

Contractions.

Endothelium-dependent and independent contractions to KCl and PGF_{2α} were not significantly different in amplitude after 60 days of aortic constriction. No significant difference was observed in the dosage of PGF_{2α} needed for achieving a contraction averaging 50% of the maximal contraction to potassium chloride. This confirms the integrity of the contractile function of vascular smooth muscle cells of epicardial coronary arteries and the lack of increased sensitivity to these contractile agents in the pathological situation studied. Endothelial dysfunction, manifested by an impairment of endothelium-dependent relaxations, is due to either reduced release (or activity) of endothelial-dependent relaxation factors, and/or a greater propensity to evoke endothelium-dependent contractions (17). Currently, the endothelium-dependent contraction factors (EDCF) that have been identified include superoxide anions, endoperoxides, thromboxane A₂ and endothelin-1 (ET-1) (18). Thus, EDCFs released by endothelial cells may interact chemically with NO reducing endothelium-dependent relaxations (17). The exact role of EDCFs in this model of pressure-overload LVH remains to be studied.

Endothelium-dependent relaxations

Altered endothelium-dependent vasodilatation has been described in the coronary arteries of patients with hypertension and LVH which could account for the reduction in coronary reserve seen in LVH (1;5;7;12;19-21). This reduction in coronary flow reserve renders the hypertrophied heart more vulnerable to ischaemia (1;4;5;22-24). This experimental model of LVH induced by pressure overload is associated with significant decreases in endothelium-dependent relaxations suggesting the presence of an endothelial dysfunction. The alterations in the endothelial cells signaling pathways preferentially involves the Gi-protein-mediated relaxations as seen by the rightward shift in the concentration-response curves to 5-HT, an agonist that bind to 5HT1d receptors on the surface of endothelial cells which are coupled to Gi-proteins. This impairment of Gi-protein mediated relaxations is similar to the blunted endothelial dependent relaxations to acetylcholine in hypertensive patients and in other vascular diseases such as diabetes, ischemia-reperfusion, hypercholesterolemia and heart transplantation (17). The endothelium-dependent relaxations to BK, which causes endothelium-dependent relaxations by binding to B2 receptors coupled to Gq-proteins, were moderately reduced in this model of LVH, as shown by the rightward shift in the concentration-response curves to bradykinin but preserved maximal relaxations. Endothelium-dependent, receptor independent mediated relaxations to the calcium ionophore A23187, which represent the global capacity for eNOS to release NO, is not affected by LVH as demonstrated by the lack of significant

differences with controls. Taken together these observations suggest that, early during the development of LVH due to aortic banding, the coronary endothelial dysfunction is selective for G-protein mediated relaxations and is not due to a decreased capacity of endothelial cells to release NO.

The creation of an aortic stenosis in other models is known to cause acute erosion and loss of endothelial cells at the banding site which could lead to decreases of endothelium-dependent relaxations if the area of denudation is of sufficient magnitude (25). Since regenerated endothelium does not have the same capacity for vasorelaxation as the normal endothelium (26). The present study demonstrates that the coronary endothelial dysfunction which develops with LVH is not due to destruction or loss of coronary endothelial cells as shown by the preserved endothelium-dependent relaxations 24 hours after aortic banding and histological examination by silver nitrate staining of the endothelial surface of coronary arteries after 60 days of aortic banding which confirmed the preservation of the normal pattern of endothelial coverage. This suggests that the early coronary endothelial dysfunction is a functional abnormality of the signal transduction pathway and not the consequence of a denudation-regeneration cycle following banding of the ascending aorta.

EDHF is a diffusible factor different from NO which causes endothelium-dependent relaxations by hyperpolarization of smooth muscle cells mediated by an increase movement of K^+ ions through ATP dependent K^+ channels (27). The exact physiological role of EDHF remains unknown but the EDHF

system, which might become upregulated under conditions of impairment of the NO/cGMP pathway and may serve as a backup mechanism to maintain endothelium-dependent vasodilator function under conditions of impaired NO release (28). In this endothelial dysfunction involving alterations of both Gi and Gq-protein mediated relaxations leading to the release of NO (5HT) and No and EDHF (BK), the EDHF pathway was studied by constructing concentration-response curves to bradykinin in the presence or absence of N ω -L-arginine (a non reversible NO synthase inhibitor). The comparison of the concentration-response curves suggest that the relaxation attributable to the action of the EDHF is not affected at the time-point studied in this model of pressure overload LVH.

Endothelium-independent relaxations

In this present study, no significant differences in endothelium-independent relaxations to the exogenous NO donor SNP were observed which rules out an alteration of smooth muscle cells as the cause for the endothelial dysfunction. The decreased endothelium-dependent relaxations in the coronary artery rings observed in this model are not due to a decreased sensitivity of the vascular smooth muscle cells to nitric oxide donor but to functional alterations of the signaling mechanism of the endothelial cells per se.

Other abnormalities of the L-arginine-nitric-oxide-GMPc pathway axis could also play an important role in the pathogenesis of the coronary endothelial

dysfunction and development of cardiac hypertrophy in LVH (29). Potential mechanisms include a decreased synthesis of NO, a decreased availability of cofactors (L-arginine, R-5, 6, 7, 8-tetrahydrobiopterine), reduced expression or activity of eNOS, increased presence of endogenous eNOS inhibitors, impairment of agonist-induced NO release at the level of the receptors due to a functional uncoupling of G-proteins or their downregulation, and/or an increased NO inactivation which could decrease NO bioavailability and decreased vascular smooth muscle cells sensitivity to NO (9).

A decreased bioavailability of L-arginine appears improbable, since endothelial cells contain more than one thousand fold the concentration (concentration mM) of this substrate compared with the concentration necessary for the optimal activity of the eNOS (concentration μM). In a rat model of aortic stenosis, L-arginine treatment increased cardiac levels of cyclic GMP, but did not modify mass (30). Administration of L-arginine can restore normal dilator response to acetylcholine in chronic hypertension (31).

Conflicting data have been reported on the reduced expression of eNOS or activity in LVH. Increases, decreases and unaltered expression eNOS in LVH have been published (5). In this model of pressure-overload LVH, eNOS expression was normal 60 days after aortic banding as shown by immunochemistry studies. The preserved function of eNOS is supported by the normal responses evoked by the calcium ionophore A23187, which attests to the global capacity of the endothelial cells to produce NO. The coronary endothelial dysfunction is associated with a reduced content of

basal cyclic GMP in coronary arteries after 60 days of aortic banding which confirms a decreased bioavailability of NO which may be due to an increased oxidative stress with destruction of NO released by endothelial cells.

Oxidative stress may cause a functional uncoupling of the receptor-G protein complex leading to impairment of the normal signal transduction within endothelial cells (32).

The decrease in subendocardial coronary reserve observed in patients with left ventricular hypertrophy could be related to alterations of the NO-cyclic GMP signaling pathway (33). However, LV endothelial NO synthase expression and cyclic GMP levels were maintained in a chronic LVH in dogs due to mechanical systolic pressure overload (30). The cofactor of endothelial NO synthase tetrahydrobiopterin (BH₄) plays a major role in the liaison of L-arginine with the enzyme eNOS (34) and a reduction of BH₄ bioavailability has been incriminated in the pathogenesis of multiple cardiovascular diseases (35). Supplementation of BH₄ and use of antioxidants as well as stimulation of nitric oxide release in the perioperative period could be viable pharmacological options in the treatment of the endothelial dysfunction associated with cardiovascular pathologies.

Limitations

The short-time frame covered in this study is convenient for assessment of alteration of the signaling pathway of endothelial cell but covers only the situation of compensated LVH. Longer term experiments are needed to

characterize the time course and progression of the coronary endothelial dysfunction observed in the present study with an increasing duration of stenosis which could lead to congestive heart failure. Using microswine for long term studies would be necessary since the rapid increase in weight of the domestic swine is prohibitive for the logistics of this model. Use of mature animals would also enable to perform the studies in an adult habitus, more relevant to adult cardiac surgery. Another drawback of this model concerns the use of an experimental supracoronary aortic banding, which exposes the coronary arteries to different flow patterns than systemic hypertension or valvular aortic stenosis. There was however no evidence of acute endothelial dysfunction due to modification of coronary artery perfusion pressures secondary to supraaortic stenosis. Increasing perivascular fibrosis additive to vessels compression by the hypertrophy could further compromise the vasodilatory capacity of epicardial coronary arteries. Although intimal hyperplasia has been described in epicardial coronary arteries in congenital supraaortic stenosis, there was no macroscopic or histomorphometric evidence of intimal or medial pathology within the time course of this model (data not shown). Finally, although the microcirculation is the principal site of autoregulation of the coronary blood flow and deserves further study, we chose to examine the presence of endothelial dysfunction in epicardial coronary arteries first based on reports that have shown, in a canine model of aortic banding similar to the present one, the preferential involvement of conduit arteries over that of microvessels (36).

Conclusion

Understanding the mechanisms of the endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries which may affect coronary blood flow and myocardial recovery during the perioperative period in patients with LVH requiring cardiac surgery is of paramount importance. Early after the development of left ventricular hypertrophy, there is an impairment of endothelium-dependent G-protein mediated relaxations of epicardial coronary arteries with decreased bioavailability of NO while the EDHF pathway is unaltered. Decreased endothelial NO may have a direct impact on left ventricular relaxation. Treatment of the alterations of endothelial function in left ventricular hypertrophy is a valuable strategy to improve surgical results.

Acknowledgments

Dr. Louis P. Perrault and Dr. Jean-Claude Tardif are scholars from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec" (FRSQ). We wish to thank Pascale Geoffroy, Julie Lebel and Robert Clément for their technical assistance.

Reference

- (1) Kingsbury MP, Turner MA, Flores NA, Bovill E, Sheridan DJ. Endogenous and exogenous coronary vasodilation are attenuated in cardiac hypertrophy : a morphological defect ? *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32:527-538.
- (2) Ishihara K, Zile MR, Tomita M, et al. Left ventricular hypertrophy in a canine model of reversible pressure overload. *Cardiovasc Res* 1992; 26:580-585.
- (3) Hokken RB, Steyerberg EW, Verbann N, al. Twenty-five years of aortic valve replacement using mechanical valves. *Eur Heart J* 1997; 18:1157-1165.
- (4) Hasebe N, Shen Y, Kiuchi K, Hittinger L, Bishop SP, Vatner SF. Enhanced postischemic dysfunction selective to subendocardium in conscious dogs with LV hypertrophy. *Am J Physiol* 1994; 266:H702-H713.
- (5) Grieve DJ, MacCarthy PA, Gall NP, Cave AC, Shah AM. Divergent biological actions of coronary endothelial nitric oxide during progression of cardiac hypertrophy. *Hypertension* 2001; 38:267-273.
- (6) Luscher TF, Noll G. Endothelial dysfunction in the coronary circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24(Suppl. 3):S16-S26.
- (7) Treasure CB, Klein JL, Vita JA, et al. Hypertension and left ventricular hypertrophy are associated with impaired endothelium-mediated relaxation in human coronary resistance vessels. *Circulation* 1993; 87:86-93.
- (8) Kojda G, Harrison DG. Interactions between NO and reactive oxygen species : pathophysiological importance in atherosclerosis,

hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999; 43:562-571.

- (9) MacCarthy PA, Shah AM. Impaired endothelium-dependent regulation of ventricular relaxation in pressure-overload cardiac hypertrophy. *Circulation* 2000; 101:1854-1860.
- (10) Perrault LP, Bidouard JP, Janiak P, Villeneuve N, Bruneval P, Vilaine JP, Vanhoutte PM. Impairment of G-protein-mediated signal transduction in the porcine coronary endothelium during rejection after heart transplantation. *Cardiovasc Res* 1999; 43:457-470.
- (11) Kahan T. The importance of left ventricular hypertrophy in human hypertension. *J Hypertens* 1998; 16(Suppl. 7):S23-S29.
- (12) Ishihara K, Zile MR, Nagatsu M, et al. Coronary blood flow after the regression of pressure-overload left ventricular hypertrophy. *Circ Res* 1992; 71:1472-1481.
- (13) Aeschbacher BC, Hutter D, Fuhrer J, et al. Diastolic dysfunction precedes myocardial hypertrophy in the development of hypertension. *Am J Hypertens* 2001; 14(2):106-113.
- (14) Ikonomidis I, Tsouka A, Pathernakis F, et al. Four years follow up of aortic valve replacement for isolated aortic stenosis: a link between reduction in pressure overload, regression of left ventricular hypertrophy, and diastolic function. *Heart* 2001; 86:309-316.
- (15) Shah AM. Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells. *Cardiovasc Res* 1996; 31:847-867.
- (16) Matter CM, Mandinov L, Kaufmann PA, et al. Effect of NO donor on LV diastolic function in patients with severe pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 1999; 99:2396-2401.

- (17) Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res* 1995; 18:87-98.
- (18) Vanhoutte PM, Rubanyi G, Miller V, Houston D. Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann Rev Physiol* 1986; 48:307-320.
- (19) Crabos M, Coste P, Paccalin M, Tariosse L, Daret D, Besse P, Bonoron-Adele S. Reduced basal NO-mediated dilation and decreased endothelial NO-synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 19:55-65.
- (20) Marcus ML, Gascho JA, Mueller TM, et al. The effects of ventricular hypertrophy on the coronary circulation. *Basic Res Cardiol* 1981; 76:575-581.
- (21) Quyyumi AA, Mulcany D, Andrews NP, et al. Coronary vascular nitric oxide activity in hypertension and hypercholesterolemia. *Circulation* 1997; 95:104-110.
- (22) Wambolt RB, Grist M, Bondy GP, et al. Accelerated glycolysis and greater postischemic dysfunction in hypertrophied rat hearts are independent of coronary flow. *Can J Cardiol* 2001; 17(8):889-894.
- (23) McAinsh AM, Turner MA, O'hara D, et al. Cardiac hypertrophy impairs recovery from ischaemia because there is a reduced hyperaemic response. *Cardiovasc Res* 1995; 30:113-121.
- (24) Hittinger L, Patrick T, Ihara T, Hasebe N, et al. Exercise induces cardiac dysfunction in both moderate, compensated and severe hypertrophy. *Circulation* 1994; 89:2219-2231.

- (25) Houghton J, Davison C, Kuhner P, et al. Heterogenous vasomotor responses of coronary conduit and resistance vessels in hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:374-382.
- (26) Setoguchi S, Mohri M, Shimokawa H, Takeshita A. Tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in coronary microcirculation in patients without epicardial coronary artery. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38(2):493-498.
- (27) Komori K, Vanhoutte PM. G-proteins and endothelial responses. *Blood Vessels* 1990; 27:238-245.
- (28) Najibi S, Cowan CL, Palacino JJ, et al. Enhanced role of potassium channels in relaxations to acetylcholine in hypercholesterolemic rabbit carotid arteries. *Am J Physiol* 1994; 226:H2061-H2067.
- (29) Guo X, Kedem J, Weiss H, et al. Effect of cyclic GMP reduction on regional myocardial mechanics and metabolism in experimental left ventricular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27:392-400.
- (30) Bishop SP, Powell P, Hasebe N, et al. Coronary vascular morphology in pressure-overload left ventricular hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:141-154.
- (31) Kitazono T, Faraci FM, Heistad DD. L-arginine restores dilator responses of the basilar artery to acetylcholine during chronic hypertension. *Hypertension* 1996; 27(4):893-896.
- (32) Flavahan NA, Vanhoutte PM. Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction. *Am J Hypertens* 1995; 8:28S-41S.
- (33) Perticone F, Maio R, Ceravolo R, et al. Relationship between left ventricular mass and endothelium-dependent vasodilatation in never-treated hypertensive patients. *Circulation* 1999; 99:1991-1996.

- (34) Mayer B, Werner ER. In search of a function for tetrahydrobiopterin in the biosynthesis of nitric oxide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995; 351:453-463.
- (35) Consentino F, Luscher TF. Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res* 1999; 43:274-278.
- (36) Douglas PS, Katz SE, Weinberg EO, Chen MH, Bishop SP, Lorell BH. Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32(4):1118-1125.

Figure Legends

Figure 1. Cumulative concentration-response curves to serotonin (5-HT); a) bradykinin (BK); b) and to the calcium ionophore A23187; c) in rings of porcine coronary arteries after 24 hours and 2 months of aortic banding: control (●), sham (▲), 24 hours aortic banding (◆) and 2 months aortic banding (□). Responses are given as the percent of relaxation to the contraction induced by prostaglandin F_{2α}. Results are presented as the means ± SEM. The symbols indicate statistically significant differences between the groups for the indicated concentration: * $P < 0.05$, ** $P < 0.05$, + $P < 0.05$, ++ $P < 0.05$.

Figure 2. Cumulative concentration-response curves to bradykinin (BK); a) alone (●) and bradykinin plus N^ω-L-Arginine (L-Na) (■) in control rings of porcine coronary arteries; b) alone (●) and bradykinin plus N^ω-L-Arginine (L-Na) (■) in rings of porcine coronary arteries after 2 months of aortic banding. Response are given as the percent of relaxation to the contraction induce by prostaglandin F_{2α}. Results are presented as the means ± SEM. The asterisks indicate statistically significant differences between the comparison of the delta between the BK alone and BK plus L-NA for the indicated concentration: * $P < 0.05$.

Figure 3. Cumulative concentration-response curves to sodium nitroprussiate (SNP) in rings of porcine coronary arteries with (◆) and without (■) endothelium 2 months after aortic banding. Responses are given as the percent of relaxation to the contraction induced by prostaglandin F_{2α}. Results are presented as the means ± SEM. The asterisks indicate statistically significant differences between the 2 groups for the indicated concentration: * $P < 0.05$.

Figure 4. Total plasmatic nitrite and nitrate ratio after 2 months of aortic banding. . Results are presented as the mean ± SEM. The asterisk indicate statistically significant differences between the 2 groups: * $P < 0.05$.

Figure 5. Representative photomicrograph of silver nitrate staining of epicardial coronary arteries 60 days after aortic banding (magnification X400). The endothelial cells are present 2 months after pressure overload with preservation of cobblestone pattern.

Figure 6. Representative photomicrograph of eNOS expression in coronary endothelial cells after 2 months of pressure overload hypertrophy (magnification X250). eNOS is present 60 days after aortic banding.

Table 1. Morphological Data

	n	BW, kg	HW, g	LVW, g	LVW/BW g/kg	HW/BW g /kg
Control	6	35.8±1.8	167.1±10.6	119.6±6.8	3.35±0.21	4.68±0.22
Sham	5	36.1±1.2	177.0±11.7	122.0±8.1	3.39±0.28	4.93±0.27
2 months banding	9	31.3±1.8	194.0±12.3*	141.0±0.8 *	4.59±0.25 *	6.21±0.86*

Data is presented as mean ± SEM ; BW : body weight, HW : heart weight,
LVW : left ventricular weight. * P < 0.05 vs all group

Table 2. Echocardiographic Data

	Control	Sham	24 hours banding	2 months banding
LA FAS, cm ²	31.8 ± 1.1	34.1 ± 0.7	33.9 ± 1.7	28.5 ± 1.7
LA FS, %	22.3 ± 1.7	21.7 ± 0.4	22.3 ± 2.1	15.2 ± 1.3*
LV FS, %	39.8 ± 2.4	41.7 ± 2.2	45.3 ± 2.7	37.3 ± 2.5
LV EF, %	56.5 ± 2.0	57.5 ± 1.0	63.2 ± 0.4	58.8 ± 3.0
LV IVS, g	0.82 ± 0.04	0.85 ± 0.05	0.98 ± 0.04	1.01 ± 0.03 *
LVPW, g	0.83 ± 0.06	0.80 ± 0.03	0.88 ± 0.03	0.95 ± 0.03 *

Data is presented as mean ± SEM ; LA : left atrium, FS : Fractional Shortening, FAS : Fractional Area Shortening, LV: Left ventricle, IVS : Inter-Ventricular Septum, LVPW: Left ventricular Posterior wall. * P<0.05 vs all group.

Table 3. Hemodynamic Data

	Basal	1 month	2 months
LV systolic pressure, mm Hg	110.2 ± 7.3	108.2 ± 7.8	107.3 ± 9.6
LV diastolic pressure, mm Hg	16.3 ± 3.6	7.9 ± 1.5 *	23.0 ± 2.9 *
LV end-diastolic pressure mmHg	16.7 ± 3.8	22.0 ± 2.9	32.7 ± 1.5 *
LAD systolic pressure, mm Hg	85.4 ± 11.9	92.7 ± 9.7	84.3 ± 9.8
LAD diastolic pressure, mmHg	52.0 ± 11.6	50.8 ± 6.2	35.0 ± 5.0
LCX systolic pressure, mm Hg	76.0 ± 9.4	91.7 ± 9.6	89.7 ± 6.2
LCX diastolic pressure, mm Hg	48.6 ± 7.6	50.7 ± 4.4	41.7 ± 1.7
RC systolic pressure, mm Hg	91.4 ± 9.1	90.3 ± 11.8	91.3 ± 4.7
RC diastolic pressure, mm Hg	62.8 ± 9.2	50.0 ± 8.0	48.3 ± 10.9
LV + dP, mmHg/s	1910.0 ± 303.9	1323.8 ± 374.1	1 076.7 ± 90.6
LV - dT, mm Hg/s	1980.0 ± 255.7	1265.8 ± 208.3*	1186.7 ± 150.6*

Data is presented as mean ± SEM; LV: left ventricle, LAD: left anterior descending, LCX: left circumflex, RC: right coronary. * P < 0.05 vs basal group..

Table 4. Contraction to potassium chloride (60mM) and prostaglandin $F_{2\alpha}$ of epicardial coronary arteries after 2 months of aortic banding.

Agonist	Control	24 hours	Sham	2 months
KCl (60mM) (g)	11.1 \pm 0.7	10.8 \pm 0.9	12.7 \pm 1.2	12.4 \pm 0.6
PGF $_{2\alpha}$ (g)	8.6 \pm 0.7	7.4 \pm 0.5	9.3 \pm 1.2	9.6 \pm 0.5
Dosage of PGF $_{2\alpha}$ (10 $^{-6}$ M) for achieving target levels of contraction	4.9 \pm 0.6	3.9 \pm 0.4	5.8 \pm 0.4	4.1 \pm 0.6

Data is presented as mean \pm SEM ; PGF $_{2\alpha}$, prostaglandin $F_{2\alpha}$, P = NS

FIGURE 1A

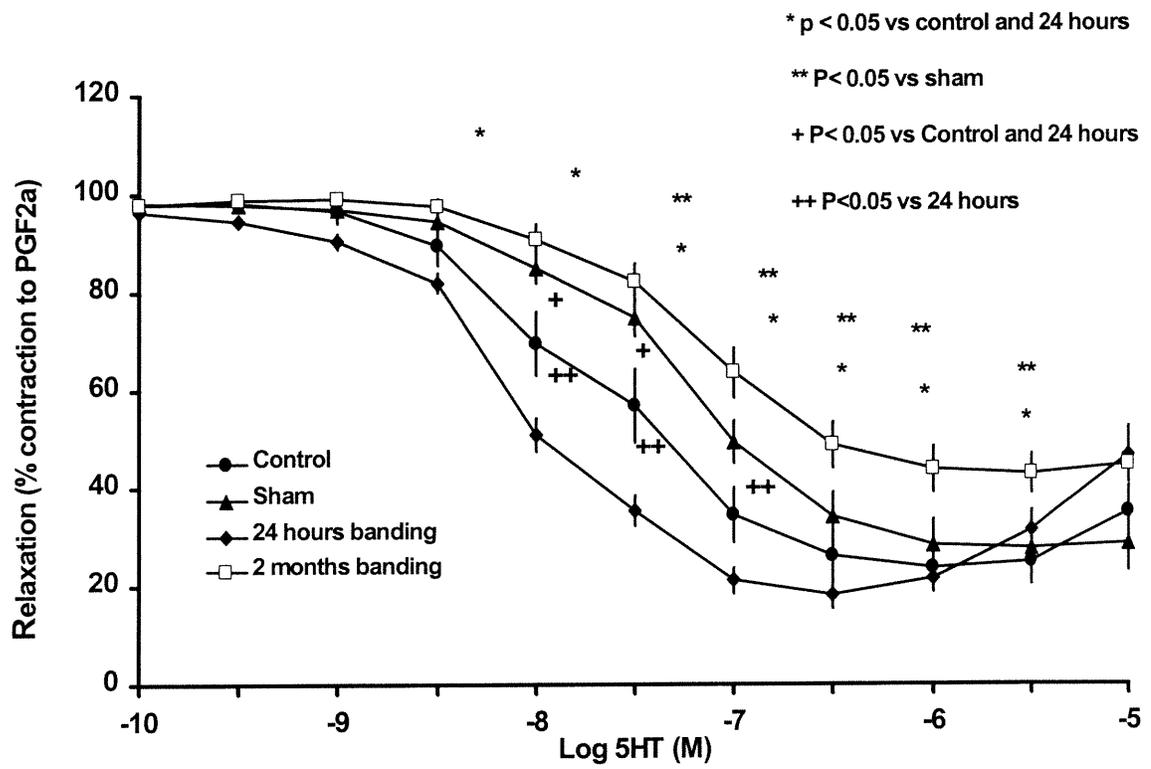
Porcine coronary arteries after 24 hours
and 2 months of aortic banding

FIGURE 1B

Porcine coronary arteries after 24 hours
and 2 months of aortic banding

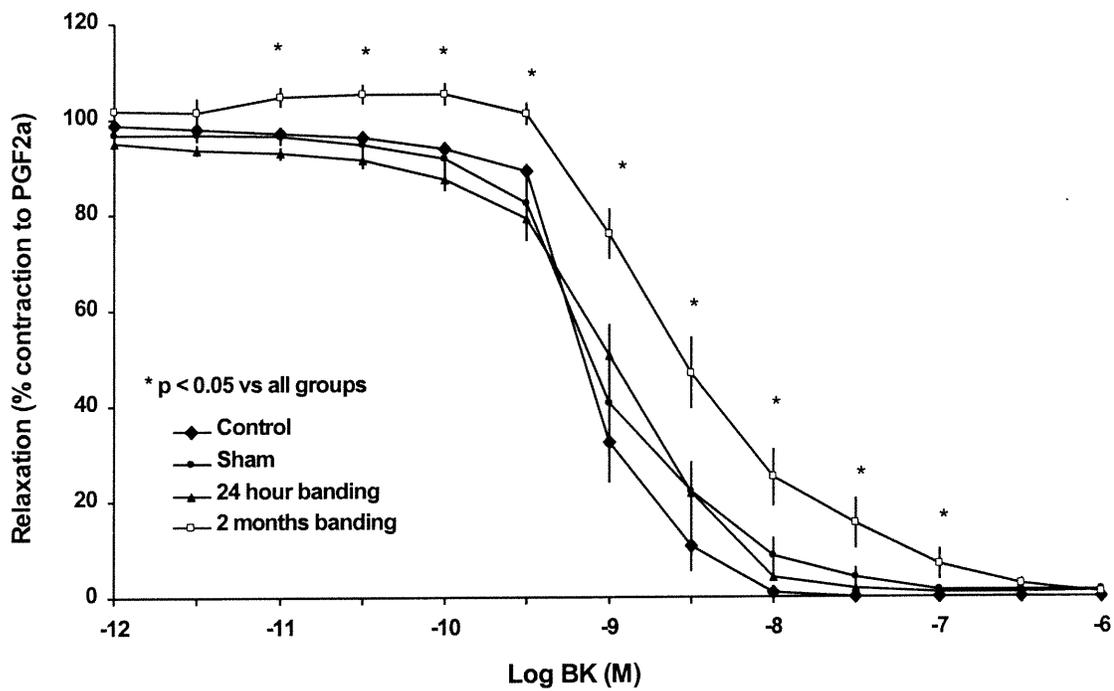


FIGURE 1C

Porcine coronary arteries after 24 hours and
2 months of aortic banding

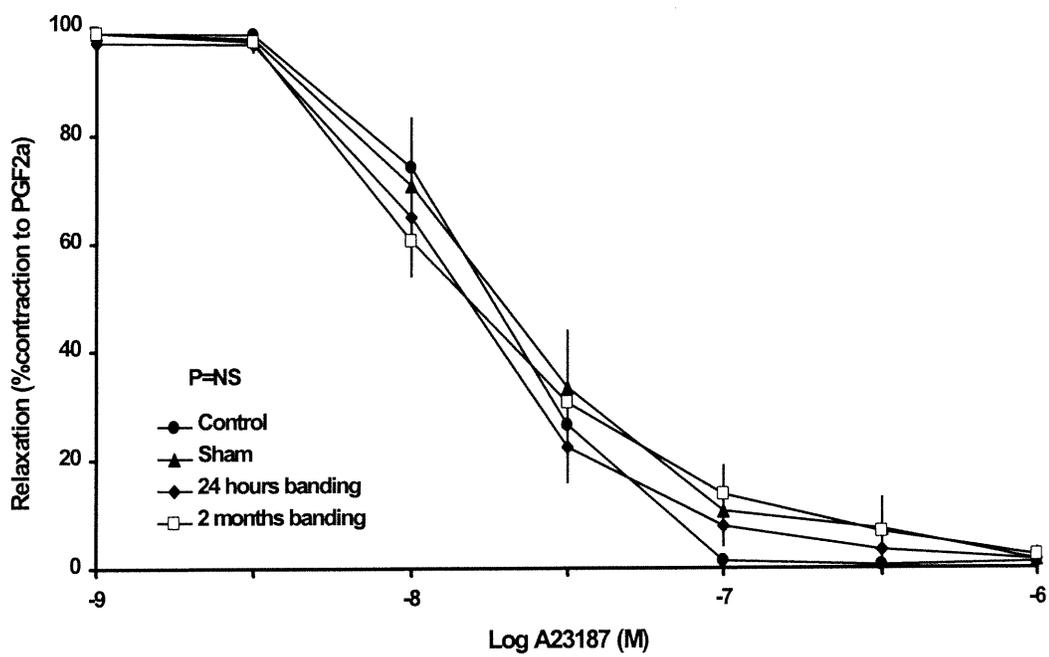


FIGURE 2A

Control rings of porcine coronary arteries

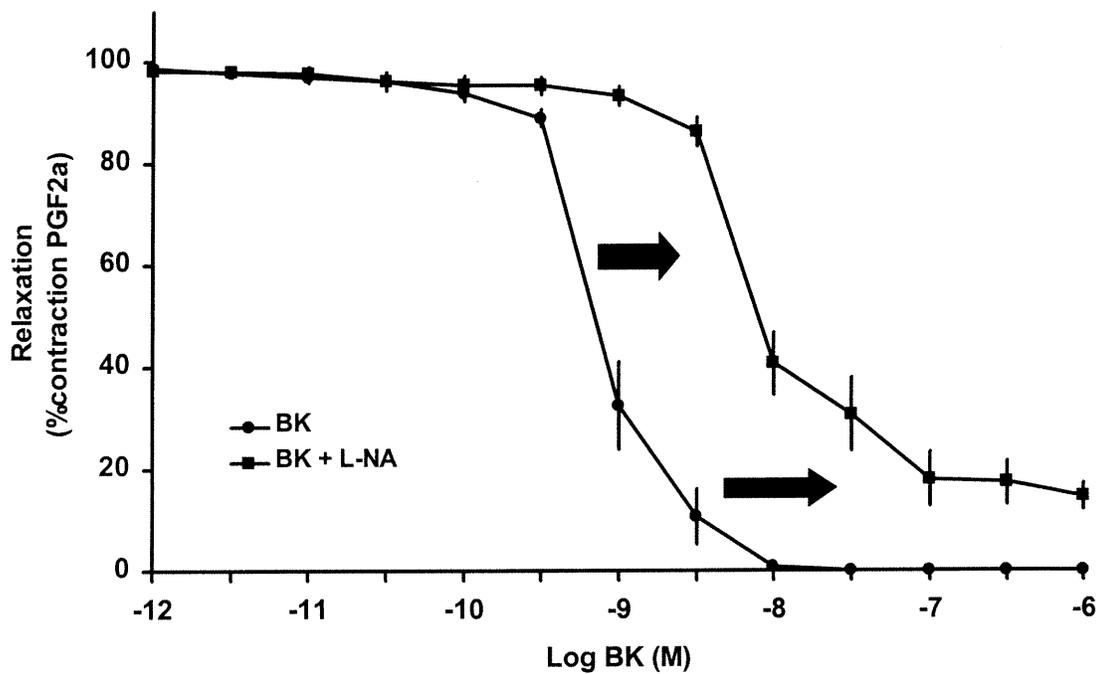


FIGURE 2B

Effect of 2 month aortic banding on coronary arteries

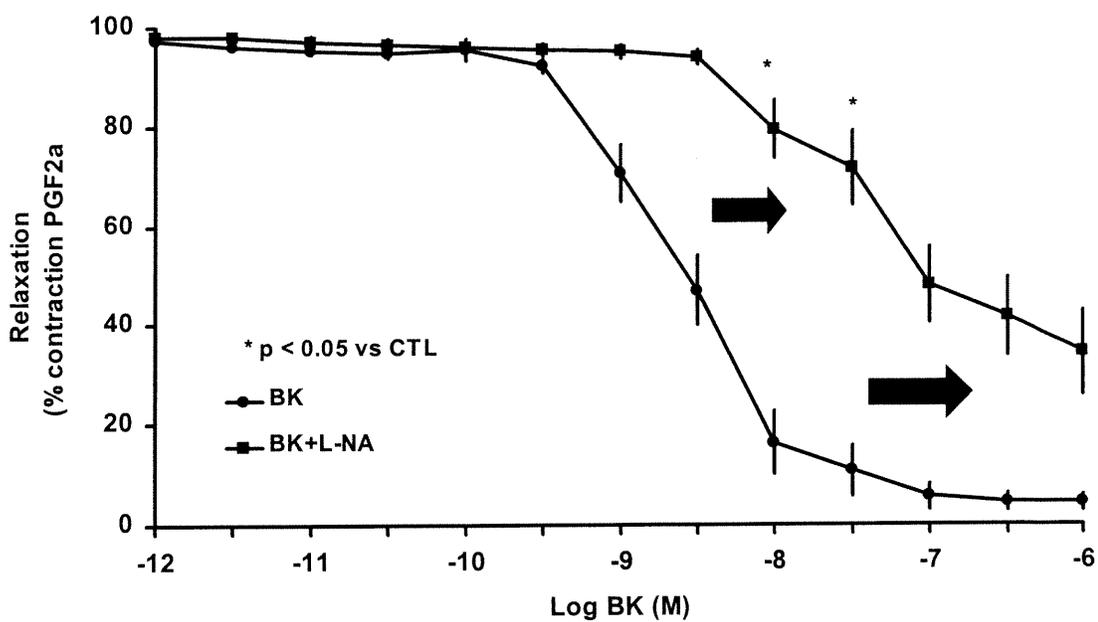


FIGURE 3

Effect of 2 months aortic banding on porcines
epicardial coronary arteries

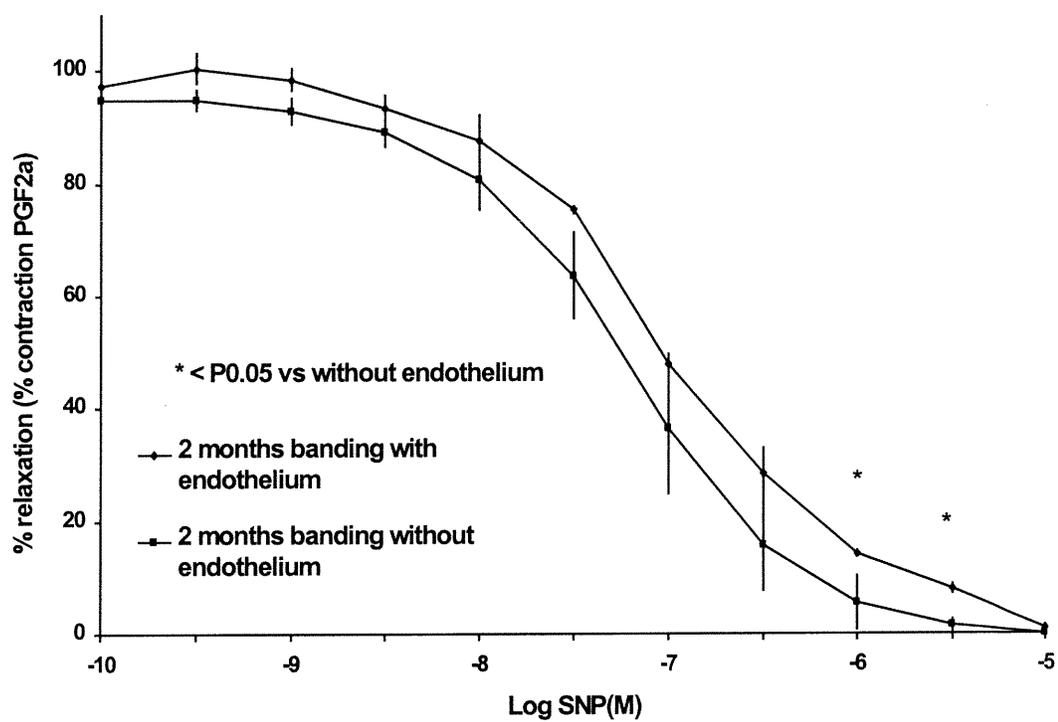


FIGURE 4

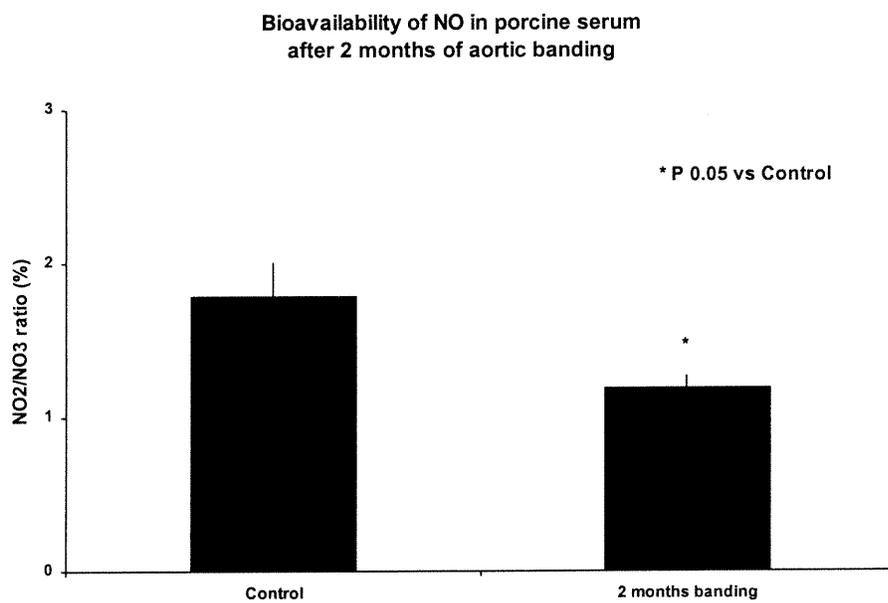


FIGURE 5

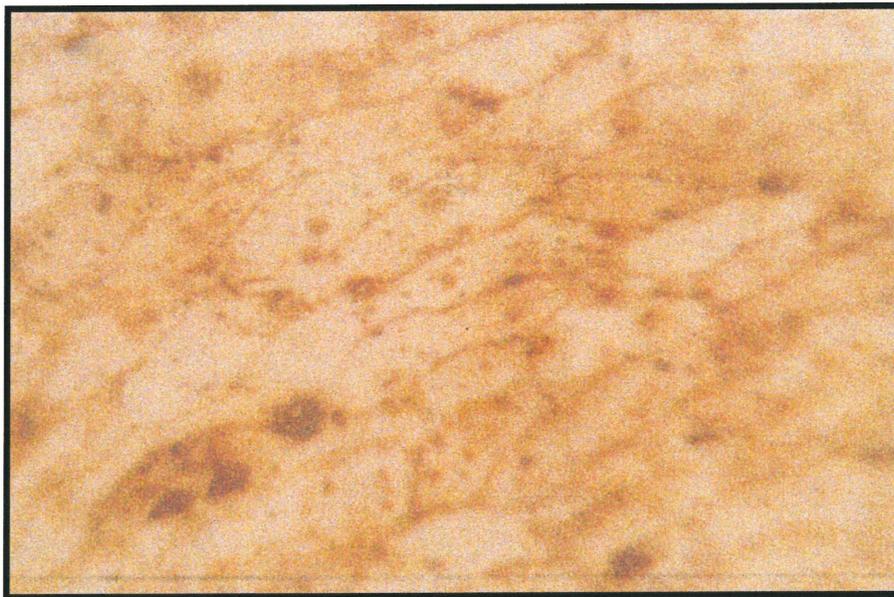
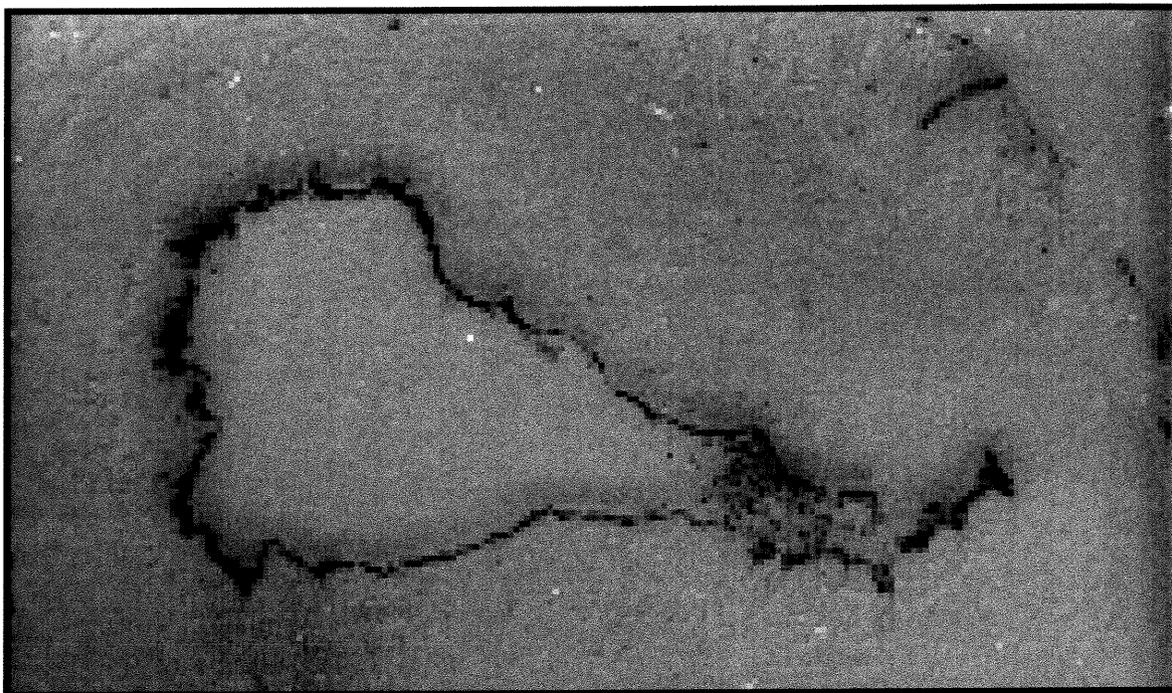


FIGURE 6



Discussion

DISCUSSION

Cette étude démontre que les relaxations dépendantes de l'endothélium des artères coronaires épocardiques sont réduites dans un modèle d'hypertrophie ventriculaire gauche secondaire à un cerclage aortique. La dysfonction endothéliale dans l'HVG secondaire à une sténose aortique est due à une altération des relaxations dépendantes de l'endothélium médiées par les protéines G_i et G_q des artères coronaires épocardiques. Elles sont associées avec une diminution basale de la libération de NO démontrée par la baisse du taux basal de GMP cyclique au niveau de la paroi vasculaire et de sa production reflétée par la diminution du rapport nitrite/nitrate au niveau plasmatique 60 jours après le cerclage de l'aorte. Nous avons déjà démontré que dans un modèle porcin de transplantation cardiaque, la dysfonction endothéliale des artères coronaires dans l'allogreffe implique d'une façon prédominante les relaxations médiées par les protéines G_i et est également associée avec une biodisponibilité réduite du NO (33). Plusieurs études ont identifié une altération de la voie L-arginine-NO pour expliquer la réponse réduite à l'acétylcholine, et d'autres agonistes endothéliaux, dans l'athérosclérose et d'autres pathologies cardiovasculaires.

Dans un modèle d'hypertrophie ventriculaire, la réserve sous-endocardique coronarienne est diminuée : ceci pourrait être lié à une altération de la voie de signalisation NO-GMP cyclique (114). De plus, l'HVG chronique provoquée par une surcharge de pression n'est pas associée avec une diminution de l'expression ou de l'activité de la eNOS ou du contenu en GMP cyclique (115). Dans ce même modèle de sténose aortique chez le rat, un traitement à la L-arginine augmente les niveaux cardiaques de GMP cyclique, mais ne modifie pas la masse myocardique (115). Ces données suggèrent que la dysfonction endothéliale des artères coronaires qui survient précocement au cours du développement de l'HVG n'est pas causée par une

diminution généralisée de la production, de la libération, de la diffusion ou de l'action du monoxyde d'azote. La dysfonction endothéliale présente après 2 mois de cerclage aortique implique préférentiellement les relaxations médiées par les protéines G_i et à un degré moindre les relaxations produites par les protéines G_q observé également dans d'autres pathologies cardiovasculaires comme le diabète, les lésions d'ischémie-reperfusion, l'hypercholestérolémie et la transplantation cardiaque.

La présente étude démontre que l'HVG est associée à une dysfonction endothéliale sans destruction des cellules endothéliales ou de changements morphologiques. La perte des cellules endothéliales pourrait mener à une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium si la surface de dénudation endothéliale est suffisante. De plus, l'endothélium régénéré ne possède pas les mêmes capacités vasodilatatrices que l'endothélium normal (112). Dans cette présente étude, il n'y a aucune dénudation de l'endothélium apparente immédiatement après 60 jours de cerclage de l'aorte puisque la coloration au nitrate d'argent des artères coronaires épiscopales montrent une préservation de la surface endothéliale et aucune altération des relaxations dépendantes de l'endothélium ne sont observées 24 heures après la chirurgie. Ceci suggère donc que la dysfonction endothéliale des artères coronaires épiscopales qui survient précocement durant le développement de l'hypertrophie ventriculaire implique spécifiquement la voie médiée par les protéines G et n'est donc pas provoquée par la régénération de l'endothélium des artères coronaires.

Classiquement, la dysfonction endothéliale impliquée dans plusieurs pathologies cardiovasculaires se manifeste par une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium, secondaire à la réduction de la libération (ou de l'activité) des facteurs vasodilatateurs dépendants de l'endothélium, et/ou à une plus grande influence des contractions dépendantes de l'endothélium. Présentement, les facteurs de contraction

dépendants de l'endothélium (EDCF) qui ont été identifiés sont les anions superoxydes, endoperoxydes, la thromboxane A₂ et l'endothéline (ET-1) (180). Dans l'hypertension artérielle, une augmentation de la concentration d'angiotensine II plasmatique et tissulaire a été rapportée (181), ce qui pourrait induire la libération d'ET-1 par les cellules endothéliales (182). Puisque, le NO inhibe l'expression et la production de l'endothéline (183) et que la production de NO est réduite dans la dysfonction endothéliale, il est possible que la production ET-1 soit augmentée par la voie de l'angiotensine II puisque l'endothéline joue un rôle dans le développement de l'hypertrophie cardiaque dans un modèle *in vivo* de surcharge de pression et le blocage des récepteurs à l'endothéline supprime la croissance du muscle cardiaque sans aucune réduction de la surcharge de pression (184).

Les relaxations dépendantes de l'endothélium non médiées par les protéines G_i sont diminuées légèrement par l'HVG, tel que démontré par le déplacement vers la droite de la courbe dose-réponse à la bradykinine. Cependant, la voie de l'EDHF, étudiée par la construction de courbes dose-réponse à la bradykinine menant à la libération de NO et de l'EDHF et à la BK en présence de N ω -L-arginine (L-NA, un inhibiteur irréversible de la eNOS) n'est pas affecté dans ce modèle. Donc, le facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium, qui peut prendre la relève lors d'altérations de la voie du NO et servir de voie alterne de la régulation du tonus vasculaire lorsque la production ou l'activité du NO sont réduites (185), est intacte à ce stade dans le modèle étudié.

Les mécanismes potentiels impliqués dans l'altération de la voie L-arginine-NO-GMP cyclique qui peuvent être mis en cause dans la dysfonction endothéliale sont une réduction de la synthèse, une biodisponibilité diminuée des co-facteurs (L-arginine et la tétrahydrobioptérine), une diminution de l'expression ou de l'activité de la NO synthase endothéliale, une augmentation d'inhibiteurs endogènes de la eNOS, une diminution de la

biodisponibilité du NO, une baisse de la libération du NO induite par les agonistes au niveau des récepteurs soient par un découplage fonctionnel des protéines G ou une régulation négative des récepteurs, de l'inactivation accrue du NO et une réduction de la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO (104).

Une atteinte de la voie L-arginine-NO peut jouer un rôle important dans la pathogénèse de l'hypertrophie cardiaque dans l'hypertension artérielle (186). Une disponibilité diminuée de la L-arginine paraît peu probable, puisque les cellules endothéliales contiennent des concentrations de ce substrat mille fois supérieures (concentration millimolaire) à celles optimales pour l'activité de la eNOS (concentration micromolaire). Cependant, il pourrait s'agir d'un défaut de transport intracellulaire de L-arginine puisque l'incubation de L-arginine avec des anneaux d'artères coronaires après 60 jours de cerclage aortique n'améliore pas les relaxations dépendantes de l'endothélium à la sérotonine, agoniste des récepteurs 5-HT_{1D} couplés aux protéines G_i, ni à la bradykinine, agoniste des récepteurs B₂ couplés aux protéines G_q (Figure 4, Figure 5).

Il a été démontré que la tétrahydrobioptérine (BH₄) est requise pour l'activité optimale de la eNOS (12). En effet, le BH₄ est un cofacteur essentiel qui collabore à la capacité de l'enzyme à lier la L-arginine (13). Par ailleurs, il existe un lien étroit entre la biodisponibilité de la tétrahydrobioptérine et la synthèse du monoxyde d'azote dans les cellules endothéliales vasculaires porcines et humaines (166). Une concentration optimale de BH₄ est donc essentielle pour la production du NO (187). L'ajout d'un analogue liposoluble de BH₄, le 6-méthyltetrahydroptérine améliore les relaxations dépendantes de l'endothélium des artères coronaires médiées par les protéines G_i et G_q dans ce modèle d'hypertrophie ventriculaire gauche secondaire à un cerclage de l'aorte (Figure 6, Figure 7). Ces données suggèrent que l'altération de la voie du NO est due à un déficit de la biodisponibilité de la tétrahydrobioptérine. Une diminution de la

concentration intracellulaire de tétrahydrobioptérine peut altérer également l'activité de la eNOS qui devient alors une source de radicaux libres (157).

L'expression de la NO synthase endothéliale est sélectivement altérée dans les cardiomyocytes mais pas dans les cellules endothéliales de la microcirculation coronarienne de rats spontanément hypertendus (SHR). Hayakawa et al suggère que l'augmentation de l'activité de la eNOS a un rôle cardioprotecteur dans l'hypertension artérielle (188). Dans la présente étude, l'expression immunohistochimique de la eNOS au niveau des cellules endothéliales des artères coronaires 60 jours après la chirurgie est normale comparée aux artères coronaires saines. De plus à l'appui de cette observation, la réponse des artères coronaires au calcium ionophore A23187, agoniste dépendant de l'endothélium mais indépendant des récepteurs, est préservée. Chez le porc miniature, aucune différence d'expression de la eNOS dans un modèle d'HVG n'a été démontrée au niveau du ventricule gauche, suggérant que les réponses endothéliales anormales sont attribuables soit à une réduction de l'activité, malgré une expression conservée, ou à une inactivation accrue du NO (7).

La dysfonction endothéliale des artères coronaires est probablement due à une diminution de la libération de NO par les cellules endothéliales démontrée par la réduction de la production basale de GMP cyclique 60 jours après le cerclage aortique. Nous avons observé également une diminution de la production du NO par l'endothélium démontrée par la diminution du rapport nitrites/nitrates plasmatiques qui sont des produits d'oxydation du monoxyde d'azote, dans ce modèle d'HVG. Le NO_2^- et le NO_3^- sont également des marqueurs de l'activité de la NO synthase endothéliale puisque leurs diminution indiquent une baisse de la production du NO qui peut être relié à l'activité de l'enzyme (189). L'examen histologique des artères coronaires épicaudiques démontrent un faible degré d'hyperplasie intinale chez les artères étudiées (Figure 8). L'hyperplasie intinale est

mesuré selon une échelle semi-quantitative adaptée de Lurie et al (190) et déjà publiée (191), elle peut survenir à la suite de l'augmentation de la post-charge provoquée par le cerclage aortique et être due à une réduction des effets d'inhibition du NO sur la croissance et de la prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire. Une intima plus épaisse pourrait aussi limiter la diffusion du NO vers les cellules du muscle lisse vasculaire et être responsable de la diminution de la relaxation vasculaire à un stade avancé de l'hyperplasie intimale.

Le stress oxydatif correspond à une condition dans laquelle les cellules sont exposées à des niveaux excessifs d'oxygène pour former des radicaux libres. Au niveau de la paroi vasculaire, le stress oxydatif altère plusieurs fonctions physiologiques et est impliqué dans plusieurs pathologies cardiovasculaires incluant l'hypertension, l'athérosclérose et les lésions d'ischémie-reperfusion. Dans l'athérosclérose et l'hypertension, un déséquilibre entre le NO et les anions superoxydes au niveau de la paroi vasculaire entraîne l'inactivation du NO et donc une biodisponibilité réduite de ce dernier (192). En effet, des études cliniques et expérimentales ont démontré que l'atténuation de la vasodilatation dépendante de l'endothélium est une caractéristique du stade précoce de l'athérosclérose lié à l'augmentation de l'inactivation du NO par l'anion superoxyde (193). La production du radical libre superoxyde (O_2^-) par les cellules endothéliales peut interférer avec la vasodilatation en piégeant le monoxyde d'azote (194). Cependant dans ce modèle, la dysfonction endothéliale peut être due à la dégradation du NO puisque la production des peroxynitrites plasmiques est augmenté de façon significative après 60 jours (Figure 9). Le peroxynitrite ($ONOO^-$) produit par la réaction entre les radicaux libres NO et O_2^- (53), pourrait également inhiber les rôles physiologiques du NO.

Il a été récemment démontré que les peroxydes d'hydrogène sont des médiateurs des relaxations dépendantes de l'endothélium (158). Après 2

mois de cerclage aortique, l'incubation des anneaux des artères coronaires avec de la catalase, un antioxydant qui piège les H_2O_2 (158), diminue les relaxations dépendantes de l'endothélium à la sérotonine et à la bradykinine. Le peroxy-nitrite engendre des dommages oxydatifs moléculaires et tissulaires et est impliqué dans la pathophysiologie de plusieurs maladies comme l'hypercholestérolémie, l'hypertension, l'insuffisance cardiaque (46). Cependant, il y a une compétition entre le NO et la superoxyde dismutase (SOD) pour la disponibilité de l' O_2^- . La fraction de l' O_2^- qui réagit pour former le $ONOO^-$ est dictée par la concentration du NO (195). L'incubation des artères coronaires de porcs sténosés avec un supplément de superoxyde dismutase et de catalase améliorent les relaxations dépendantes de l'endothélium médiées par les protéines G_i et G_q (Figure 10, Figure 11). Consentino et al ont démontré que lorsque la biodisponibilité du BH_4 est diminuée, la eNOS devient une source importante de production de radicaux libres (12). La production simultanée de O_2^- et de NO entraîne donc la formation de peroxy-nitrites et l'oxydation de la tétrahydrobioptérine ce qui cause un découplage fonctionnel de la eNOS (196). La NO synthase endothéliale forme alors des anions superoxydes plutôt que du NO (53). Ces observations suggèrent donc que la dysfonction endothéliale impliquée dans le développement de l'hypertrophie ventriculaire peut être due à une hausse de production des anions superoxydes démontré par l'augmentation plasmatique des peroxy-nitrites et qui est renversé par l'administration des antioxydants comme la superoxyde dismutase et la catalase.

Dans notre étude, aucune différence significative de la relaxation indépendante de l'endothélium à un donneur de NO, le nitroprussiate de sodium n'a été observée entre les anneaux soumis à la sténose comparés aux témoins. Les contractions dépendantes et indépendantes de l'endothélium au KCl et au $PGF_{2\alpha}$ ne sont pas différentes en amplitude des contractions observées 60 jours après la sténose aortique. Aucune différence significative n'a également été observée quant à la dose de $PGF_{2\alpha}$

requis pour atteindre 50% de la contraction maximale au KCl. Ceci confirme l'intégrité des cellules du muscle lisse vasculaire des artères coronaires épiscopales et que la diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium observée n'est pas due à une diminution de la sensibilité des cellules du muscle lisse vasculaire au NO et démontre qu'il s'agit bien d'une dysfonction endothéliale des artères coronaires.

L'augmentation de la fibrose périvasculaire combinée à la compression des vaisseaux pourrait compromettre la capacité vasodilatatrice des artères coronaires épiscopales. Le NO possède une activité antihypertrophique, soulevant l'hypothèse qu'une altération de cette propriété pourrait promouvoir la progression de l'hypertrophie (7). Le NO libéré par les cellules endothéliales des artères coronaires joue un rôle spécifique sur la fonction myocardique, en favorisant la relaxation myocardique et la fonction diastolique (197). L'étude de la fonction ventriculaire par hémodynamie 2 mois après la sténose démontre une augmentation significative de la pression intraventriculaire gauche en diastole et en fin de diastole. On observe également une réduction statistiquement significative de la vitesse de la relaxation ventriculaire ($-dP/dT$) après 2 mois de sténose aortique (198). Donc, la dysfonction endothéliale des artères pourrait avoir un impact direct sur la relaxation ventriculaire et affecter la fonction ventriculaire dans l'hypertrophie cardiaque. MacCarthy et al ont démontré que la dysfonction endothéliale dans l'HVG secondaire à une surcharge de pression est associée avec l'altération de la relaxation ventriculaire gauche (7).

LIMITES DU MODÈLE

La compréhension des mécanismes responsables de l'altération des relaxations dépendantes dans les artères coronaires épiscopales dans la sténose aortique qui peut affecter l'autorégulation de la circulation coronarienne et compromettre la perfusion myocardique dans la période

périopératoire est cruciale puisque qu'il survient une dysfonction post-ischémique sous-endocardique dans l'hypertrophie ventriculaire dans un modèle canin (4). Chez des patients avec une sténose supravalvulaire congénitale, une dysplasie des artères coronaires a été observée ; plus obstructive en proximale que distale ce qui signifie que cette situation hémodynamique est associée avec une athérosclérose précoce des artères coronaires. La contribution de la dysfonction endothéliale dans cette pathologie rare, est inconnue (199). Une stimulation pharmacologique pour augmenter la libération de NO lors de la période périopératoire est une approche intéressante pour prévenir ou traiter la dysfonction endothéliale. La courte période de temps utilisée dans ce modèle est un inconvénient pour l'étude des mécanismes mais des expériences chroniques pourrait être très utiles dans la caractérisation de la cinétique de la dysfonction endothéliale à plus long terme dans un modèle de surcharge de pression. Pour des études à long terme, l'utilisation de porcs miniatures serait un atout puisqu'il n'y a pas de problème au niveau de la croissance normale des porcs. Ceci peut permettre également l'étude de la dysfonction endothéliale dans un modèle adulte, ce qui reproduirait mieux la chirurgie cardiaque adulte. Une autre limite de ce modèle est que notre technique de cerclage aortique n'expose pas les artères aux mêmes forces de cisaillement qu'une sténose aortique valvulaire. Néanmoins, il n'y aucune évidence d'une dysfonction endothéliale à court terme due à une modification du flot intracoronarien secondaire à une sténose supraostiale. Des études d'efficacité des stratégies de protection myocardique (cardioplégie) dans ce modèle d'HVG sont également en planification (200).

CONCLUSION

La chirurgie valvulaire aortique pour la sténose aortique et la chirurgie cardiaque chez les patients avec hypertrophie ventriculaire gauche sont toujours associées avec un taux non négligeable de morbidité et de mortalité

dû à une mauvaise protection myocardique lors de la période périopératoire. Rapidement après le développement de l'hypertrophie, il y a une altération des relaxations dépendantes de l'endothélium des artères coronaires alors que la voie de l'EDHF n'est pas altérée. L'ajout du co-facteur essentiel à la formation du NO, la tétrahydrobioptérine, améliore les relaxations dépendantes de l'endothélium. L'utilisation du BH₄ ou d'un antioxydant pourrait être une approche intéressante dans le traitement et la prévention de la dysfonction endothéliale des artères coronaires dans l'hypertrophie ventriculaire secondaire à une sténose aortique et à l'hypertension artérielle. Ceci permettrait d'améliorer les résultats des chirurgies cardiaques mais également la fonction ventriculaire chez les patients avec une hypertrophie ventriculaire gauche.

Bibliographie

- (1) Kingsbury MP, Turner MA, Flores NA, Bovill E, Sheridan DJ. Endogenous and exogenous coronary vasodilation are attenuated in cardiac hypertrophy : a morphological defect ? J Mol Cell Cardiol 2000; 32:527-538.
- (2) Hokken RB, Steyerberg EW, Verbann N, al. Twenty-five years of aortic valve replacement using mechanical valves. Eur Heart J 1997; 18:1157-1165.
- (3) Ishihara K, Zile MR, Tomita M, et al. Left ventricular hypertrophy in a canine model of reversible pressure overload. Cardiovasc Res 1992; 26:580-585.
- (4) Hasebe N, Shen Y, Kiuchi K, Hittinger L, Bishop SP, Vatner SF. Enhanced postischemic dysfunction selective to subendocardium in conscious dogs with LV hypertrophy. Am J Physiol 1994; 266:H702-H713.
- (5) Grieve DJ, MacCarthy PA, Gall NP, Cave AC, Shah AM. Divergent biological actions of coronary endothelial nitric oxide during progression of cardiac hypertrophy. Hypertension 2001; 38:267-273.
- (6) Ghaleh B, Hittinger L, Kim S, Kudej R, Iwase M, Uechi M, Berdeaux A, Bishop SP, Vatner SF. Selective large coronary endothelial dysfunction in conscious dogs with chronic pressure overload. Am J Physiol 1998; 274:H539-H551.
- (7) MacCarthy PA, Shah AM. Impaired endothelium-dependent regulation of ventricular relaxation in pressure-overload cardiac hypertrophy. Circulation 2000; 101:1854-1860.

- (8) Furchgott RF, Zawadski JV. The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.
- (9) Schini-Kerth VB, Vanhoutte PM. Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Exp Physiol* 1995; 80:885-905.
- (10) Vanhoutte PM, Perrault LP, Vilaine JP. Endothelial dysfunction and vascular disease. In: Rubany GM DV, ed. *Endothelium in clinical practice*. USA: Marcel Dekker Inc, 1997: 465-490.
- (11) Consentino F, Katusic ZS. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation* 1995; 91(1):139-144.
- (12) Consentino F, Luscher TF. Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res* 1999; 43:274-278.
- (13) Mayer B, Werner ER. In search of a function for tetrahydrobiopterin in the biosynthesis of nitric oxide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995; 351:453-463.
- (14) Biegelsen ES, Loscalzo J. Endothelial function and atherosclerosis. *Coronary Artery Dis* 1999; 10:241-256.
- (15) Moncada S, Palmer R, Higgs E. Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.
- (16) Vane JR. The Croonian Lecture, 1993: The endothelium : maestro of the blood circulation. *Phil Trans R Soc Lon B* 1994; 348:225-246.

- (17) Scott-Burden T, Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation* 1993; 87(Suppl. V):V51-V55.
- (18) Bassenge E, Heuch G. Endothelial and neuro-humoral control of coronary blood flow in health and disease. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1990; 116:79-163.
- (19) Rubanyi G, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250:H1145-H1149.
- (20) Rubanyi G, Freay AD, Jonhs A, et al. Elevated transmural pressure inhibits the release of EDRF by mechanism(s) similar to high K⁺ and barium. In: Mulvany MJ ed. *Resistance arteries, structure and function*. New York: Elsevier, 1991: 226-232.
- (21) Vanhoutte PM. Hypercholesterolemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxing factor by aggregating platelets. *Eur Heart J* 1991; 12(Suppl. E):25-32.
- (22) Vanhoutte PM. State of the Art Lecture : Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 1989; 13(No.6, Part 2):658-667.
- (23) Flavahan NA, Vanhoutte PM. Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction. *Am J Hypertens* 1995; 8:28S-41S.
- (24) Houston D, Vanhoutte PM. Platelets and endothelium-dependent responses. In : Vanhoutte PM, ed. *Relaxing and cotracting factors : Biological and Clinical Research*. Humana Press, Clifton, NJ, 1988: 425-449.
- (25) Luscher TF, Noll G. Endothelial dysfunction in the coronary circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24(Suppl. 3):S16-S26.

- (26) Vanhoutte PM. The endothelium-modulator of vascular smooth-muscle tone. *New Engl J Med* 1988; 319:512-513.
- (27) Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction : From physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:61-74.
- (28) Flavahan NA, Vanhoutte PM. G-proteins and endothelial responses. *Blood Vessels* 1990; 27:218-229.
- (29) Fisslthaller B, Hinsch N, Chataigneau T, Popp R, Kiss L, Busse R, Fleming I. Nifedipine increases cytochrome P4502C expression and endothelium-derived hyperpolarizing factors and converting enzyme inhibition. *Am J Cardiol* 1995; 76:E3-E12.
- (30) Fleming I, Michaelis UR, Bredenkotter D, Fisslthaller B, Dehghani F, Brandes RP, Busse R. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (cytochrome P450 2C9) is a functionally source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res* 2001; 88:44-51.
- (31) Komori K, Vanhoutte PM. G-proteins and endothelial responses. *Blood Vessels* 1990; 27:238-245.
- (32) Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J Clin Invest* 1993; 92:2867-2871.
- (33) Perrault LP, Bidouard JP, Janiak P, Villeneuve N, Bruneval P, Vilaine JP, Vanhoutte PM. Impairment of G-protein-mediated signal transduction in the porcine coronary endothelium during rejection after heart transplantation. *Cardiovasc Res* 1999; 43:457-470.
- (34) Vanhoutte PM, Rubanyi G, Miller V, Houston D. Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann Rev Physiol* 1986; 48:307-320.

- (35) Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Ann Rev Physiol* 1999; 61:391-415.
- (36) Vanhoutte PM. Say NO to ET. *J Auton Nerv Syst* 2000; 81:571-577.
- (37) Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35:235-255.
- (38) Dupuis J. Endothelin receptors antagonists and their developing role in cardiovascular therapeutics. *Can J Cardiol* 2000; 16(7):903-910.
- (39) Goodwin AT, Amrani M, Gray CC, Jayakumar J, Yacoub MH. Role of endogenous endothelin-1 to the maintenance of vascular tone in the rat. *J Physiol* 1998; 511:549-557.
- (40) Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Fujisaki H, Adachi S, Akimoto H, Ohta Y, Marumo F. Endothelin ETA receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload. *Circulation* 1994; 89(5):2198-2203.
- (41) Pueyo M, Michel JB. Angiotensin II receptors in endothelial cells. *Gen Pharmacol* 1997; 29:691-696.
- (42) Li P, Chappell MC, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilatation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension* 1997; 29:394-400.
- (43) Griending KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle: New concepts. *Hypertension* 1997; 29:213-239.
- (44) Wattanapitayakul SK, Weinstein DM, Holycross BJ, Bauer JA. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in

- angiotensin-induced cardiovascular disorders. *Faseb J* 2000; 14:271-278.
- (45) Luscher TF. Endothelial dysfunction : The role and impact of the renin-angiotensin system. *Heart* 2000; 84(Suppl. I):I20-I22.
- (46) Kojda G, Harrison DG. Interactions between NO and reactive oxygen species : pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999; 43:562-571.
- (47) Hayashi Y, Sawa Y, Ohtake S, Fukuyama N, Nakazawa H, Matsuda H. Peroxynitrite formation from human myocardium after ischemia-reperfusion during open heart operation. *Ann Thorac Surg* 2001; 72:571-576.
- (48) Weiss SJ, Young J, LoBuglio AK, Slivka A, Nimeh NF. Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 1981; 68:714-722.
- (49) Rosen GM, Greeman BA. Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:7269-7273.
- (50) Rubanyi G, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hypoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor(s). *Am J Physiol* 1986; 250:H822-H827.
- (51) Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, Harrison DG. Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. *Am J Physiol* 1991; 260:C219-C225.
- (52) Ronson RS, Nakamura M, Vinten-Johansen J. The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite. *Cardiovasc Res* 1999; 44(1):47-59.

- (53) Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in ApoE-deficient mice: Implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001; 103:1282-1288.
- (54) Skepper J, Pierson R, Young K, et al. Cytochemical demonstration of sites of hydrogen peroxide generation and increased vascular permeability in isolated pig hearts after ischemia and reperfusion. *Microsc Res Tech* 1998; 42:369-385.
- (55) Vanhoutte PM, Boulanger CM, Mombouli JV. Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition. *Am J Cardiol* 1995; 76(15):3E-12E.
- (56) Groves PH, Banning AP, Penny WJ, Newby AC, Cheadle HA, Lewis MA. The effects of exogenous nitric oxide on smooth muscle cell proliferation following porcine carotid angioplasty. *Cardiovasc Res* 1995; 30:87-96.
- (57) Shimokawa H, Aarhus LL, Vanhoutte PM. Porcine coronary arteries with regenerated endothelium have a reduced endothelium-dependent responsiveness to aggregating platelets and serotonin. *Circ Res* 1987; 61:256-270.
- (58) Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Natural course of the impairment of endothelium-dependent relaxations after balloon endothelial removal in porcine coronary arteries. Possible dysfunction of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circ Res* 1989; 65:740-743.
- (59) Borg-Capra C, Fournet-Bourguignon MP, Janiak P, Villeneuve N, Bidouard JP, Vilaine JP, Vanhoutte PM. Morphological heterogeneity

with normal expression but altered function of G proteins in porcine cultured regenerated coronary endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1997; 122(6):999-1008.

- (60) Shimokawa H, Vanhoutte PM. Angiographic demonstration of hyperconstriction induced by serotonin and aggregating platelets in porcine coronary arteries with regenerated endothelium. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17:1197-1202.
- (61) Golino P, Piscione F, Willerson JT, et al. Divergent effects of serotonin on coronary-artery dimension and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients. *N Engl J Med* 1991; 324:641-648.
- (62) Perrault LP, Mahlberg F, Breugnot C, Bidouard JP, Villeneuve N, Vilaine JP, Vanhoutte PM. Hypercholesterolemia increase coronary endothelial dysfunction, lipid content, and accelerated atherosclerosis after heart transplantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:728-736.
- (63) Shimokawa H, Vanhoutte PM. Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circ Res* 1989; 64:900-914.
- (64) Kolodgie FD, Virmani R, Rice HE, et al. Vascular reactivity during the progression of atherosclerotic plaque. A study of Wanatabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circ Res* 1990; 66:1112-1126.
- (65) Kuo L, Davis MJ, Cannon MS, et al. Pathophysiological consequences of atherosclerosis extend into the coronary microcirculation. *Circ Res* 1992; 70:465-476.

- (66) Sellke FW, Armstrong ML, Harrison DG. Endothelium dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerosis primates. *Circulation* 1990; 81:1586-1593.
- (67) Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager H, Just H. Endothelial dysfunction of coronary microvasculature is associated with impaired coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation* 1991; 84:1984-1992.
- (68) Fostermann U, Mugge A, Alheid U, et al. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilatation in atherosclerotic coronary arteries. *Circ Res* 1988; 62:185-190.
- (69) Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986; 315:1046-1051.
- (70) Collins P, Burman J, Chung HI, et al. Hemoglobin inhibits endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in human coronary arteries *in vivo*. *Circulation* 1993; 87:80-85.
- (71) Lefroy DC, Crake T, Uren NG, et al. Effect of inhibition of NO synthesis on epicardial coronary caliber and coronary blood flow in humans. *Circulation* 1993; 88:43-54.
- (72) Yeung AC, Vekshtein VI, Krantz DS, et al. Effect of atherosclerosis on the vasomotor response of coronary arteries to mental stress. *N Engl J Med* 1991; 325:1551-1556.
- (73) Mc Lenachan JM, Williams JK, Fish RD, et al. Loss of flow-mediated endothelium-dependent dilatation occurs early in the development of atherosclerosis. *Circulation* 1991; 84:1273-1278.

- (74) Reddy KG, Nair R, Sheehan HM, et al. Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patient with risk factors for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23:833-843.
- (75) Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, et al. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1990; 81:491-497.
- (76) Mc Lenachan JM, Vita JA, Fish RD, et al. Early evidence of endothelial vasodilator dysfunction at coronary branch points. *Circulation* 1990; 82:1169-1173.
- (77) Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, et al. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolemic patients by L-arginine. *Lancet* 1991; 338:1546-1550.
- (78) Craeger MA, Roddy M, Coleman SM, Dzau VJ. The effect of ACE inhibition on endothelium-dependent vasodilatation in hypertension. *J Vasc Res* 1992; 29:97-98.
- (79) Harrison DG. Alteration of vasomotor regulation in atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther* 1995; 9:55-63.
- (80) Shibano T, Codina J, Birnbaumer L, Vanhoutte PM. Pertussis toxin-sensitive G-proteins in regenerated endothelial cells after balloon denudation of porcine coronary artery. *Am J Physiol* 1994; 267:H979-H981.
- (81) Cox DA, Cohen ML. Effects of oxidized low-density lipoprotein on vascular contraction and relaxation : clinical and pharmacological implications in atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 1996; 48:3-19.

- (82) Vanhoutte PM, Scott-Burden T. The endothelium in health and disease. *Texas Heart Institute Journal* 1994; 21(1):62-67.
- (83) Vanhoutte PM, Shimokawa H. Endothelium-derived relaxing factor(s) and coronary vasospasm. *Circulation* 1989; 80(No 1):1-9.
- (84) Linder L, Kiowski W, Buhler FR, Luscher TF. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing : clinical and pharmacological implications in atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 1996; 48:3-19.
- (85) Kelm M, Preik M, Hafner DJ, Strauer BE. Evidence for a multifactorial process involved in the impaired flow response to nitric oxide in hypertensive patients with endothelial dysfunction. *Hypertension* 1996; 27:346-353.
- (86) Taddei S, Vordos A, Mattei P, et al. Vasodilatation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* 1993; 21:929-933.
- (87) Joannides R, Richard V, Haefeli WE, Linder L, Luscher TF. Role of basal and stimulated release of nitric oxide in the regulation of radial artery caliber in humans. *Hypertension* 1995; 26:327-331.
- (88) Calver A, Collier J, Moncada S, Vallance P. Effect of local intraarterial N^G-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension : the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. *J Hypertens* 1992; 10:1025-1031.
- (89) Panza J, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Impaired endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 1993; 87:1468-1474.

- (90) Lyons D, Webster J, Benjamin N. The effect of antihypertensive therapy on responsiveness to local intra-arterial N^G-monomethyl-L-arginine in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 1994; 12:1047-1057.
- (91) Luscher TF, Raij L, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl-rats. *Hypertension* 1987; 9:157-163.
- (92) Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertension Research-Clinical and Experimental* 1995; 18:87-98.
- (93) Sawada Y, Sakamaki Nakamura T, Sato K, Ono Z, Murata K. Release of nitric oxide in response to acetylcholine is unaltered in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1994; 12:745-750.
- (94) Luscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1986; 8:344-348.
- (95) Auch-Schewelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Nitric oxide inactivates endothelium-derived contracting factor in the rat aorta. *Hypertension* 1992; 19:442-445.
- (96) Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. The Netherlands: Harwood Academic Publishers, 1996.
- (97) Takase H, Moreau P, Kung CF, Nava E, Luscher TF. Antihypertensive therapy prevents endothelial dysfunction in chronic nitric oxide deficiency. Effect of verapamil and trandolapril. *Hypertension* 1996; 27(1):25-31.

- (98) Luscher TF, Vanhoutte PM. The endothelium : Modulator of cardiovascular function. Boca Raton: CRC Press, Inc, 1990: 1-228.
- (99) Ge T, Hughes H, Junquero DC, Wu KK, Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H2 in the SHR aorta. *Circ Res* 1995; 76(6):1003-1010.
- (100) Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Hypertens Suppl* 1996; 14(5):S83-S93.
- (101) Luscher TF, Vanhoutte PM. Dysfunction of the release of endothelium-derived relaxing factor in endothelial cell dysfunctions. In *Endothelial Cell Dysfunction*. Edited by Simionescu N, Simionescu M. New York: Plenum Publishing Corporation, 1992: 65-102.
- (102) Nakashima M, Vanhoutte PM. Age-dependent decrease in endothelium-dependent hyperpolarizations to endothelin-3 in the rat mesenteric artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22 Suppl 8:S352-S354.
- (103) Luscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent responses to platelets and serotonin in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1986; 8(6 Pt 2):II55-II60.
- (104) Sigmon DH, Beierwaltes WH. Endothelium-derived constricting factor in renovascular hypertension. *Hypertension* 1995; 25(4 Pt 2):803-808.

- (105) Tesfamariam B, Ogletree ML. Dissociation of endothelial cell dysfunction and blood pressure in SHR. *Am J Physiol* 1995; 269(1 Pt 2):H189-H194.
- (106) Alam MS, Ku K, Yamauchi M, Hashimoto M, Nosaka S, Hossain MS, Masumura S, Nakayama K, Tamura K. Protective effects of nicaraven, a new hydroxyl radical scavenger, on the endothelial dysfunction after exposure of pig coronary artery to hydroxyl radicals. *Mol Cell Biochem* 1998; 178(1-2):237-243.
- (107) Levesque MJ, Liepsch D, Moravec S, Nerem RM. Correlation of endothelial cell shape and wall shear stress in a stenosed dog aorta. *Arteriosclerosis* 1986; 6(2):220-229.
- (108) Marcus ML, Gascho JA, Mueller TM, et al. The effects of ventricular hypertrophy on the coronary circulation. *Basic Res Cardiol* 1981; 76:575-581.
- (109) Nishioka H, Kitamura S, Kameda Y, Taniguchi S, Kawata T, Mizuguchi K. Difference in acetylcholine-induced nitric oxide release of arterial and venous grafts in patients after coronary bypass operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 116(3):454-459.
- (110) Houghton JL, Davison CA, Kuhner PA, Torossov MT, Strogatz DS, Carr AA. Heterogeneous vasomotor responses of coronary conduit and resistance vessels in hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31(2):374-382.
- (111) Joris I, Zand T, Majno G. Hydrodynamic injury of the endothelium in acute aortic stenosis. *Am J Pathol* 1982; 106(3):394-408.

- (112) Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 1991; 83(2):652-660.
- (113) Hamasaki S, Al Suwaidi J, Higano ST, Miyauchi K, Holmes DR, Jr., Lerman A. Attenuated coronary flow reserve and vascular remodeling in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35(6):1654-1660.
- (114) Perticone F, Maio R, Ceravolo R, Cosco C, Cloro C, Mattioli PL. Relationship between left ventricular mass and endothelium-dependent vasodilation in never-treated hypertensive patients. *Circulation* 1999; 99(15):1991-1996.
- (115) Bishop SP, Powell PC, Hasebe N, Shen YT, Patrick TA, Hittinger L, Vatner SF. Coronary vascular morphology in pressure-overload left ventricular hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28(1):141-154.
- (116) Bartunek J, Dempsey S, Weinberg EO, Ito N, Tajima M, Rohrbach S, Lorell BH. Chronic L-arginine treatment increases cardiac cyclic guanosine 5'-monophosphate in rats with aortic stenosis: effects on left ventricular mass and beta-adrenergic contractile reserve. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32(2):528-535.
- (117) Huang A, Sun D, Koller A, Kaley G. 17beta-estradiol restores endothelial nitric oxide release to shear stress in arterioles of male hypertensive rats. *Circulation* 2000; 101(1):94-100.
- (118) Kaiser L, Spickard RC, Olivier NB. Heart failure depresses endothelium-dependent responses in canine femoral artery. *Am J Physiol* 1989; 256(4 Pt 2):H962-H967.

- (119) Vanhoutte PM. Endothelium-dependent responses in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28(11):2233-2240.
- (120) Buikema H, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ, de Smet BJ, Scholtens E, Lie KI, Wesseling H. Endothelium dependent relaxation in two different models of chronic heart failure and the effect of ibopamine. *Cardiovasc Res* 1993; 27(12):2118-2124.
- (121) Wang J, Seyedi N, Xu XB, Wolin MS, Hintze TH. Defective endothelium-mediated control of coronary circulation in conscious dogs after heart failure. *Am J Physiol* 1994; 266(2 Pt 2):H670-H680.
- (122) Ueno M, Kawashima S, Tsumoto S, Morita M, Iwasaki T. Impaired endothelium-dependent vasodilatory responses in hindlimb blood flow in dogs with congestive heart failure. *Jpn Circ J* 1994; 58(10):778-786.
- (123) Maguire SM, Nugent AG, McGurk C, Johnston GD, Nicholls DP. Abnormal vascular responses in human chronic cardiac failure are both endothelium dependent and endothelium independent. *Heart* 1998; 80(2):141-145.
- (124) Hirooka Y, Imaizumi T, Tagawa T, Shiramoto M, Endo T, Ando S, Takeshita A. Effects of L-arginine on impaired acetylcholine-induced and ischemic vasodilation of the forearm in patients with heart failure. *Circulation* 1994; 90(2):658-668.
- (125) Drexler H. Endothelial dysfunction in heart failure and potential for reversal by ACE inhibition. *Br Heart J* 1994; 72(3 Suppl):S11-S14.
- (126) Ramsey MW, Goodfellow J, Jones CJ, Luddington LA, Lewis MJ, Henderson AH. Endothelial control of arterial distensibility is impaired in chronic heart failure. *Circulation* 1995; 92(11):3212-3219.

- (127) Giannattasio C, Failla M, Stella ML, Mangoni AA, Carugo S, Pozzi M, Grassi G, Mancina G. Alterations of radial artery compliance in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1995; 76(5):381-385.
- (128) Stewart DJ. Endothelin in cardiopulmonary disease: factor paracrine vs neurohumoral. *Eur Heart J* 1993; 14 Suppl I:48-54.
- (129) Stevenson LW, Fonarow GC. Endothelin and the vascular choir in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20(4):854-857.
- (130) Katz SD, Schwarz M, Yuen J, LeJemtel TH. Impaired acetylcholine-mediated vasodilation in patients with congestive heart failure. Role of endothelium-derived vasodilating and vasoconstricting factors. *Circulation* 1993; 88(1):55-61.
- (131) Nakamura M, Ishikawa M, Funakoshi T, Hashimoto K, Chiba M, Hiramori K. Attenuated endothelium-dependent peripheral vasodilation and clinical characteristics in patients with chronic heart failure. *Am Heart J* 1994; 128(6 Pt 1):1164-1169.
- (132) Nakamura M, Funakoshi T, Arakawa N, Yoshida H, Makita S, Hiramori K. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on endothelium-dependent peripheral vasodilation in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24(5):1321-1327.
- (133) Kanai AJ, Strauss HC, Truskey GA, Crews AL, Grunfeld S, Malinski T. Shear stress induces ATP-independent transient nitric oxide release from vascular endothelial cells, measured directly with a porphyrinic microsensor. *Circ Res* 1995; 77(2):284-293.
- (134) Noris M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Foppolo M, Todeschini M, Orisio S, Remuzzi G, Remuzzi A. Nitric oxide synthesis by cultured

- endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res* 1995; 76(4):536-543.
- (135) Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990; 85(2):587-590.
- (136) Yeung AC, Anderson T, Meredith I, Uehata A, Ryan TJ, Jr., Selwyn AP, Mudge GH, Ganz P. Endothelial dysfunction in the development and detection of transplant coronary artery disease. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11(3 Pt 2):S69-S73.
- (137) Fulleton DA, Mitchell MB, McIntyre RC Jr, Brown JM, et al. Mechanisms of coronary vasomotor dysfunction in the transplanted heart. *Ann Thorac Surg* 1994; 58:86-92.
- (138) Gaudin PB, Rayburn BK, Hutchins GM, Kasper EK, Baughman KL, Goodman SN, Lecks LE, Baumgartner WA, Hruban RH. Peritransplant injury to the myocardium associated with the development of accelerated arteriosclerosis in heart transplant recipients. *Am J Surg Pathol* 1994; 18(4):338-346.
- (139) Veinot JP, Walley VM. Cardiac transplant arteriopathy. *Am J Surg Pathol* 1995; 19(6):727-730.
- (140) Gohra H, McDonald TO, Verrier ED, Aziz S. Endothelial loss and regeneration in a model of transplant arteriosclerosis. *Transplantation* 1995; 60(1):96-102.
- (141) Bossaller C, Forstermann U, Hertel R, Olbricht C, Reschke V, Fleck E. Cyclosporin A inhibits endothelium-dependent vasodilatation and vascular prostacyclin production. *Eur J Pharmacol* 1989; 165(1):165-169.

- (142) Galumbeck MA, Ratz PH. Functional integrity of vascular allografts after endothelial removal. *J Vasc Res* 1995; 32(2):120-128.
- (143) Sudhir K, MacGregor JS, DeMarco T, De Groot CJ, Taylor RN, Chou TM, Yock PG, Chatterjee K. Cyclosporine impairs release of endothelium-derived relaxing factors in epicardial and resistance coronary arteries. *Circulation* 1994; 90(6):3018-3023.
- (144) Kerber S, Rahmel A, Heinemann-Vechtel O, Budde T, Deng M, Scheld HH, Breithardt G. Angiographic, intravascular ultrasound and functional findings early after orthotopic heart transplantation. *Int J Cardiol* 1995; 49(2):119-129.
- (145) Davis SF, Yeung AC, Meredith IT, Charbonneau F, Ganz P, Selwyn AP, Anderson TJ. Early endothelial dysfunction predicts the development of transplant coronary artery disease at 1 year posttransplant. *Circulation* 1996; 93(3):457-462.
- (146) Mugge A, Heublein B, Kuhn M, Nolte C, Haverich A, Warnecke J, Forssmann WG, Lichtlen PR. Impaired coronary dilator responses to substance P and impaired flow-dependent dilator responses in heart transplant patients with graft vasculopathy. *J Am Coll Cardiol* 1993; 21(1):163-170.
- (147) Kushwaha SS, Bustami M, Lythall DA, Barbir M, Mitchell AG, Yacoub MH. Coronary endothelial function in cardiac transplant recipients with accelerated coronary disease. *Coron Artery Dis* 1994; 5(2):147-154.
- (148) Mudge GH, Jr., Yeung A, Selwyn AP, Ganz P. The role of endothelial dysfunction to predict the development of allograft coronary artery disease following cardiac transplantation. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1992; 103:105-110.

- (149) Kofoed KF, Czernin J, Kobashigawa, et al. Transplant vasculopathy by intravascular ultrasound (IVUS) is correlated with abnormal microcirculation and vasomotion by PET. *Circulation* 1995; 92(Suppl I):I-2449.
- (150) Kobashigawa JA, Miller L, Yeung A, Hauptman P, Ventura H, Wilensky R, Valantine H, Wiedermann J. Does acute rejection correlate with the development of transplant coronary artery disease? A multicenter study using intravascular ultrasound. Sandoz/CVIS Investigators. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14(6 Pt 2):S221-S226.
- (151) Donohue TJ, Drury JH, Wolford TL, et al. Intimal thickening does not affect coronary blood flow responses to endothelium-dependent or independent agents. *Circulation* 1995; 92(Suppl I):I-244.
- (152) Rickenbacher PR, Pinto FJ, Lewis NP, Hunt SA, Alderman EL, Schroeder JS, Stinson EB, Brown BW, Valantine HA. Prognostic importance of intimal thickness as measured by intracoronary ultrasound after cardiac transplantation. *Circulation* 1995; 92(12):3445-3452.
- (153) Caracciolo EA, Wolford TL, Underwood RD, Donohue TJ, Bach RG, Miller LW, Kern MJ. Influence of intimal thickening on coronary blood flow responses in orthotopic heart transplant recipients. A combined intravascular Doppler and ultrasound imaging study. *Circulation* 1995; 92(9 Suppl):II182-II190.
- (154) Sabata M, Manito N, Cequier A, et al. Acute rejection, cytomegalovirus infection and endothelial dysfunction early after heart transplantation. *Transplant Proceed* 1995; 27:2346-2348.

- (155) Hruban RH, Kasper EK, Gaudin PB, Baughman KL, Baumgartner WA, Reitz BA, Hutchins GM. Severe lymphocytic endothelialitis associated with coronary artery spasm in a heart transplant recipient. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11(1 Pt 1):42-47.
- (156) Bouchard D, Cartier R, Despatis MA, Carrier M, Leung TK. Receptor-specific effects of acute rejection after heart transplantation on endothelium-dependent coronary relaxation in dogs. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15(4):404-408.
- (157) Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest* 1992; 90(3):1168-1172.
- (158) Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, Luscher T, Rabelink T. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1997; 99(1):41-46.
- (159) Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* 2001; 85(3):342-350.
- (160) Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ, Hirsch AT, Creager MA. Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation* 1991; 83(3):1057-1062.
- (161) Girerd XJ, Hirsch AT, Cooke JP, Dzau VJ, Creager MA. L-arginine augments endothelium-dependent vasodilation in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 1990; 67(6):1301-1308.
- (162) van Hinsberg VMW. NO or H2O2 for endothelium-dependent vasorelaxation Tetrahydrobiopterin makes the difference. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:719-721.

- (163) Maier W, Consentino F, Lutolf RB, Fleisch M, Seiler C, Hess OM. Tetrahydrobiopterin improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35:173-178.
- (164) Solzbach U, Hornig B, Jeserich M, Just H. Vitamin C improves endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in hypertensive patients. *Circulation* 1997; 96(5):1513-1519.
- (165) Heller R, Unbehaun A, Schellenberg B, Mayer B, Werner-Felmayer G, Werner ER. L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 2001; 276(1):40-47.
- (166) Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997; 100(9):2153-2157.
- (167) Andrews NP, Prasad A, Quyyumi AA. N-acetylcysteine improves coronary and peripheral vascular function. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(1):117-123.
- (168) Creager MA, Roddy MA, Boles K, Stamler JS. N-acetylcysteine does not influence the activity of endothelium-derived relaxing factor in vivo. *Hypertension* 1997; 29(2):668-672.
- (169) Mancini GB. Long-term use of angiotensin-converting enzyme inhibitors to modify endothelial dysfunction : a review of clinical investigation. *Clin Invest Med* 2000; 23(2):144-161.
- (170) Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, Wargovich TJ, Mudra H, Luscher TF, Klibaner MI, Haber HE, Uprichard AC, Pepine CJ, Pitt B. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on

- Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation* 1996; 94(3):258-265.
- (171) Paul M, Zintz M, Bocker W, Dyer M. Characterization and functional analysis of the rat endothelin-1 promoter. *Hypertension* 1995; 25(4 Pt 2):683-693.
- (172) White M. Effets cardioprotecteurs des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II. *Can J Cardiol* 1999; 15(Suppl F):15F-19F.
- (173) Mombouli JV, Vanhoutte PM. Heterogeneity of endothelium-dependent vasodilator effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors: role of bradykinin generation during ACE inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20 Suppl 9:S74-S82.
- (174) Clozel M, Kuhn H, Hefti F. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and of hydralazine on endothelial function in hypertensive rats. *Hypertension* 1990; 16(5):532-540.
- (175) Linz W, Heitsch H, Scholkens BA, Wiemer G. Long-term angiotensin II type 1 receptor blockade with fonsartan doubles lifespan of hypertensive rats. *Hypertension* 2000; 35(4):908-913.
- (176) Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol* 1990; 259(2 Pt 2):H324-H332.
- (177) Dahlof B, Pennert K, Hansson L. Regression of left ventricular hypertrophy - a meta-analysis. *Clin Exp Hypertens A* 1992; 14(1-2):173-180.
- (178) Bruckschlegel G, Holmer SR, Jandeleit K, Grimm D, Muders F, Kromer EP, Riegger GA, Schunkert H. Blockade of the renin-

angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. *Hypertension* 1995; 25(2):250-259.

- (179) Mombouli JV, Nakashima M, Hamra M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization evoked by bradykinin in canine coronary arteries: enhancement by exercise-training. *Br J Pharmacol* 1996; 117(3):413-418.
- (180) Vanhoutte PM, Graser T, Luscher TF. Endothelium-derived contracting factor. In *Endothelin*. Edited by Rubanyi G. Oxford: Oxford University Press, 1992: 3-16.
- (181) Kahan T. The importance of left ventricular hypertrophy in human hypertension. *J Hypertens Suppl* 1998; 16(7):S23-S29.
- (182) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332(6163):411-415.
- (183) Luscher TF, Boulanger CM, Yang Z, Dohi Y. Intertaction between endothelin and endothelium-derived relaxing factor(s). In *Endothelin*. Edited by Rubanyi G. Oxford: Oxford University Press, 1992.
- (184) Massart PE, Donckier J, Kyselovic J, Godfraind T, Heyndrickx GR, Wibo M. Carvedilol and lacidipine prevent cardiac hypertrophy and endothelin-1 gene overexpression after aortic banding. *Hypertension* 1999; 34(6):1197-1201.
- (185) Najibi S, Cowan CL, Palacino JJ, et al. Enhanced role of potassium channels in relaxations to acetylcholine in hypercholesterolemic rabbit carotid arteries. *Am J Physiol* 1994; 226:H2061-H2067.

- (186) Guo X, Kedem J, Weiss H, et al. Effect of cyclic GMP reduction on regional myocardial mechanics and metabolism in experimental left ventricular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27:392-400.
- (187) Consentino F, Barker MP, Heales SJ, Werner ER, Tippins JR, West N, Channon KM, Volpe M, Luscher TF. Reactive oxygen species mediate endothelium-dependent relaxations in tetrahydrobiopterin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:496-502.
- (188) Hayakawa H, Raj L. The link among nitric oxide synthase activity, endothelial function, and aortic and ventricular hypertrophy in hypertension. *Hypertension* 1997; 29:235-241.
- (189) Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41(6 Pt 1):892-896.
- (190) Lurie KG, Billingham ME, Jamieson SW, Harrison DG, Reitz BA. Pathogenesis and prevention of graft arteriosclerosis in an experimental heart transplant model. *Transplantation* 1981; 31:41-47.
- (191) Perrault LP, Bidouard JP, Janiak P, Villeneuve N, Bruneval P, Vilaine JP, Vanhoutte PM. Time course of coronary endothelial dysfunction in acute untreated rejection after heterotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1997; 16:43-57.
- (192) Laight DW, Kaw AV, Carrier MJ, Anggard EE. Interaction between superoxide anion and nitric oxide in the regulation of vascular endothelial function. *Br J Pharmacol* 1998; 124(1):238-244.
- (193) Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Brasen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG,

- Bohm M, Meinertz T, Munzel T. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin- angiotensin system. *Circulation* 1999; 99(15):2027-2033.
- (194) Wang HD, Pagano PJ, Du Y, Cayatte AJ, Quinn MT, Brecher P, Cohen RA. Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. *Circ Res* 1998; 82(7):810-818.
- (195) Crow JP, Beckman JS. Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. *Adv Pharmacol* 1995; 34:17-43.
- (196) Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA, Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(16):9220-9225.
- (197) Shah AM. Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells. *Cardiovasc Res* 1996; 31:847-867.
- (198) Malo O, Desjardins N, Shi F, Tardif JC, Tanguay JF, Carrier M, Perrault LP. Endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries affects the left ventricular function in cardiac hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(Suppl A):275A.
- (199) van Son JA, Edwards WD, Danielson GK. Pathology of coronary arteries, myocardium, and great arteries in supravalvular aortic stenosis. Report of five cases with implications for surgical treatment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 108(1):21-28.
- (200) Carrier M, Gregoire J, Khalil A, Thai P, Latour JG, Solymoss BC, Pelletier LC. Myocardial distribution of cardioplegia administered by

antegrade and retrograde routes to ischemic myocardium. *Can J Surg* 1997; 40(2):108-113.

Appendices

Figure 4

Porcine epicardial coronary arteries after
2 months of aortic banding

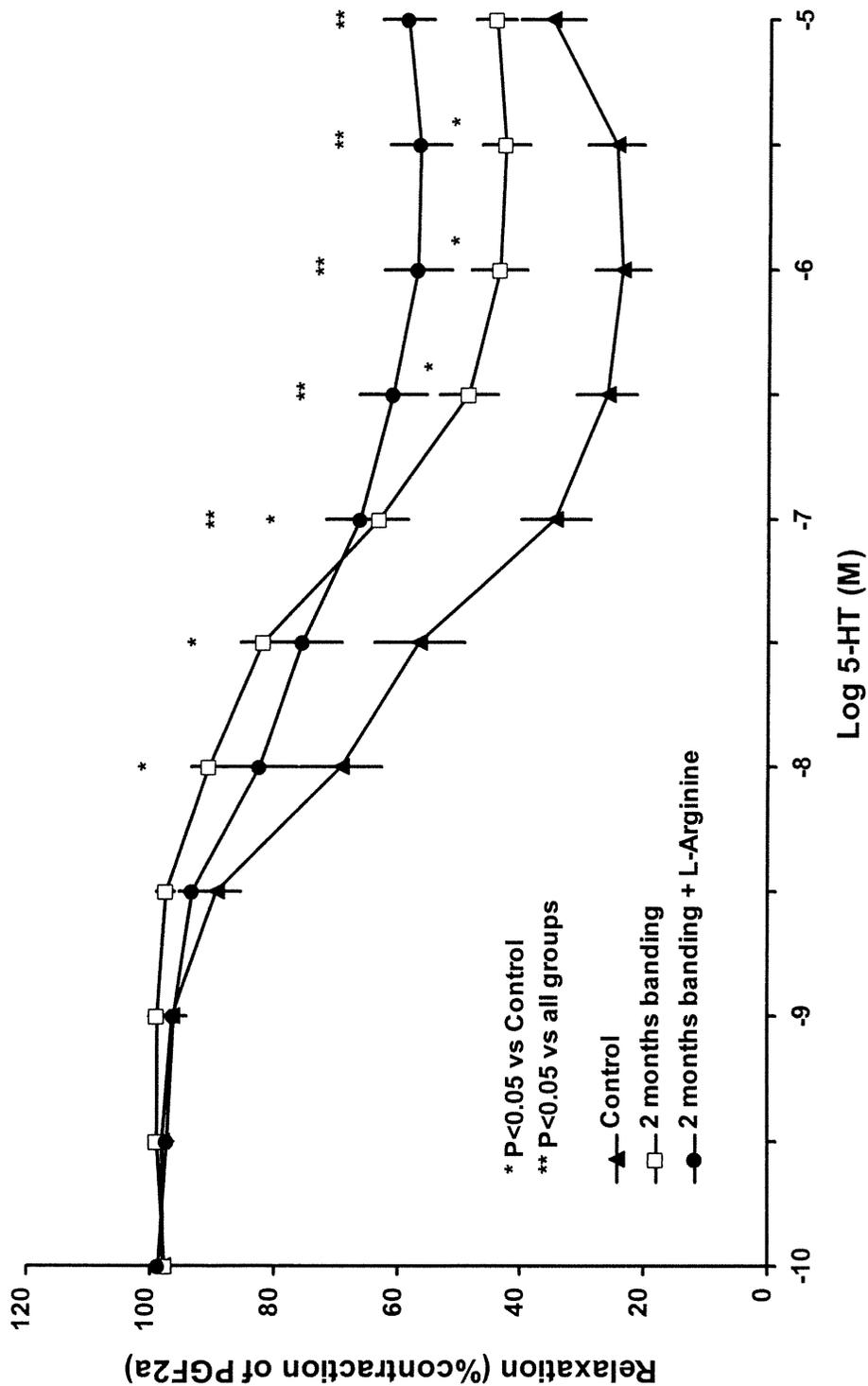


Figure 5

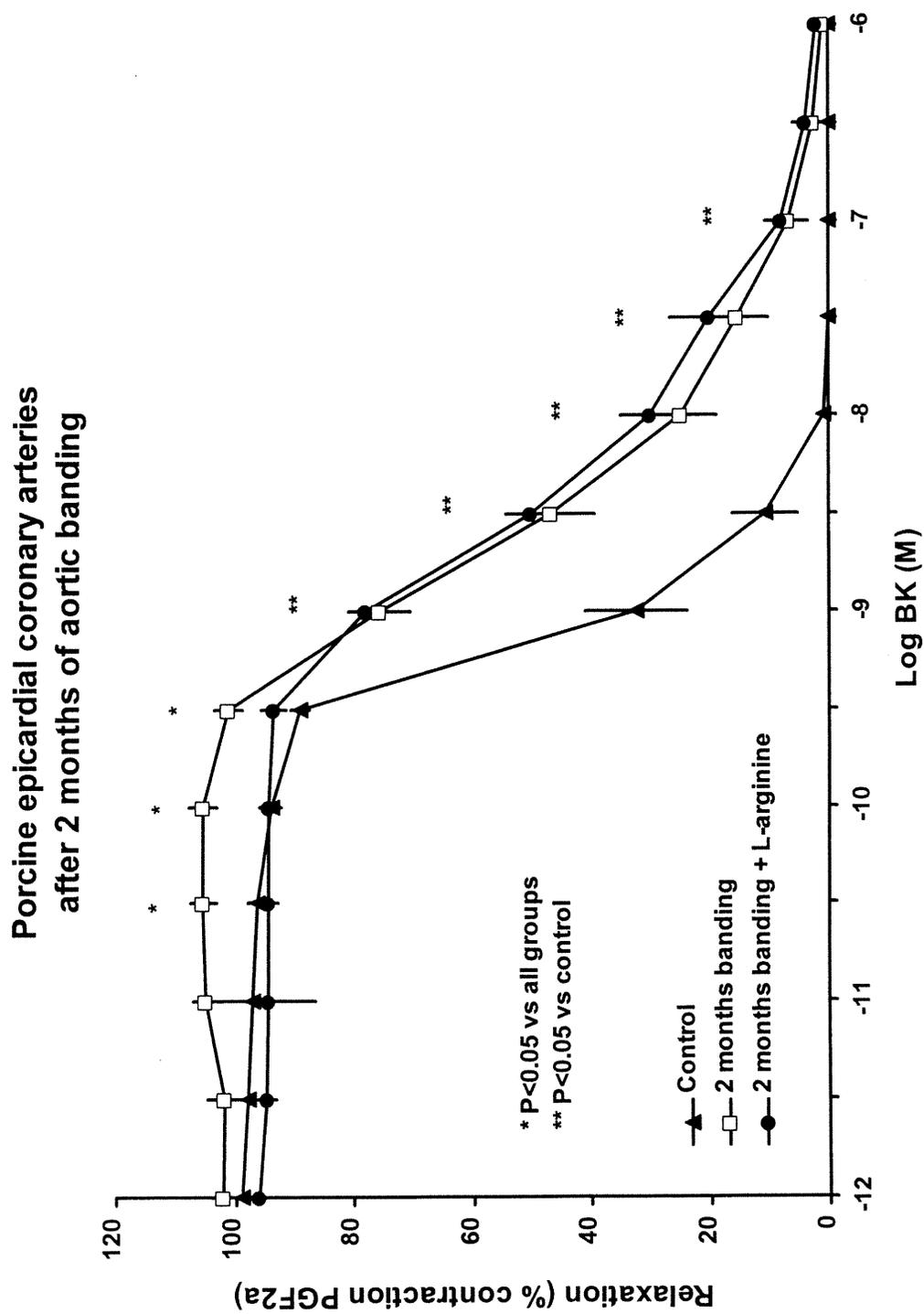


Figure 6

Porcine epicardial coronary arteries
after 2 months of aortic banding

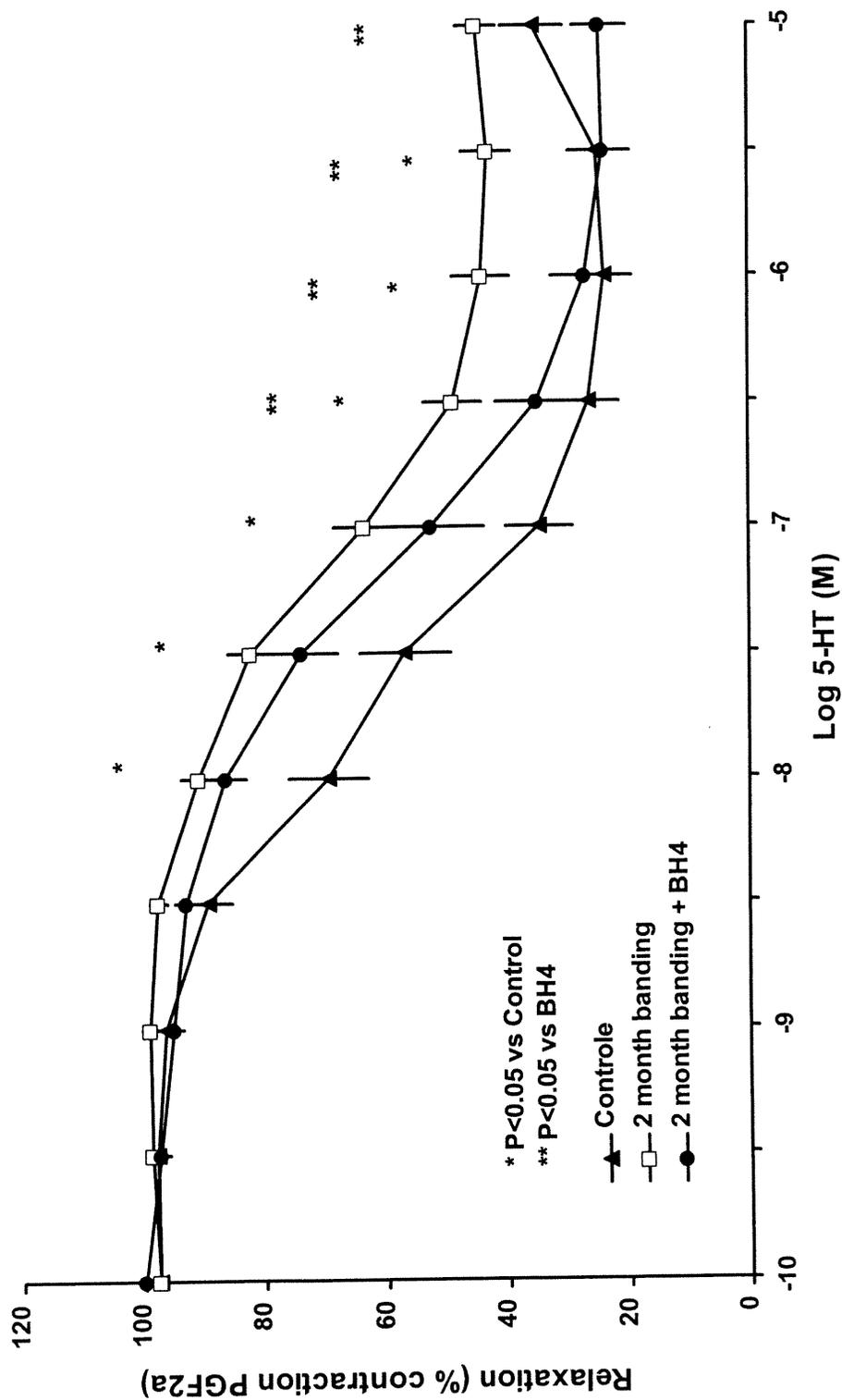
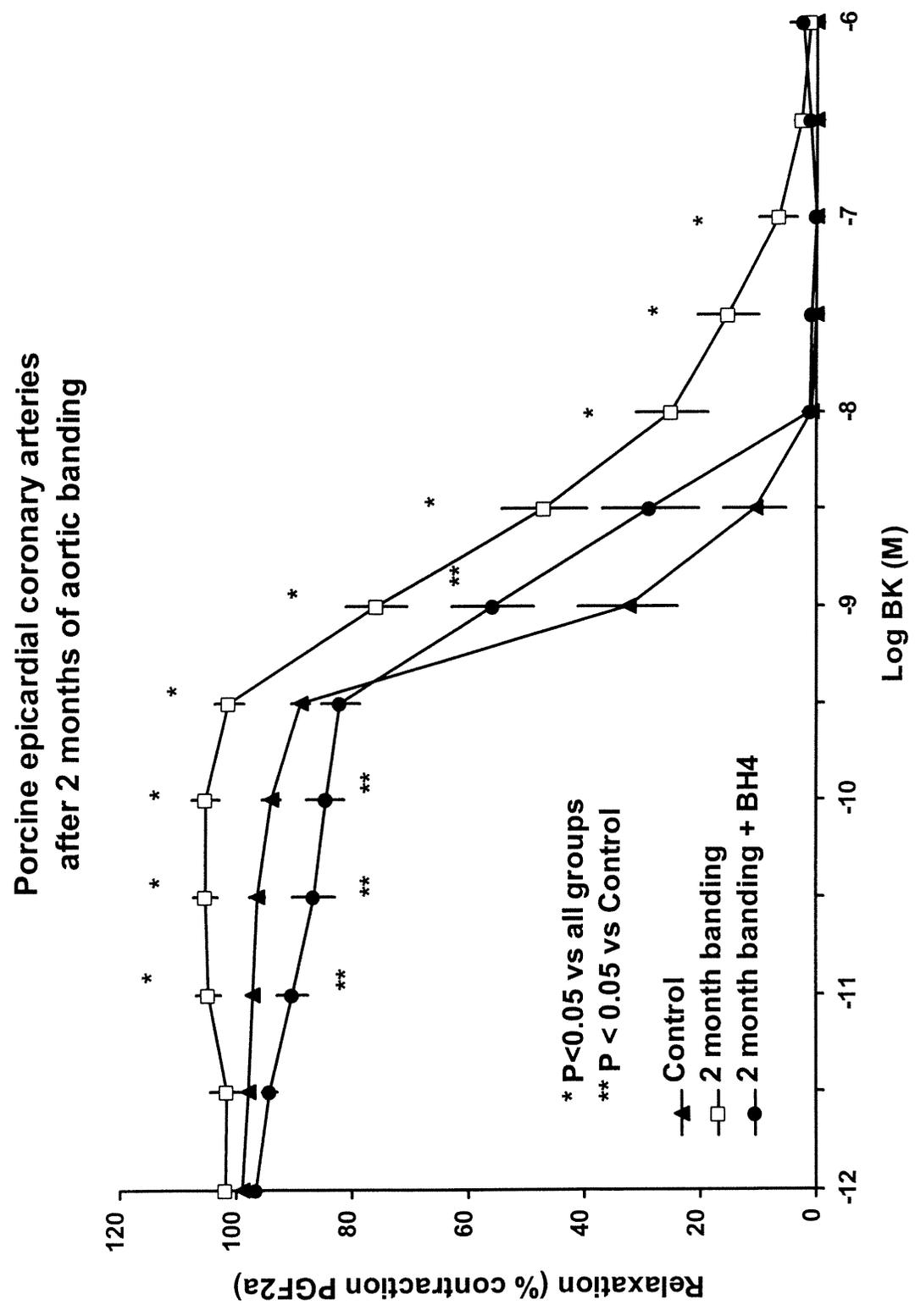


Figure 7



Distribution of intimal hyperplasia after 2 months of aortic banding in porcine coronary artery rings

Figure 8

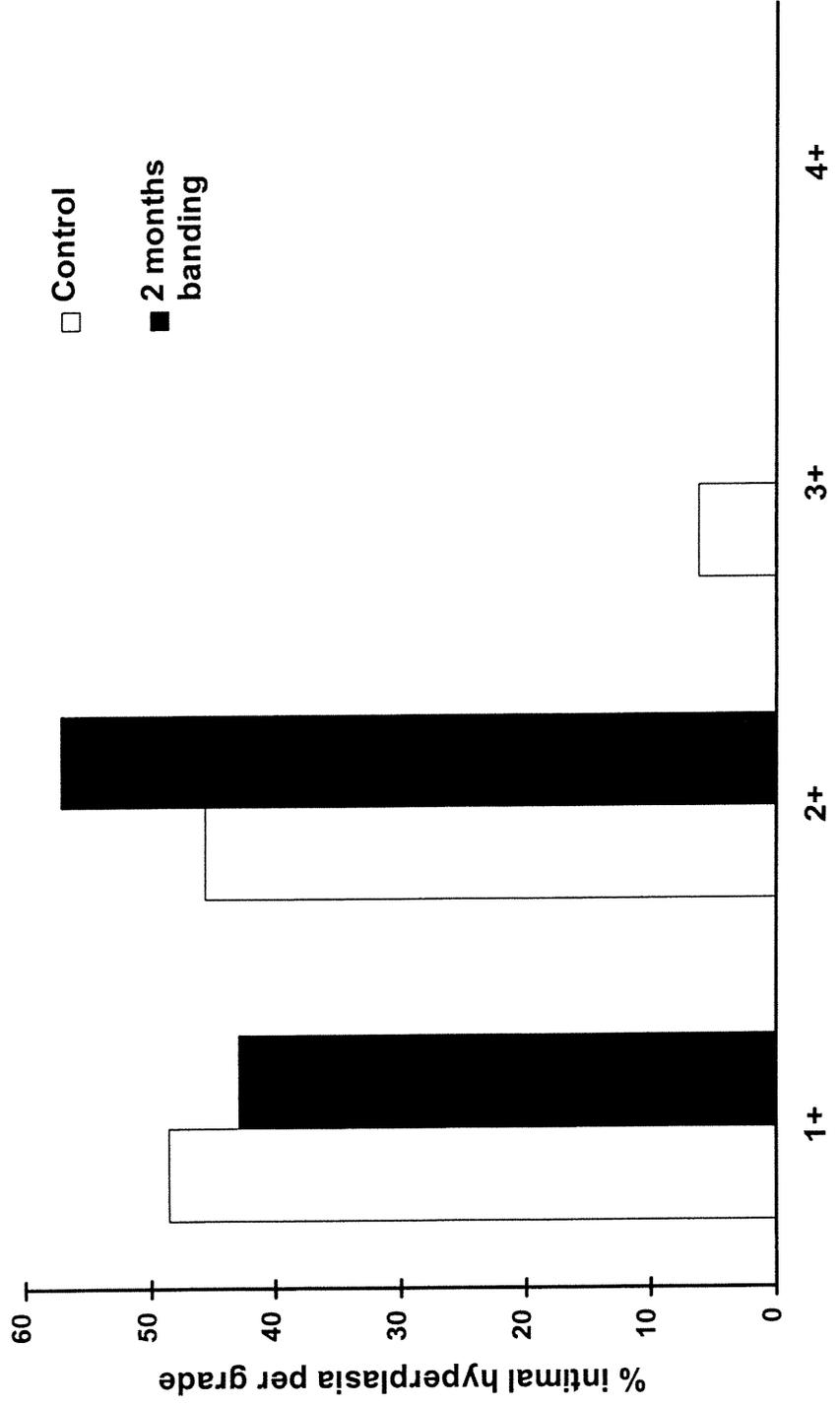


Figure 9

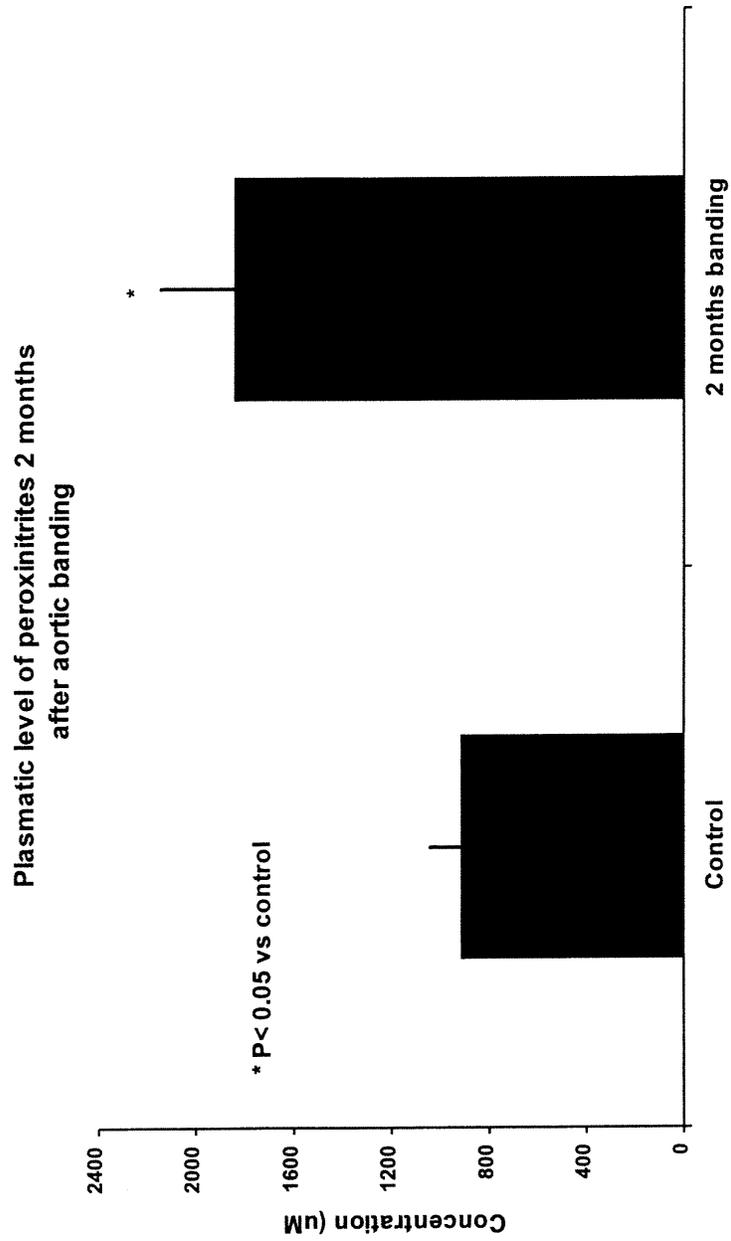


Figure 10

Porcine epicardial coronary arteries
after 2 months of aortic banding

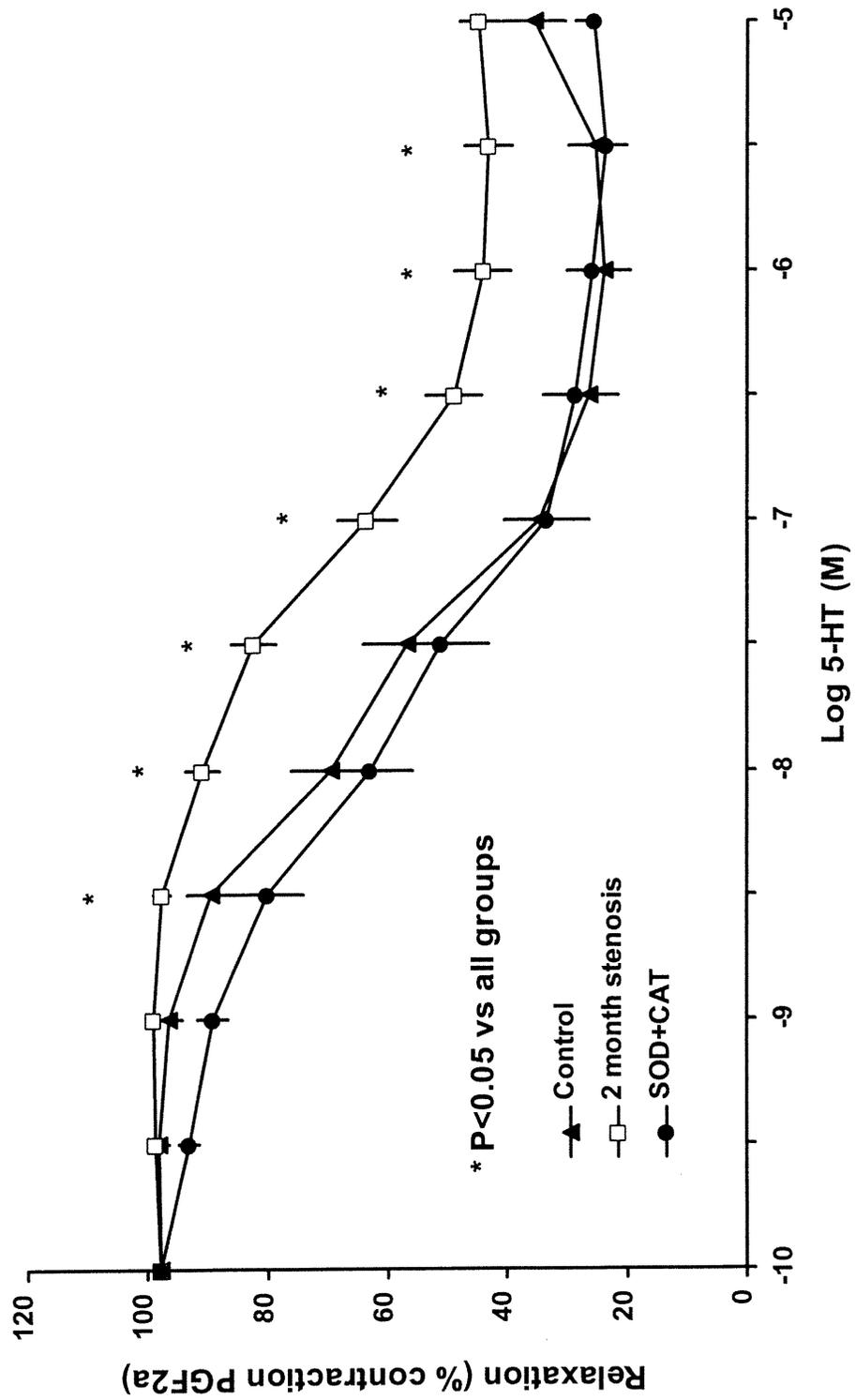


Figure 11

Porcine epicardial coronary arteries
after 2 months of aortic banding

