

2m11.2591.4

Université de Montréal

Propriétés vasoactives et inotropes de l'endothéline-1 dans un modèle de défaillance
cardiaque chronique.

par

Eric Fontaine

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

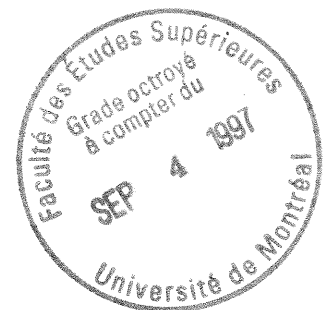
en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en pharmacologie

Avril 1997

© Eric Fontaine, 1997



11

4

058

1997

v.095

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Propriétés vasoactives et inotropes de l'endothéline-1 dans un modèle de défaillance
cardiaque chronique

présenté par:

Eric Fontaine

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Denis deBlois: Président du jury

Louis Dumont: Directeur de recherche

Patrick du Souich: Membre du jury

Mémoire accepté le: 30.07.97.....

SOMMAIRE

Le vieillissement de la population fait en sorte que la mortalité reliée aux maladies cardiovasculaires et en particulier à la défaillance cardiaque est de plus en plus élevée. Bien que l'atteinte de la perfusion coronarienne soit reconnue comme un facteur favorisant l'apparition des déficits contractiles de la défaillance cardiaque, les mécanismes impliqués dans les dysfonctions coronariennes ont été peu étudiés. La connaissance de ces mécanismes est primordiale pour l'élaboration d'une thérapeutique adéquate permettant de traiter la maladie et d'améliorer la qualité de vie de ces patients.

Des controverses existent quant à la contribution de la voie de l'endothéline-1 (ET-1) dans la défaillance cardiaque et son implication dans les déficits coronariens n'a pas été établie. Nous avons donc étudié l'action de l'ET-1 au niveau de la réactivité coronarienne et de la contractilité cardiaque dans un modèle d'insuffisance cardiaque chronique. Des coeurs de hamsters cardiomyopathiques (UM-X7.1) et des coeurs provenant de hamsters Syriens normaux âgés de plus de 200 jours ont été utilisés. Les coeurs ont été isolés et perfusés à débit constant (5-10 ml/min) selon la méthode de Langendorff. La pression de perfusion coronarienne (PPC), la pression ventriculaire gauche développée et la fréquence cardiaque furent évaluées.

Des courbes dose-réponse de la réactivité coronarienne à l'ET-1 ont été construites pour les coeurs normaux et défaillants. La sensibilité coronarienne à l'ET-1 est similaire pour les

deux groupes (EC_{50}) et la réponse maximale était identique. L'infusion du phosphoramidon, du BQ 788 (antagoniste des récepteurs ET_B) ou du BQ 123 (antagoniste des récepteurs ET_A) ne modifie pas la PPC. Ces observations suggèrent que l'ET-1 n'est pas impliquée dans l'expression des dysfonctions coronariennes observables dans ce modèle de défaillance cardiaque. L'infusion du BQ 788 ne modifie pas la réponse à l'ET-1 exogène suggérant une implication peu importante des récepteurs ET_B dans l'action vasoconstrictrice de l'ET-1. Par contre la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1 est complètement abolie par l'infusion du BQ 123 dans les coeurs normaux tandis que l'addition du BQ 788 est nécessaire pour abolir cette réponse dans les coeurs défailants. Ces observations suggèrent une implication de l'activation des récepteurs ET_B en présence d'un antagoniste des récepteurs ET_A ou encore un déséquilibre entre l'activation des récepteurs ET_B endothéliaux et musculaires lisses dans les coeurs défailants.

La diminution significative de la contractilité cardiaque observée avec l'utilisation du phosphoramidon et du BQ 123 révèle que l'ET-1 endogène participe au maintien de la contractilité cardiaque. Les récepteurs ET_A seraient impliqués dans l'action inotrope de l'ET-1 alors que les récepteurs ET_B ne semblent pas importants puisque l'infusion du BQ 788 n'a pas d'effet significatif sur la contractilité cardiaque.

Nous suggérons que l'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse de l'ET-1 ou d'un antagoniste des récepteurs ET_A pourrait comporter un risque pour des patients dont la fonction cardiaque est altérée. Il semble impératif de développer de nouveaux antagonistes de l'ET-1 qui soient vasosélectifs et de la sorte garantir un usage sécuritaire chez ces patients.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
REMERCIEMENTS	xi
INTRODUCTION	1
1.1 Défaillance cardiaque et vasoconstricteurs (noradrénaline, angiotensine II, vasopressine et ET-1)	2
<i>1.1.1 Incidence de la défaillance cardiaque dans notre société</i>	2
<i>1.1.2 Évolution de la maladie</i>	2
<i>1.1.3 Les systèmes nerveux sympathique et parasympathique</i>	4
<i>1.1.4 Le système rénine-angiotensine et la vasopressine</i>	5
1.2 L'endothéline	6
<i>1.2.1 Découverte de l'ET-1 (structure et synthèse)</i>	6
<i>1.2.2 Actions et mécanismes d'action de l'ET-1</i>	8
<i>1.2.3 Pathologies associées à l'action de l'ET-1</i>	11
<i>1.2.4 ET-1 circulante vs ET-1 locale</i>	12
<i>1.2.5 Action de l'ET-1 et lits vasculaires</i>	13

1.2.6 ET-1: un vasoconstricteur ou un vasodilatateur?	14
1.3 Défaillance cardiaque et dysfonctions coronariennes	15
1.3.1 Évidences de dysfonctions coronariennes dans la défaillance cardiaque	15
1.3.1.1 Évidences cliniques	15
1.3.1.2 Évidences expérimentales.....	16
1.3.1.3 Évidences chez le hamster cardiomyopathique	16
1.3.2 Rôle de l'endothélium.....	18
1.4 Projet de recherche	19
1.4.1 Hypothèse de recherche.....	19
1.4.2 Modèle et protocole expérimental	20
1.4.3 Importance du projet	21
ARTICLE (Effects of phosphoramidon, BQ 788 and BQ 123 on coronary and cardiac dysfunctions of the failing hamster heart).....	22
2.1 Abstract	24
2.2 Introduction	26
2.3 Materials and methods	28
2.4 Results	31
2.5 Discussion	34
2.6 References	42
DISCUSSION	62
3.1 Modèle expérimental	63
3.2 Modèle chronique vs aigu	64

3.3 Utilisation du coeur isolé, perfusé.....	65
3.4 Effets de l'ET-1, du phosphoramidon, du BQ 788 et du BQ 123.....	67
3.5 Portée clinique des résultats.....	70
BIBLIOGRAPHIE.....	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Localisation et action des sous-types de récepteurs de l'ET-1	10
Tableau 2 Baseline hemodynamic data in normal and failing hamster hearts (Table 1 du manuscrit).....	52
Tableau 3 Effects of exogenous ET-1 with and without BQ 788 and BQ 123 on left ventricular pressure (Table 2 du manuscrit).....	53
Tableau 4 Cardiac effects of phosphoramidon, BQ 788 and BQ 123 in normal and failing hamster hearts before exogenous administration of ET-1 (Table 3 du manuscrit).....	54

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Structure des endothélines et d'une sarafotoxine	7
Figure 2 Coeur isolé perfusé selon la méthode de Langendorff	20
Figure 3 Typical recording of the effects of exogenous ET-1 in an isolated normal hamster heart (Figure 1 du manuscrit).....	57
Figure 4 Effects of exogenous ET-1 on coronary perfusion pressure (CPP): dose-response curve in normal and failing hamsters hearts (Figure 2 du manuscrit)	58
Figure 5 Effects of phosphoramidon on basal coronary perfusion pressure (CPP) in normal and failing hamster hearts (Figure 3 du manuscrit)	59
Figure 6 Effects of the ET _B receptor antagonist, BQ 788, with and without exogenous ET-1 on coronary perfusion pressure (CPP) in normal and failing hamster hearts (Figure 4 du manuscrit).....	60
Figure 7 Effects of the ET _A receptor antagonist, BQ 123, with and without exogenous ET-1 on coronary perfusion pressure in normal and failing hamster hearts (Figure 5 du manuscrit).....	61

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α_1, α_2 :	récepteur alpha-1-adrénergique, alpha-2-adrénergique
ANF:	atrial natriuretic factor (facteur natriurétique de l'oreillette)
β_1, β_2 :	récepteur bêta-1-adrénergique, bêta-2-adrénergique
Big ET-1:	Big endothéline-1
EC ₅₀ :	concentration à laquelle on observe 50% de l'effet maximal
ECE:	enzyme de conversion de l'endothéline
ET-1, ET-2, ET-3:	endothéline-1, endothéline-2, endothéline-3
ET _A , ET _B , ET _C :	récepteur ET _A , ET _B , ET _C
g:	gramme
LVP:	left ventricular developed pressure (pression ventriculaire gauche développée)
μ M:	micromolaire
mg:	milligramme
ml:	millilitre
ml/min:	millilitre par minute
mM:	millimolaire
mmHg:	millimètre de mercure
nM:	nanomolaire
pM:	picomolaire
pmol:	picomole
PPC:	pression de perfusion coronarienne

REMERCIEMENTS

J'aimerais premièrement remercier le docteur Louis Dumont pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir confié ce projet de recherche. Je le remercie également pour l'assistance dans ma formation, la compréhension et la patience dont il a fait preuve et toutes ces heures qu'il m'a consacrées.

Je tiens aussi à remercier Elisabeth Pérès pour son aide en infographie.

Enfin, je voudrais également remercier Stéphanie Viau et Liem Ngo pour leur assistance technique et avoir été de bons amis tout comme Marc Véronneau, Diem Vu, Jean-François Boileau, Isabelle Lévesque, Nathalie Lapointe et France Paquette avec lesquels j'ai entretenu de bonnes relations au cours de ma formation.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Défaillance cardiaque et vasoconstricteurs (noradrénaline, angiotensine II, vasopressine et ET-1)

1.1.1 Incidence de la défaillance cardiaque dans notre société

Les maladies cardiovasculaires sont, avec le cancer, la principale cause de décès au Canada (Statistiques Canada 1997) et une des principales causes de mortalité dans les pays industrialisés; 400 000 nouveaux cas d'insuffisance cardiaque congestive sont diagnostiqués aux États-Unis chaque année (Sonnenblick et coll. 1991). Comme l'incidence de cette maladie augmente avec l'âge (Ducimetière et Richard 1990; Kannel et coll. 1988), le vieillissement des populations fait en sorte qu'elle est de plus en plus observée et qu'il est par conséquent, important de développer des thérapies permettant de traiter cette maladie ou d'améliorer le bien-être des personnes qui en sont atteintes.

1.1.2 Évolution de la maladie

L'insuffisance cardiaque se développe généralement sur une période de temps assez longue et elle est surtout d'origine hypertensive et/ou coronarienne (Swynghedauw 1990). Elle peut également être d'origine virale ou génétique. Elle survient, entre autre, suite à un infarctus. Le travail qu'effectuait la partie du coeur devenue inopérante à la suite de l'infarctus doit être pris en charge par le myocarde non-ischémique. On peut noter avec le temps une hypertrophie des cellules cardiaques de façon à compenser pour l'excès de

travail. Le ventricule gauche a pour responsabilité de pousser le sang dans tout l'organisme tandis que le ventricule droit irrigue les poumons. Lorsque le coeur n'est plus capable d'effectuer le travail nécessaire pour subvenir aux besoins de l'organisme, c'est à ce moment que la défaillance cardiaque se développe. La personne peut alors éprouver des problèmes circulatoires (oedème périphérique (accumulation d'eau dans les tissus), stase sanguine). La baisse de la fraction d'éjection, l'augmentation du tonus sympathique causant une vasoconstriction généralisée, et la stase sanguine, engendrée par la défaillance cardiaque, entraînent une réduction de la filtration glomérulaire et conséquemment, l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone. L'aldostérone entraîne la rétention de sodium et d'eau. L'augmentation subséquente du volume circulant produit une hausse de la pression hydrostatique et conduit à une extravasation de fluide dans l'espace interstitielle (Braunwald et coll. 1997; Sonnenblick et coll. 1991). La défaillance cardiaque du ventricule gauche entraîne une stase sanguine au niveau des poumons et produit de l'oedème pulmonaire, tandis que la défaillance cardiaque du ventricule droit produit une hépatomégalie, une ascite et de l'oedème périphérique (surtout des membres inférieurs). Le traitement indiqué consiste en l'administration de diurétiques, d'antagonistes du système sympathique et du système rénine-angiotensine-aldostérone (Braunwald et coll. 1997). Si le défaillant cardiaque éprouve des problèmes circulatoires, il peut s'en suivre une dysfonction des organes périphériques tel que les reins, les intestins, etc. (Sonnenblick et coll. 1991).

Avec l'ischémie et la nécrose myocardique, le volume diastolique a tendance à augmenter, ce qui conduit à l'augmentation de l'épaisseur de la paroi ventriculaire. Plus il y a une

élévation du volume sanguin en fin de diastole, plus s'accroît la baisse de la fraction d'éjection, ce qui résulte en une insuffisance cardiaque. L'importance de cette baisse de la fraction d'éjection est corrélée avec la mortalité (Sonnenblick et coll. 1991).

Avec les années, les recherches sur la défaillance cardiaque ont montré une plus grande concentration circulante de substances vasoconstrictrices (produisant un rétrécissement des vaisseaux) comme un mécanisme d'adaptation cardiovasculaire à cette situation. Parmi ces substances, il y a la noradrénaline, l'angiotensine II, la vasopressine et plus récemment l'ET-1.

1.1.3 Les systèmes nerveux sympathique et parasympathique

Les influences du système nerveux sur le cœur sont attribuables à deux composantes, soit le sympathique (stimulateur) et le parasympathique (inhibiteur). Il est reconnu qu'il y a une plus grande concentration de noradrénaline circulante pendant la défaillance cardiaque (Harding et Poole-Wilson 1991; Francis et coll. 1982). L'action de la noradrénaline a pour but de maintenir une bonne contractilité cardiaque et une pression artérielle adéquate. Ce système comprend quatre récepteurs adrénergiques, soit α_1 , α_2 , β_1 et β_2 . Les récepteurs α_1 sont localisés dans le cœur et les vaisseaux (Katzung 1995), tandis que les récepteurs α_2 sont localisés dans la pré-synapse de la terminaison nerveuse et servent de régulateurs de la relâche de noradrénaline (Rosendorff 1991; Minatoguchi et coll. 1995; Du et Riemersma 1992). Les récepteurs β_1 sont localisés au niveau cardiaque, soit le noeud sinusal, les ventricules et les oreillettes tandis que les récepteurs β_2 se retrouvent dans le noeud sinusal,

les oreillettes (Rosendorff 1991) ainsi qu'en périphérie (vaisseaux, bronches, etc.) (Katzung 1995). Le système sympathique augmente la fréquence et la contractilité cardiaque (Katzung 1995). Le système parasympathique comprend deux grandes familles de récepteurs, soit les récepteurs nicotiniques situés au niveau pré-ganglionnaire et les récepteurs muscariniques situés au niveau post-ganglionnaire (Rosendorff 1991). Il utilise l'acétylcholine pour neurotransmetteur. Son activation entraîne une diminution de la fréquence cardiaque et de la fonction contractile du coeur (Rosendorff 1991).

1.1.4 Le système rénine-angiotensine et la vasopressine

Le système rénine-angiotensine et la vasopressine, également appelée hormone antidiurétique, dont la relâche peut être facilitée par l'angiotensine II (Mercadier et Michel 1990; Forfar 1991), jouent un rôle important dans les mécanismes d'adaptation observés dans la défaillance cardiaque. Ces deux systèmes contribuent à maintenir la pression artérielle par une action vasoconstrictive ainsi que par la rétention d'eau et de sodium (Mercadier et Michel 1990; Riegger 1991; Cohn 1990). Ces deux mécanismes, couplés avec une plus grande concentration de noradrénaline circulante, accentuent la post-charge et provoquent une augmentation du stress sur la paroi ventriculaire gauche (Rosendorff 1991). De plus, la plus grande concentration de noradrénaline circulante entraîne une diminution du nombre de récepteurs β -adrénergiques sur les myocytes cardiaques (down-regulation) (Delehanty et coll. 1994; Forfar 1991) et de là, en une baisse de la contractilité cardiaque. Une action importante de l'angiotensine II est l'augmentation de la relâche de la noradrénaline par son effet au niveau pré-synaptique (Mercadier et Michel 1990;

Minatoguchi et Majewski 1994). Elle agit également au niveau cardiaque en haussant la fréquence cardiaque et la force de contraction du coeur (Mercadier et Michel 1990).

En résumé, la stimulation du système sympathique observée dans la défaillance cardiaque est une importante réponse compensatoire précoce. Avec l'évolution des symptômes, le nombre de récepteurs adrénergiques cardiaques diminue, le contenu myocardique en noradrénaline est réduit et la réponse du myocarde à une stimulation sympathique est limitée (Harding et Poole-Wilson 1991). Les systèmes rénine-angiotensine et vasopressine quant à eux maintiennent une pression artérielle adéquate tout en accroissant le travail cardiaque.

1.2 L'endothéline

1.2.1 Découverte de l'ET-1 (structure et synthèse)

La présence d'un facteur constricteur dérivé de l'endothélium (couche de cellules tapissant la paroi des vaisseaux) a été proposé par Hickey et ses collaborateurs (1985). Ce facteur fut isolé, séquencé et cloné en 1988 par Yanagisawa et ses collaborateurs (1988) qui le nomma endothéline. L'endothéline fait partie d'une famille de substances analogues, les endothélines ET-1, ET-2 et ET-3 ainsi que les sarafotoxines (substances provenant du venin d'un serpent, l'*Atractaspis engaddensis*) (Kloog et coll. 1989) et qui possèdent des structures similaires (Figure 1).

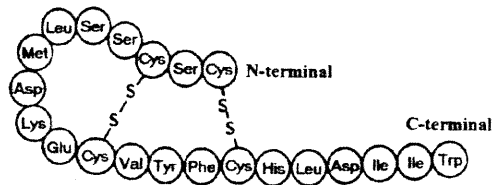
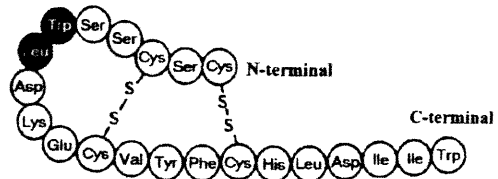
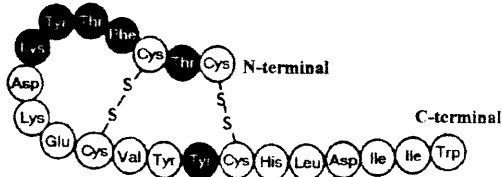
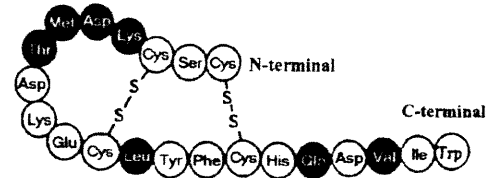
Endothéline-1**Endothéline-2****Endothéline-3****Sarafotoxine S6b**

Figure 1. Structure des endothélines et d'une sarafotoxine. Les cercles noirs indiquent les acides aminés qui diffèrent de ceux de l'ET-1. Figure tirée de l'article de La et Reid 1995.

Les endothélines ont été identifiées dans plusieurs espèces animales et chez l'homme. Un gène différent permet la synthèse de chacune des endothélines mais le procédé de synthèse est le même (Inoue et coll. 1989a; Inoue et coll. 1989b). Le gène codant pour l'ET-1 est situé sur le chromosome 6, celui d'ET-2 sur le chromosome 1 et celui d'ET-3 sur le chromosome 20. Pour ce qui est de l'ET-1, la synthèse débute avec une séquence d'ADN codant pour 212 acides aminés (l'acide aminé étant l'unité de base d'un peptide tel le maillon d'une chaîne), puis cette séquence est coupée par une enzyme pour donner une chaîne ne comportant plus que 38 acides aminés nommé Big ET-1 qui, à son tour, est coupée par une autre enzyme appelée enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) (Turner et coll. 1996), donnant un peptide final de 21 acides aminés. Ce peptide est la plus puissante substance vasoconstrictrice endogène connue. L'ET-1 présente une puissance vasoconstrictrice égale à ET-2, mais supérieure à son homologue ET-3, tandis que les trois

isoformes sont equipotentes pour l'effet vasodilatateur (Masaki et coll. 1994). Big ET-1 est 100 à 150 fois moins actif que ET-1 et il semble que sa conversion en ET-1 soit nécessaire pour obtenir une activité similaire à ET-1. Ainsi, l'inhibition de l'enzyme de conversion à l'aide du phosphoramidon inhibe l'effet vasoconstricteur de Big ET-1 (McMahon et coll. 1991). Chacune de ces substances est produite dans une multitude de tissus et organes mais les 3 isoformes ne sont pas nécessairement présentes dans les mêmes tissus. L'ET-1 est l'isoforme la plus étudiée.

1.2.2 Actions et mécanismes d'action de l'ET-1

L'ET-1 peut médier plusieurs actions. Elle est en premier lieu un facteur vasoconstricteur, mais elle a aussi des effets chronotropes positifs et négatifs et inotropes positifs, c'est-à-dire qu'elle augmente ou diminue la fréquence cardiaque (Ishikawa et coll. 1988b) et la force de contraction cardiaque (Ishikawa et coll. 1988a). Elle peut aussi produire des effets mitogènes (Weissberg et coll. 1990) et jouer un rôle endocrine et rénal (Miller et coll. 1989). Elle peut également stimuler la synthèse d'autres substances vasoactives telles le monoxyde d'azote, l'angiotensine II et la vasopressine (Toyo-oka et coll. 1991).

Les actions vasoactives de l'ET-1 sont principalement médiées par des récepteurs membranaires qui sont identifiés de la façon suivante: ET_A et ET_B (Masaki et coll. 1994) (Tableau 1). Récemment, un autre récepteur, ET_C, spécifique à ET-3 fut cloné chez un amphibien (Karne et coll. 1993), puis son homologue chez les mammifères a été récemment identifié (Douglas et coll. 1995). Les récepteurs ET_A et certains récepteurs ET_B

sont situés sur les cellules musculaires lisses (Warner et coll. 1993), la composante musculaire des vaisseaux sanguins, et leur activation induit une vasoconstriction en permettant l'entrée de calcium à l'intérieur de la cellule et/ou la sortie de calcium des réservoirs sarcoplasmiques par l'activation de la voie de l'inositol triphosphate (IP₃). D'autres récepteurs ET_B sont situés sur la surface membranaire des cellules endothéliales (Warner et coll. 1993) qui tapissent les vaisseaux et leur activation mène à une vasodilatation par la synthèse d'un vasodilatateur, le monoxyde d'azote (NO) (Warner et coll. 1989). Ce dernier stimule la synthèse de GMPc (guanosine monophosphate cyclique) qui va inhiber la phosphorylation de la kinase des chaînes légères de la myosine (van Riper et coll. 1997). Il en résulte donc une vasodilatation. Le rôle des récepteurs ET_B, au niveau endothélial, est donc d'empêcher une trop grande vasoconstriction produite par l'activation des récepteurs ET_A et ET_B situés sur le muscle lisse (Fukuroda et coll. 1994). L'effet chronotrope négatif de l'ET-1 serait lié à son action sur les récepteurs ET_A, situés au niveau des oreillettes et des fibres de conduction, tandis que son effet chronotrope positif serait médié par les récepteurs ET_B, situés également au niveau des oreillettes et des fibres de conduction, et relié à la voie de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) (Ono et coll. 1995). Par contre son effet inotrope serait lié à la liaison de l'ET-1 à ses récepteurs localisés sur les cardiocytes et fait intervenir la voie de l'IP₃ et du diacylglycérol (DAG) (Li et coll. 1991).

Tableau 1

Localisation et action des sous-types de récepteurs de l'ET-1

TYPES DE RÉCEPTEURS	VASCULAIRE	LOCALISATION	VASCULAIRES	CARDIAQUES	EFFETS	ANTAGONISTES SPÉCIFIQUES
ET_A	Cellules musculaires lisses	Ventricules, oreillettes et fibres de conduction	Vasoconstriction		Inotrope positif et chronotrope négatif	BQ 123
ET_B	Cellules musculaires lisses	Ventricules, oreillettes et fibres de conduction	Vasoconstriction		Chronotrope positif	BQ 788
ET_B	Cellules endothéliales		Vasodilatation			BQ788

1.2.3 Pathologies associées à l'action de l'ET-1

De plus en plus d'études fournissent des évidences de l'implication de l'ET-1 dans plusieurs pathologies cardiovasculaires. Kiowski et ses collaborateurs (1995) a démontré que l'ET-1 contribue au maintien du tonus vasculaire chez des patients atteints de défaillance cardiaque chronique. L'étude de Nakamura et ses collaborateurs (1993) rapporte une hausse de la concentration plasmatique d'ET-1 chez des patients souffrant de défaillance cardiaque accompagnée de congestion pulmonaire suite à un infarctus du myocarde, tandis que celle de Toyooka et ses collaborateurs (1991) montre que l'ET-1 peut prédisposer à l'induction de spasmes coronariens chez des patients souffrant d'angine de poitrine. Une augmentation d'ET-1 a également été rapportée chez des patients souffrant d'insuffisance rénale accompagnée d'hypertension et que l'ET-1 serait impliquée dans le développement ou le maintien de l'hypertension (Shichiri et coll. 1990). L'importance de son rôle dans l'hypertension demeure cependant controversée puisqu'il n'y a que peu d'éléments rapportés en faveur de l'activation de la voie de l'ET-1 dans l'hypertension essentielle humaine (Schiffrin 1996).

L'ET-1 exerce-t-elle un rôle dans la défaillance cardiaque et est-elle un promoteur de l'hypertrophie? Le rôle de l'ET-1 comme agent vasoactif est reconnu mais controversé. Ces controverses sont explicables par la variation des taux circulants observés dans la maladie, son action étant tributaire de la sensibilité du lit vasculaire étudié et finalement par la double fonction d'agent dilatateur et vasoconstricteur de l'ET-1.

1.2.4 ET-1 circulante vs ET-1 locale

Bien que des taux d'ET-1 circulante élevés aient été rapportés dans plusieurs modèles de défaillance cardiaque, certaines études contestent le rôle de l'ET-1 dans la défaillance cardiaque. De nombreuses observations indiquent que l'ET-1 est d'abord produite localement et que cette production est dirigée vers une action sur la couche musculaire lisse des vaisseaux et que seul le surplus d'ET-1 se retrouverait dans la circulation sanguine. Ainsi des études portant sur des préparations vasculaires isolées montrent que le taux d'ET-1 circulante est insuffisant pour produire un effet vasoactif significatif. Ainsi, la quantité d'ET-1 circulante rapportée dans la défaillance est inférieure à 25 pM alors que la quantité d'ET-1 nécessaire pour activer les récepteurs membranaires est de 50 pM à 1 nM et que la concentration nécessaire pour induire une contraction dans une préparation vasculaire isolée est de 0.1 à 50 nM (Frelin et Guedin 1994). Une deuxième explication à ces controverses serait que l'ET-1 est dégradée par une enzyme avant qu'elle ne se retrouve dans la circulation sanguine de sorte que, dans certains modèles, on ne la retrouve qu'à de faibles concentrations en circulation (La et Reid 1995). Une autre explication serait liée à une disparité d'effets entre l'ET-1 endogène et exogène. L'application topique d'ET-1 sur la musculature lisse des vaisseaux, mimant la production endogène d'ET-1, produit une vasoconstriction des artérioles, alors que l'administration intracoronarienne d'ET-1 produit une vasodilatation ou n'a pas d'effet significatif (Lamping et coll. 1992). Enfin on rapporte des différences entre les effets liées à des concentrations pharmacologiques en comparaison aux effets associés aux concentrations physiologiques de l'ET-1 (Frelin et Guedin 1994).

1.2.5 Action de l'ET-1 et lits vasculaires

Il existe également des controverses concernant les effets vasculaires de l'ET-1. L'ET-1 exerce des actions qui ne sont pas les mêmes d'un territoire vasculaire à l'autre. Ainsi l'action de l'ET-1 sur les artères coronariennes diffère de celle réalisée sur les veines, l'ET-1 induisant une vasoconstriction dans les artères mais n'ayant pas d'effet sur les veines coronariennes (Lamping et coll. 1992). Dans la composante artérielle, il existe aussi des différences de sensibilité qui dépendent du calibre des vaisseaux. Le degré de vasoconstriction étant inversement proportionnel au calibre des vaisseaux (Lamping et coll. 1992). De plus, l'ET-1, à des doses pathophysiologiques, induit une hausse de la résistance vasculaire rénale et systémique alors que la perfusion coronarienne n'est pas affectée (Lerman et coll. 1991). Ainsi l'effet de l'ET-1 sur un territoire vasculaire donné ne peut pas être extrapolé à d'autres territoires vasculaires. Enfin, la structure et la taille des vaisseaux est aussi un facteur responsable des variations des effets de l'ET-1 (Lamping et coll. 1992). La localisation du vaisseau peut également influencer l'action de l'ET-1; ainsi un segment proximal (près de l'aorte) de l'artère coronarienne descendante gauche ne répond pas de la même façon que son segment distal (segment pré-résistif) (Godfraind 1993). L'ET-1 étant dix fois plus puissante dans la région distale que dans la région proximale de cette artère.

1.2.6 ET-1: un vasoconstricteur ou un vasodilatateur?

Avec les progrès de la recherche portant sur l'ET-1, une autre controverse concernant l'action de l'ET-1 est apparue. Plusieurs études ont montré que l'ET-1 est un puissant vasoconstricteur (Yanagisawa et coll. 1988; Fukuda et coll. 1989; Haynes et coll. 1995). Cependant, des études récentes portant sur des organes isolés ainsi que des études *in vivo* montrent que l'ET-1 exerce aussi des effets vasodilatateurs (Lerman et coll. 1991; Traverse et coll. 1996). On rapporte que l'ET-1 à des concentrations pharmacologiques induit généralement une vasodilatation transitoire suivie d'une vasoconstriction soutenue. Cependant, à des concentrations physiologiques, l'ET-1 entraîne une vasodilatation ou assure le maintien du tonus basal; l'inhibition de sa synthèse est associée à une baisse du débit coronarien (Brunner 1995). L'utilisation d'antagonistes de ses récepteurs n'a pas clarifié la situation. Dans certaines études l'ET-1 ne semble pas avoir un rôle important à jouer dans le maintien de la pression artérielle (Sakai et coll. 1996; Shimoyama et coll. 1996) et du débit coronarien (Krause et coll. 1994; Wang QD et coll. 1994), alors que d'autres études suggèrent, à l'inverse, que l'inhibition de sa synthèse ou l'utilisation d'antagonistes des récepteurs ET_A modifient de façon significative la pression artérielle (Kiowski et coll. 1995; Haynes et Webb 1994). Il semble que l'ET-1 exerce une action complexe. Son rôle dans l'expression des dysfonctions coronariennes associées à la défaillance cardiaque demeure inconnu.

1.3 Défaillance cardiaque et dysfonctions coronariennes

1.3.1 Évidences de dysfonctions coronariennes dans la défaillance cardiaque.

1.3.1.1 Évidences cliniques

Les dysfonctions coronariennes sont un facteur important dans l'évolution de la défaillance cardiaque puisqu'un bon apport en oxygène est primordial au bon fonctionnement des cellules du myocarde. Il existe des évidences cliniques de la manifestation de telles dysfonctions. Ainsi, une des causes de ces dysfonctions chez l'homme est l'hypertrophie myocardique liée à une pathologie vasculaire, et dans ce cas, la prolifération des coronaires ne se fait plus adéquatement. Des zones du myocarde sont donc sous-vascularisées (augmentation de la distance de diffusion intercapillaire), ce qui altère la perfusion du myocarde et conduit à la défaillance cardiaque (Nitenberg et Foulst 1990). Une diminution du débit coronarien a également été rapportée chez des patients souffrant d'une cardiomyopathie bien qu'ils aient des artères coronariennes normales (Pasternac et coll. 1982).

Chez des patients atteints d'une cardiomyopathie congestive non-ischémique, un débit coronarien sous-endocardique insuffisant, diminue la contribution de cette région au travail cardiaque (Unverferth et coll. 1983; Weiss et coll. 1976).

Chez des patients souffrant d'une cardiomyopathie dilatée, on a rapporté que la réserve coronarienne est diminuée et que la sensibilité aux effets d'un vasoconstricteur (ergonovine) est augmentée, suggérant une microcirculation coronarienne inadéquate (Cannon et coll. 1987).

1.3.1.2 Évidences expérimentales

Quelques études ont rapporté des évidences de dysfonctions coronariennes chez le chien. Dans un modèle expérimental de défaillance cardiaque obtenu à l'aide d'une surcharge de pression et d'une dérivation artério-veineuse, la perfusion coronarienne basale est altérée, de même que la réponse hyperémique réactive (Vatner 1988).

1.3.1.3 Évidences chez le hamster cardiomyopathique

Le hamster cardiomyopathique UM-X7.1 présente des dysfonctions coronariennes dans la phase de défaillance cardiaque. Une perfusion coronarienne basale altérée a été rapportée dans de nombreuses études (Camacho et coll. 1988; Buser et coll. 1989; Stefenelli et coll. 1989; Buser et coll. 1990; Wikman-Coffelt et coll. 1991; Haleen et coll. 1991; Tanguay et coll. 1996; Véronneau et coll. 1997). Une altération similaire de la perfusion coronarienne basale est rapportée dans la présente étude. Les coeurs défaillants montraient des débits coronariens plus faibles (5.0 ± 0.2 vs 6.8 ± 0.3 ml/min) et des PPC plus élevées que les coeurs normaux (111.0 ± 2.6 vs 95.6 ± 3.1 mmHg), confirmant la présence de dysfonctions coronariennes chez ce groupe.

De plus, de nombreuses évidences indiquent que la réponse des artères coronariennes à des substances vasoactives est altérée dans ce modèle de défaillance cardiaque chronique. Premièrement, chez des hamsters cardiomyopathiques dans une phase de défaillance cardiaque avancée, l'administration d'agents inotropes positifs tels l'amrinone, le dibutytyl cAMP, le Bay K 8644, la digoxine et l'isoprotérénol, a résultée en une augmentation significative de la pression ventriculaire gauche développée et de la consommation d'oxygène sans changement significatif de la perfusion coronarienne (Hano and Lakatta 1991; Buser et coll. 1995). Deuxièmement, Conway et coll. (1994) ont observé, dans des artères coronariennes isolées provenant de hamsters cardiomyopathiques, une réponse vasoconstrictrice accrue en présence d'arginine-vasopressine comparativement à celle observée dans des artères coronariennes provenant de hamsters normaux du même âge. Troisièmement, dans des préparations de coeurs isolés provenant de hamsters cardiomyopathiques dans une phase de défaillance cardiaque avancée, il a été rapporté que la sensibilité coronarienne au diltiazem était atténuée significativement (Tanguay et coll. 1995; Tanguay et coll. 1996). Cette baisse de sensibilité coronarienne au diltiazem observée dans des coeurs défailants semble être liée à la production et/ou la relâche d'un facteur vasoconstricteur originant de la voie de signalisation de la cyclooxygénase. Plus récemment, nous avons rapporté que la dilatation coronarienne en présence d'acétylcholine était augmentée dans des coeurs défailants comparés à des coeurs normaux. Cette dernière observation nous permet de conclure que cette régulation à la hausse compense pour l'état vasoconstrictif coronarien associé à cette maladie (Véronneau et coll. 1997).

Nous pensons que ces observations suggèrent fortement la présence de dysfonctions coronariennes dans ce modèle de défaillance cardiaque chronique. Cette augmentation du tonus vasculaire coronarien pourrait s'expliquer par une sensibilité accrue aux vasoconstricteurs endogènes.

1.3.2 Rôle de l'endothélium

Il est maintenant reconnu que l'endothélium est important pour le maintien du tonus vasculaire. Ainsi l'endothélium est responsable de la synthèse de facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs tels le NO, la prostacycline et l'ET-1. Comme il a été démontré qu'il existe un déficit de perfusion coronarienne dans la défaillance cardiaque (Wang J et coll. 1994; Lüscher et Noll 1994), les premières hypothèses soulevées furent celles d'un endothélium dysfonctionnel se traduisant par une baisse de la production de vasodilatateurs endothéliaux. Cependant, le territoire coronarien, plus que tout autre territoire vasculaire, semble avoir une capacité d'adaptation aux conditions pathologiques favorisant une vasoconstriction. Il a été observé que la production de vasodilatateurs est maintenue voir même amplifiée au niveau de l'endothélium du territoire coronarien en présence de défaillance cardiaque (Larosa et coll. 1994; O'Murchu et coll. 1994). On a aussi émis l'hypothèse d'une désensibilisation du muscle vasculaire lisse coronarien aux vasodilatateurs, mais l'utilisation de vasodilatateurs endothélium-indépendant a montré que cette réponse était maintenue dans la défaillance cardiaque expérimentale (Véronneau et coll. 1997).

De plus en plus, les hypothèses pour expliquer les dysfonctions coronariennes associées à la défaillance cardiaque favorisent les anomalies reliées à la production et/ou l'action de substances vasoconstrictrices. Par exemple, une plus grande concentration de noradrénaline (Minatoguchi et coll. 1995) ou de vasopressine (Hirsch et coll. 1987) serait un stimulant direct des vaisseaux coronariens. L'ET-1 pourrait tout aussi bien être impliquée dans les dysfonctions coronariennes puisqu'on a rapporté des concentrations plus élevées d'ET-1 dans la circulation systémique et dans le myocarde en présence d'insuffisance cardiaque (Kiowski et coll. 1995; Cody et coll. 1992; Colucci 1996).

1.4 Projet de recherche

1.4.1 Hypothèse de recherche

La composante vasculaire coronarienne nous apparaît être d'une grande importance dans la défaillance cardiaque. Ainsi, sans amélioration de la perfusion coronarienne, il n'y a pas d'amélioration de la contractilité. Des dysfonctions coronariennes ayant été rapportées dans la défaillance cardiaque, notre hypothèse est que l'ET-1 serait impliquée dans l'expression de ces dysfonctions.

1.4.2 Modèle et protocole expérimental

Le modèle de défaillance cardiaque utilisé est celui du hamster cardiomyopathique UM-X7.1 âgé de plus de 200 jours. La méthode du coeur isolé perfusé (Figure 2) a été privilégiée puisqu'elle nous permet d'éliminer les effets périphériques et neurohormonaux des substances vasoactives circulantes.

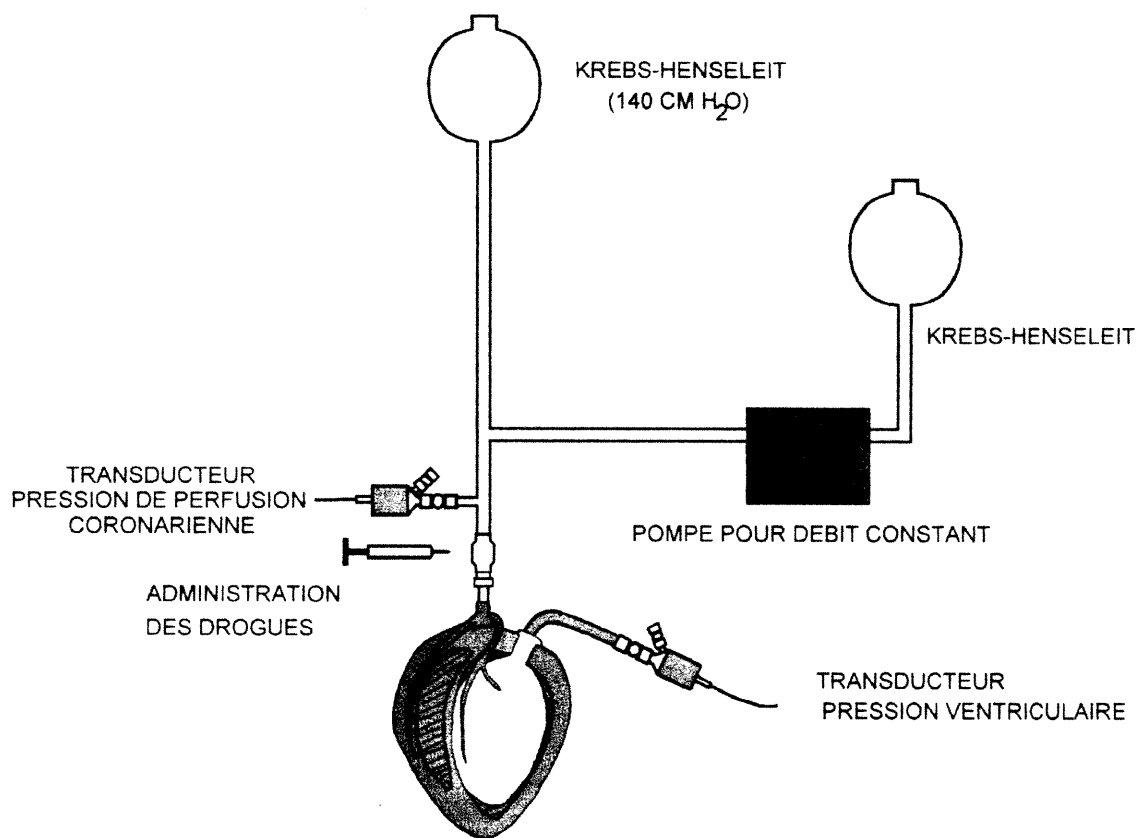


Figure 2. Coeur isolé perfusé selon la méthode de Langendorff.

Nous avons étudié la contribution de la composante endogène de la voie de l'ET-1 en utilisant un inhibiteur de sa synthèse (phosphoramidon) et des antagonistes des récepteurs

ET_A (BQ 123) et ET_B (BQ 788). Le phosphoramidon inhibe la conversion de Big ET-1 en ET-1 par ECE (McMahon et coll. 1991; Turner et Murphy 1996). Son utilisation permet d'éliminer la formation d'ET-1 par la voie endogène et d'évaluer la contribution de la voie de l'ET-1 endogène dans l'expression des dysfonctions coronariennes associées à la défaillance cardiaque. Le phosphoramidon n'est cependant pas spécifique à l'ECE. Il peut également interagir avec l'endopeptidase neutre (NEP). C'est ce qui nous amène à suggérer dans l'article qu'une partie de la diminution de la LVP, en présence du phosphoramidon, serait attribuable à l'inhibition de la dégradation de l'ANF par la NEP (l'ANF est considéré comme un agent inotrope négatif). L'administration d'ET-1 nous a permis d'évaluer la composante exogène. Les protocoles utilisés nous permettent de procéder à des analyses de la courbe dose-réponse coronarienne à l'ET-1 et de déterminer l'importance de l'activation des récepteurs ET_A et ET_B.

1.4.3 Importance du projet

L'importance du projet émane du fait qu'il ne peut y avoir une amélioration de la contractilité chez un insuffisant cardiaque sans amélioration significative de la perfusion coronarienne. Il est donc primordial de comprendre le rôle de l'ET-1 comme modulateur du tonus vasculaire coronarien, d'établir sa contribution dans les dysfonctions coronariennes associées à la défaillance cardiaque chronique et d'évaluer le profil thérapeutique des inhibiteurs de synthèse et des antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B dans cette condition pathologique.

CHAPITRE 2

ARTICLE

**Effects of phosphoramidon, BQ 788 and BQ 123 on coronary and cardiac dysfunctions
of the failing hamster heart**

Eric Fontaine, Stéphanie Viau, Gaëtan Jasmin and Louis Dumont

**Départements de pharmacologie et de pathologie, Faculté de médecine, Université de
Montréal, Montréal, Québec, Canada.**

soumis à *Journal of Cardiovascular Pharmacology* (mars 1997)

2.1 Abstract

Coronary dysfunctions identified in the presence of chronic heart failure represent an important pathophysiological abnormality that influences the prognosis of the disease. Since the endothelin pathway plays a significant role in the increased peripheral vascular tone associated with heart failure, we hypothesized that the endothelin pathway may be involved in the abnormal coronary vasomotion associated with this pathological condition. Experiments were carried out in failing hearts (UM-X7.1 cardiomyopathic hamsters, aged 225-250 days) and normal hearts (Syrian LVG hamsters, also aged 225-250 days). Isolated hearts were perfused at constant flow and exposed to the blocker of the generation of endothelin-1 (ET-1), phosphoramidon, (10 μ M infusion) as well as to the selective ET_A receptor antagonist BQ 123 (1 μ M infusion) and to a selective ET_B receptor antagonist BQ 788 (1 μ M infusion). Coronary and cardiac effects of exogenous ET-1 (0.01 - 100 pmol) were also studied. Phosphoramidon, BQ 788 or BQ 123 did not alter coronary perfusion pressure either in normal or in failing hearts while cardiac contractility was significantly impaired in the presence of phosphoramidon and BQ 123. Coronary sensitivity to exogenous ET-1 did not demonstrate significant difference between normal and failing hearts (EC_{50} = 7 pmol in failing hearts vs 12 pmol in normal hearts, p = NS). In the presence of exogenous ET-1, cardiac contractility was significantly increased in both groups. In normal hearts, the exogenous ET-1-induced increase in coronary perfusion pressure was completely antagonized by BQ 123 while combined administration of BQ 788 and BQ 123 was necessary to induce complete inhibition in failing hearts. The positive inotropic effect elicited by exogenous ET-1 (EC_{50}) was completely abolished in the

presence of BQ 123 while BQ 788 had no significant effect. Results indicate that the endothelin pathway does not play a significant role in the altered coronary vasomotion observed in this model of chronic heart failure. On the contrary, the endothelin pathway appears to participate in the maintenance of myocardial contractility. According to these observations, administration of an inhibitor of ET-1 synthesis, as well as the use of an ET_A receptor antagonist may be contraindicated in the presence of poor left ventricular function since the endothelin pathway contributes significantly to the maintenance of cardiac contractility.

Index terms: coronary flow; contractility; endothelin; phosphoramidon; BQ 788; BQ 123.

2.2 Introduction

Several studies suggest that regulation of coronary vasomotion is abnormal in the presence of chronic heart failure. Reduced basal coronary perfusion along with coronary vasospasm has been noted in patients with chronic heart failure (1-2). Furthermore, dynamic functional abnormalities of the coronary microvasculature has been reported in patients with poor left ventricular function (3-4). Similarly, in experimental models of heart failure, reduction of basal coronary perfusion has been observed (5-6) and reports of a reduced myocardial endo/epi blood flow ratio suggest compromised subendocardial coronary supply in this condition (7-8). Although coronary dysfunctions represent an important pathophysiological abnormality that may modify clinical manifestations and the prognosis of chronic heart failure, the underlying mechanisms are not fully elucidated. Knowledge of these mechanisms is important for the development of therapeutic approaches to improve this pathological condition.

Apart from an increased activation of the sympathetic nervous system, an augmented renin-angiotensin system and elevated circulating concentrations of arginine vasopressin, several lines of evidence indicate that the endothelin pathway may play a significant role in the increased vascular tone associated with chronic heart failure. Circulating and myocardial levels of ET-1 have been shown to be elevated in this condition (9-11) and an increase of the myocardial endothelin receptor population has also been observed with heart failure (12). Furthermore, ET-1 has been shown to participate in the maintenance of myocardial contractility in this condition (13-14). Although exogenous ET-1 exerts significant

coronary vasoconstriction in normal hearts (15-16) as well as in diseased hearts (17-18), the role of endogenous ET-1 in the expression of coronary dysfunctions associated with chronic heart failure remains to be determined.

Since the endothelin pathway is involved in the increased peripheral vascular tone observed in heart failure, we hypothesized that it may participate in the abnormal coronary vasomotion associated with this condition. Isolated normal and failing hamster hearts (UM-X7.1 cardiomyopathic hamsters, aged 225-250 days) were used to determine the contribution of the endothelin pathway to the coronary dysfunctions present in this model of chronic heart failure. Phosphoramidon (endothelin converting enzyme inhibition), BQ 788 (ET_B receptor blockade) and BQ 123 (ET_A receptor blockade) were used to assess the contribution of endogenous generation of ET-1 as well as activation of ET_A and ET_B receptors. In addition, the coronary and cardiac actions of exogenous ET-1, with or without the presence of ET_A and ET_B receptor antagonists, were studied in normal and failing hamster hearts.

2.3 Materials and methods

Experimental model. Thirty cardiomyopathic Syrian hamsters (UM-X7.1 line) aged 226 ± 4 days and 31 normal Syrian LVG hamsters (Charles River, St-Constant, Qc, Canada) aged 236 ± 7 days were used in this study. All animals were treated in accordance with the guidelines on the care and use of experimental animals published by the Canadian Council on Animal Care, 1993. Following cervical dislocation, a thoracotomy was performed and the heart cooled, cannulated and perfused *in situ* via the ascending aorta. The heart was then excised and mounted on a Langendorff perfusion system for retrograde perfusion with modified Krebs-Ringer buffer consisting (in mM) of 119 NaCl, 4.8 KCl, 1.3 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 25 NaHCO₃ and 15 glucose. The buffer solution was bubbled with 95% O₂-5% CO₂ for the entire experiment and kept at 37 °C and pH 7.4. Heart temperature was maintained at 37 °C via a thermocouple probe connected to a temperature controller (Model 74, Y.S.I. Instruments Co., Yellow Spring, OH, U.S.A.). All hearts were perfused at constant flow (5-10 ml/min) with a peristaltic pump (Model 325A, Sage Instruments Co., Cambridge, MA, U.S.A.). Coronary perfusion pressure (CPP, mmHg) was monitored with a pressure transducer (P23AC, Gould Statham, Hato Rey, Puerto Rico, U.S.A.) placed on a side-arm of the perfusion line. Left ventricular systolic and diastolic pressures (mmHg) were obtained with a water-filled latex balloon inserted in the left ventricle via the left atria and connected to a pressure transducer (P23AC, Gould Statham). Diastolic pressure was adjusted to 5-10 mmHg by varying the balloon volume and this volume was kept constant throughout the experiment. Left ventricular developed pressure (LVP) was computed as systolic minus diastolic pressure and expressed in mmHg. Heart

rate (beats/min) was calculated from the pressure recordings. All measurements were registered on a multichannel recorder (Model 7 polygraph, Grass Instruments Co., Quincy, MA, U.S.A.).

Experimental protocol. After 15 minutes of stabilization at constant pressure (100 mmHg) and evaluation of basal coronary flow by collecting the perfusate in a beaker for 2 minutes, hearts were switched to a constant flow mode (5-10 ml/min) for another 15 minutes, and baseline measurements were obtained for CPP, LVP and heart rate. Several groups of isolated hearts (5-10 per group) were studied. In the first group, normal and failing hearts were used for assessment of the dose-response curve to exogenous ET-1 (0.01 to 100 pmol) given as 0.1 ml bolus. In the second group, normal and failing hearts were exposed to phosphoramidon (10 μ M infusion) for 60 minutes. In the third group, normal and failing hearts were infused for 10 minutes with BQ 788 (1 μ M) while the fourth group consisted of normal and failing hearts exposed to 10 minutes of BQ 123 (1 μ M) infusion. In the third and fourth group, ET-1 (10 pmol), at a dose selected from the dose-response curve and closely corresponding to the EC_{50} of exogenous ET-1, was administered as a bolus before and at the tenth minute of BQ 788 or BQ 123 infusion. The infusion level of phosphoramidon was selected from previous studies indicating complete blockade of the endothelin converting enzyme activity, a significant reduction of myocardial ET-1 content and suppression of the vasoconstrictive effects of big-ET-1 in this concentration range (19-20). BQ 788 and BQ 123 have been shown to inhibit ET_B and ET_A receptors, respectively, in a concentration range similar to the one used in this investigation (21-23).

Statistical analysis. Data in tables and figures are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was conducted using analysis of variance (ANOVA) and Student t-test for paired or unpaired data according to the comparison made. EC_{50} values for the coronary action of exogenous ET-1 were estimated by linear regression of probits of response versus log dose employing the SAS program, version 6.04 (SAS Institute, Cary, NC, U.S.A.). Differences were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

Drugs and chemicals. ET-1 was purchased from Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO, U.S.A.). BQ 123 and BQ 788 were obtained from Banyu Pharmaceutical Co. (Tsukuba, Japan). Phosphoramidon was obtained from Peptide International Inc. (Louisville, KY, U.S.A.). Concentrated aliquots of ET-1, BQ 123 and BQ 788 were prepared and kept frozen until used. All dilutions were prepared the day of the experiment. Solutions were infused via a side-arm of the aortic canula at 1/100th of the coronary flow with a digital infusion pump (Model 22, Harvard Apparatus, South Natick, MA, U.S.A.). The final concentrations obtained in the system are those reported in the paper.

2.4 Results

Results from 61 experiments were tabulated. Normal hamsters had a mean body weight of 183 ± 6 g ($n = 31$) while cardiomyopathic hamsters were significantly lighter (137 ± 2 g, $n = 30$). All cardiomyopathic hamsters showed evidence of heart failure: fatigue, pulmonary and liver congestion, and peritoneal ascites at autopsy. Cardiac hypertrophy was present in all cardiomyopathic hamsters as evidenced by a greater ratio of heart weight (mg) over body weight (g): cardiomyopathic hamsters = 7.6 ± 0.3 vs 5.7 ± 0.2 in normal hamsters, $p < 0.01$). The baseline hemodynamics of isolated hearts from normal and cardiomyopathic hamsters are presented in Table 1. In the failing group, LVP, coronary flow and heart rate were all significantly reduced compared to the values observed in normal hearts.

ET-1. A typical recording illustrating the effects of bolus administration of ET-1 (10 pmol) in a normal heart is presented in Figure 1. ET-1 increased CPP along with a slight positive effect on LVP. Peak CPP elevation occurred within 60-90 seconds of ET-1 administration, and the vasoconstrictor effect lasted from 5 to 10 minutes. ET-1 dose-response curves for its effects on CPP with concentration ranging from 0.01 to 100 pmol were constructed (Figure 2). A dose-dependent increase in CPP was observed in both normal and failing hearts. The results indicate that the maximal increase in CPP was similar in normal and failing hearts (failing hearts = $64 \pm 5\%$ vs normal hearts = $69 \pm 10\%$). The estimated EC_{50} value for normal and failing hearts were not significantly different (failing hearts = 7 pmol vs normal hearts = 12 pmol). Administration of exogenous ET-1 did not alter heart rate ($-5 \pm 2\%$ in normal hearts vs $+1 \pm 3\%$ in failing

hearts). With increasing concentrations, ET-1 elicited a significant rise in LVP although to a lesser extent in failing hearts (Table 2).

Phosphoramidon. Individual responses to 60 minutes of phosphoramidon infusion are shown in Figure 3. In normal and failing hearts, CPP was not significantly modified in the presence of phosphoramidon. In failing hearts, mean CPP was 123 ± 6 mmHg before and 132 ± 6 mmHg after phosphoramidon. Similar findings were observed in normal hearts (mean CPP was 114 ± 8 mmHg before and 136 ± 10 mmHg after phosphoramidon). Phosphoramidon had no significant effects on heart rate in normal and failing hearts. In contrast, LVP was significantly reduced in the presence of phosphoramidon (Table 3).

ET_B and ET_A receptor antagonists. Infusion of BQ 788, the ET_B receptor antagonist, did not significantly modify baseline CPP in either normal or failing hearts (Figure 4). In addition, the coronary vasoconstrictive response to exogenous ET-1 (10 pmol) was not modified in the presence of BQ 788. As shown in Table 3, basal heart rate and LVP were not affected by BQ 788. The positive inotropic effects of exogenous ET-1 (10 pmol) were not significantly modified in the presence of BQ 788 for both normal and failing hearts (Table 2).

BQ 123, the ET_A receptor antagonist, did not elicit significant changes in basal CPP (Figure 5). In its presence, complete blunting of the coronary vasoconstrictive response to exogenous ET-1 (10 pmol) was observed in normal hearts. However, in failing hearts, BQ 123 only partially antagonized the ET-1-induced increase in CPP. Combined infusion of BQ 123 and BQ 788 was undertaken in an additional group of failing hearts (n = 3). In this

group, complete blockade of the increase in CPP elicited by exogenous ET-1 was observed (Figure 5). As shown in Table 3, heart rate was not modified in the presence of BQ 123 while significant reduction of LVP was seen in both normal and failing hearts. When exogenous ET-1 (10 pmol) was given in the presence of BQ 123, the ET-1-induced increase in LVP was abolished in both groups (Table 2).

2.5 Discussion

The present study suggests that the endothelin pathway does not participate in the expression of coronary dysfunctions (decreased basal flow and decreased response to vasodilator stimulation) associated with chronic heart failure. In isolated normal and failing hamster hearts, basal coronary tone was not affected by administration of phosphoramidon, the converting enzyme inhibitor, by BQ 788, the ET_B receptor antagonist, or by BQ 123, the ET_A receptor antagonist. In addition, coronary sensitivity to exogenous ET-1 was similar in normal and failing hearts. In normal hearts, the exogenous ET-1-induced increase in CPP was completely antagonized by BQ 123 while combined administration of BQ 788 and BQ 123 was necessary to antagonize the coronary vasoconstrictive effects of ET-1 in failing hearts. Contrary to the observed lack of contribution to coronary vascular tone, the endothelin pathway plays a significant role in the maintenance of cardiac contractility in this model of chronic heart failure. These results argue against a significant role for the endothelin pathway in the coronary dysfunctions associated with chronic heart failure while favoring a positive action on cardiac function in this condition. The results also suggest that administration of inhibitors of ET-1 synthesis as well as ET_A receptor antagonists may carry risk in the presence of poor left ventricular function since the endothelin pathway contributes significantly to the maintenance of myocardial contractility.

The cardiomyopathic Syrian hamster has become widely accepted as an experimental model useful for our understanding of pathophysiological processes associated with chronic

heart failure (24-25). In the UM-X7.1 hamster, a subline of Bio 14.6, developed in the early 1970's at the University of Montreal, myocardial lesions lead to fibrosis and cardiac hypertrophy, and heart failure begins at 190-200 days of age (26). Cardiomyocyte abnormalities related to calcium overload, genetic defects of membrane structures and functions, and microvascular spasms are recognized as contributing factors to the development of the disease (27-28).

Isolated heart preparations from this model of chronic heart failure have been used to study the contractile impairment present at different stages of the disease (6, 25). Although an altered coronary perfusion may play a role in progression of the disease (29), relatively few studies have focused on coronary abnormalities in the late stage of heart failure. However, there are several evidences pointing at significant coronary dysfunctions in this model of chronic heart failure. In cardiomyopathic hamster hearts with advanced heart failure, administration of positive inotropic agents such as amrinone, dibutyryl cAMP, Bay K 8644, digoxin and isoproterenol resulted in significant increase of left ventricular developed pressure and oxygen consumption without significant change in coronary flow (25). Secondly, during the active stage of necrosis, increased vasoconstrictive responsiveness has been reported (30-31) while Noll et al (32) reported, in conduit arteries of 1-year-old cardiomyopathic hamsters, an increased release of nitric oxide in response to norepinephrine and acetylcholine as well as enhanced sensitivity to ET-1. In isolated failing hamster hearts, Tanguay et al (5) have reported that coronary sensitivity to diltiazem was significantly attenuated compared to the one observed in normal hamster hearts, and the coronary desensitization to diltiazem was related to the production and/or the release of

a vasoconstricting factor originating from the cyclooxygenase pathway. More recently, we have shown that coronary dilation in the presence of acetylcholine was increased in failing hamster hearts compared to normal hamster hearts, which let us to conclude that this upregulated response compensate for the coronary vasoconstrictive state associated with heart failure (33). Since the failing hamster heart resembles the human heart in its biochemical, mechanical and coronary dysfunctions, this model seems suitable to examine the mechanisms responsible for the expression of coronary flow abnormalities with chronic heart failure.

Both experimental and clinical studies indicate that coronary vasomotion is abnormal in heart failure. In experimental models of heart failure, coronary perfusion has been shown to be impaired (5-6, 8, 34). Reduced basal coronary perfusion along with coronary vasospasm have also been observed in patients with chronic heart failure (1-2). Furthermore, several studies point to dynamic functional abnormalities of the coronary vasculature in patients with reduced left ventricular function (3-4, 35). Although coronary dysfunctions represent an important pathophysiological abnormality that influences clinical manifestations and the prognosis of chronic heart failure, their underlying mechanisms are not fully elucidated. As for other vascular disorders, alterations in coronary endothelial functions might be an interesting hypothesis (36).

While some investigators reported a reduced endothelium-dependent vasodilator response in the presence of heart failure (37-38), other authors suggest no change or even an increase in the endothelium-dependent coronary response to vasodilators in this condition (39-40).

We recently observed that vasodilation of coronary resistance vessels elicited by either endothelium-dependent or -independent mediators was maintained in experimental chronic heart failure (33). These data led us to suggest that coronary vasodilator stimuli originating from the endothelium are present and compensate for excessive vasoconstriction associated with heart failure. To what extent endothelium-derived vasoconstrictors play a role in this condition is still unknown.

These are reasons to believe that the endothelin pathway may play a role in the expression of vascular dysfunctions associated with heart failure. An increase in circulating endothelin levels has been observed in various experimental models of heart failure (10, 14). Similar findings were made in patients with chronic heart failure (9, 11, 41). Furthermore, recent evidence indicates that the density of myocardial ET-1 receptors is increased and the expression of pre-pro-ET-1 mRNA is higher in this pathological situation (12, 14). However, the role played by the endothelin pathway in the expression of coronary dysfunctions associated with chronic heart failure remains to be determined.

Despite the well-demonstrated, dose-dependent coronary vasoconstrictor effects of exogenous ET-1 (16-17, 42), no study has clearly established the role of endogenous ET-1 in the modulation of coronary vasomotor tone in chronic heart failure. The use of phosphoramidon, BQ 788 or BQ 123 allow us to assess the role of endogenous ET-1 production as well as activation of ET_A and ET_B receptors in the control of coronary perfusion. In accordance with previous studies, our findings indicate that selective antagonists of ET-1 receptors do not alter coronary perfusion in normal hearts (43-44).

Similarly, ET-1 does not appear to be a significant modulator of coronary vascular tone in failing hearts. Although they do not address the coronary bed, previous studies dealing with the vascular effects of ET-1 antagonists in heart failure have led to conflicting results. While bosentan, a non-specific ET_A and ET_B receptor antagonist, induced systemic vasodilation in chronic heart failure (13), the ET_A receptor antagonist, BQ 123, had no significant effects on blood pressure in this pathological condition (14). Such discrepancies might be related to the difference in experimental preparations (in vivo vs ex vivo), to the difference in vessel sensitivity to ET-1 (conductance vs resistance vessels; coronary vs peripheral vessels) or to the different experimental models of heart failure used (acute vs chronic).

Another evidence that the endothelin pathway does not participate in the coronary dysfunctions associated with chronic heart failure comes from results with exogenous ET-1 administration. Our data indicate that the coronary response to exogenous ET-1 was not significantly modified in the presence of heart failure (the EC₅₀ and maximal vasoconstriction with ET-1 were similar in the two groups). There are conflicting results on vascular sensitivity to exogenous ET-1 in diseased hearts. Blunting of the pressor response to ET-1 has been reported in several vascular beds in the presence of heart failure (18, 45-46). Desensitization of the ET-1 transmembrane signaling pathway has been suggested as one possible explanation (47). Contrary to these findings, Noll et al (32) observed, in cardiomyopathic hamsters with congestive heart failure, similar sensitivity to ET-1 in mesenteric resistance arteries and an increased response to ET-1 in aortic rings.

These divergent results may be explained by the chronicity of the disease, present in cardiomyopathic hamsters, and the different species utilized.

Administration of exogenous ET-1 before and after exposure to BQ 788 enabled us to confirm that ET_B receptors are not important for ET-1-induced coronary vasoconstriction. Results obtained in the presence of BQ 123 indicate that ET_A receptors mediate the coronary vasoconstrictor effect of ET-1, findings in accordance with previous data (16, 21). While complete inhibition of exogenous ET-1 response was observed in the presence of BQ 123 in normal hearts, only partial inhibition was noted in failing hearts. The residual vasoconstrictive response was abolished by concomitant administration of BQ 788. The latter observation may be related to an imbalance in the stimulation of ET_B receptors found on the endothelium and associated with the production of endothelium-derived vasodilators and stimulation of ET_B receptors on vascular smooth muscle cells favoring vasoconstriction (48). Although an increase in coronary sensitivity to ET_B receptors has been reported previously in dogs with experimental heart failure (18), in the present study, the absence of significant vascular effects in the presence of BQ 788 alone argues against this possibility. Finally, the residual coronary vasoconstrictive response sensitive to BQ 788 may be related to increased activity of the smooth muscle cell ET_B transmembrane signaling pathway in the presence of ET_A receptor blockade.

Endothelin has been shown to be a powerful positive inotropic substance and appears to be an important factor in the regulation of myocardial contractility (49-50). Despite elevated circulating and myocardial levels of ET-1 in the setting of chronic heart failure, the

importance of inotropic support provided by the endothelin pathway has not been clearly determined in this condition. The LVP reduction observed in the presence of phosphoramidon and BQ 123 as well as the significant increase in LVP associated with administration of exogenous ET-1 strongly argue for a significant contribution of the endothelin pathway to the maintenance of myocardial contractility in normal and failing hearts. The more important decrease of LVP in the presence of phosphoramidon may be related to its inhibitory action on neutral endopeptidase, leading to elevated levels of ANF which is considered to be a negative inotropic agent (51).

The significant attenuation of exogenous ET-1 positive inotropic effects in failing hearts could possibly be attributed to reduced access for ET-1 to its binding sites due to the presence of myocardial hypertrophy, fibrosis and ischemia. The possibility of down-regulation of myocardial ET-1 binding sites in the failing hamster heart must be ruled out since Bolger et al (52) reported no significant difference in the number of myocardial-specific binding sites between normal and failing hamster hearts. Previous studies suggest that activation of ET_A receptors is responsible for a large part, if not all, of the positive inotropic effects of endothelin (53-54). A similar conclusion can be drawn from our results since BQ 123 elicited significant impairment of basal as well as ET-1-stimulated myocardial contractility.

There are some limitations to this study. First, experiments were performed on isolated heart preparations which do not take into account the possible interaction of circulating elements with the various effects of endothelin (55). This experimental model, however,

offers some advantages since the direct effects of substances on coronary vasomotor tone and mechanical performance can be adequately determined. In addition, by using the constant flow model, the confounding action of shear stress on endothelin production can be overcome (54, 56). The results of the present study cannot be transferred directly to the clinical situation because the cardiomyopathic hamster model of chronic heart failure does not correspond to all pathological situations leading to chronic heart failure in humans.

In conclusion, our data argue against a significant contribution of the endothelin pathway to the coronary dysfunctions associated with chronic heart failure while favoring a positive inotropic action in this condition. These observations lead us to suggest that administration of ET-1 synthesis inhibitors as well as the use of ET_A receptor antagonists may carry risk in the presence of poor left ventricular function.

Acknowledgments

This work was supported in part by a grant from La Fondation Québécoise Des Maladies Du Coeur (FQMC). We thank Mr. Florine Sarman for technical assistance. We also thank Dr. Richard Moisan for providing invaluable statistical expertise and Dr. Matsu Nishikibe (Tsukuba Research Institute, Banyu Pharmaceutical Co. Tsukuba, Japan) for the generous gift of BQ 788 and BQ 123.

2.6 References

1. Pasternac A, Noble J, Streulens Y, Elie R, Henschke C, Bourassa MG. Pathophysiology of chest pain in patients with cardiomyopathies and normal coronary arteries. *Circulation* 1982; 65: 778-789.
2. Unverferth DV, Magorien RD, Lewis RP, Leier CV. The role of subendocardial ischemia in perturbing myocardial failure in patients with nonischemic congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1983; 105: 176-179.
3. Cannon RO, Cunnion RE, Parillo JE, Palmeri ST, Tucker EE, Schenke WH, Epstein SE. Dynamic limitation of coronary vasodilator reserve in patients with dilated cardiomyopathy and chest pain. *J Am Coll Cardiol* 1987; 10: 1190-1200.
4. Inoue T, Sakai Y, Morooka S, Hayashi T, Takayanagi K, Yamaguchi H, Kakoi H, Takabatake Y. Vasodilatory capacity of coronary resistance vessels in dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 1994; 127: 376-381.
5. Tanguay M, Jasmin G, Blaise G, Dumont L. Impaired coronary sensitivity to diltiazem in experimental heart failure: involvement of the cyclooxygenase but not the nitric oxide-synthase pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 28: 232-239.

6. Haleen SJ, Weishaar RE, Overhiser RW, Bousley RF, Keiser JA, Rapundalo SR, Taylor DG. Effects of quinapril, a new angiotensin converting enzyme inhibitor, on left ventricular failure and survival in the cardiomyopathic hamster. *Circ Res* 1991; 68: 1302-1312.
7. Parrish DG, Ring WS, Bache RJ. Myocardial perfusion in compensated and failing hypertrophied ventricle. *Am J Physiol* 1985; 249: H534-H539.
8. Vatner SF. Reduced subendocardial myocardial perfusion as one mechanism for congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1988; 62: 94E-98E.
9. Nakamura M, Arakawa N, Yoshida H, Funakoshi T, Chiba M, Abe Y, Makita S, Aoki H, Hiramori K. Increased plasma endothelin concentrations in patients with acute heart failure after myocardial infarction. *Japanese Circ J* 1993; 57: 371-378.
10. Margulies KB, Hildebrand FL Jr, Lerman A, Perrella MA, Burnett JC Jr. Increased endothelin in experimental heart failure. *Circulation* 1990; 82: 2226-2230.
11. Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CGA, Brandt RR, Wright S, Heublein DM, Kao PC, Edwards WD, Burnett JC Jr. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 1994; 89: 1580-1586.

12. Miyauchi T, Sakai S, Ihara M, Kasuya Y, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Increased endothelin-1 binding sites in the cardiac membranes in rats with chronic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26 (suppl 3): S448-S451.
13. Shimoyama H, Sabbah N, Borzak S, Tanimura M, Shevlyagin S, Scicli G, Goldstein S. Short-term hemodynamic effects of endothelin receptor blockade in dogs with chronic heart failure. *Circulation* 1996; 94: 779-784.
14. Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Kasuya Y, Ihara M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. Marked increase in endothelin-1 production in the failing heart. *Circulation* 1996; 93: 1214-1222.
15. Igarashi Y, Aizawa Y, Tamura M, Ebe K, Yamagushi T, Shibata A. Vasoconstrictor effect of endothelin on the canine coronary artery: is a novel endogenous peptide involved in regulating myocardial blood flow and coronary spasm? *Am Heart J* 1989; 118: 674-678.
16. Cannan CR, Burnett JC Jr, Brandt RR, Lerman A. Endothelin at pathophysiological concentrations mediates coronary vasoconstriction via the endothelin-a receptor. *Circulation* 1995; 92: 3312-3317.
17. Traverse JH, Judd D, Bache RJ. Dose-dependent effect of endothelin-1 on blood flow to normal and collateral-dependent myocardium. *Circulation* 1996; 93: 558-566.

18. Cannan CR, Burnett JC Jr, Lerman A. Enhanced coronary vasoconstriction to endothelin-B-receptor activation in experimental congestive heart failure. *Circulation* 1996; 93: 646-651.
19. Matsumura Y, Kasuhiro H, Takaoka M, Morimoto S. Phosphoramidon, a metalloproteinase inhibitor, suppresses the hypertensive effect of big endothelin-1. *Eur J Pharmacol* 1990; 183: 103-106.
20. McMahon EG, Palomo MA, Moore WM, McDonald JF, Stern MK. Phosphoramidon blocks the pressor activity of porcine big-endothelin-1 (1-39) in vivo and conversion of big-endothelin-1 (1-39) to endothelin-1 (1-21) in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 703-707.
21. Wang Q-D, Li X-S, Pernow J. Characterization of endothelin-1-induced vascular effects in the rat heart by using endothelin receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 1994; 271: 25-30.
22. Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Mase T, Mino N, Saeki T, Fukuroda T, Fukami T, Ozaki S, Nagase T, Nishikibe M, Yano M. Biochemical and pharmacological profile of a potent and sensitive endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4892-4896.

23. Ishira M, Noguchi K, Saeki T, Fukuroda T, Tsuchida S, Kimura S, Fukami T, Ishikawa K, Nishikibe M, Yano M. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ET_A receptor. *Life Sci* 1992; 50: 247-255.
24. Smith HJ, Nuttall A. Experimental models of heart failure. *Cardiovasc Res* 1985; 19: 181-186.
25. Buser PT, Wu SY, Parmley WW, Jasmin G, Wikman-Coffelt J. Distinct modulation of myocardial performance, energy metabolism, and [Ca²⁺]_i transients by positive inotropic drugs in normal and severely failing hamster hearts. *Cardiovasc Drugs Ther* 1995; 9: 151-157.
26. Jasmin G, Proschek L. Hereditary polymyopathy and cardiomyopathy in the Syrian hamster I. Progression of heart and skeletal muscle lesions in the UM-X7.1 line. *Muscle Nerve* 1982; 5: 20-25.
27. Roberds SL, Revasti JM, Anderson RD, Ohlendieck R, Kahl SD, Zoloto D, Campbell KP. Disruption of the dystrophin-glycoprotein complex in the cardiomyopathic hamster. *J Biol Chem* 1993; 268: 11496-11499.
28. Sonnenblick EH, Fein F, Capasso JM, Factor SM. Microvascular spasm as a cause of cardiomyopathies and the calcium-blocking agent verapamil as potential primary therapy. *Am J Cardiol* 1985; 55: 179B-184B.

29. Factor SM, Minase T, Cho S, Dominitz R, Sonnenblick EH. Microvascular spasm in the cardiomyopathic Syrian hamster: a preventable cause of focal myocardial necrosis. *Circulation* 1982; 66: 342-354.
30. Conway RS, Factor SM, Sonnenblick EH, Baez S. Microvascular reactivity of the myopathic Syrian hamster cremaster muscle. *Cardiovasc Res* 1987; 21: 796-803.
31. Conway RS, Natelson BH, Chen WH, Ting W. Enhanced coronary vasoconstriction in the Syrian hamster supports the microvascular spasm hypothesis. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 320-324.
32. Noll G, Tschudi MR, Novosed D, Lüscher TF. Activity of the arginine/nitric oxide pathway and endothelin-1 in experimental heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 21: 916-921.
33. Véronneau M, Tanguay M, Fontaine E, Jasmin G, Dumont L. Reactivity to endothelium-dependent and -independent vasoactive substances is maintained in coronary resistance vessels of the failing hamster heart. *Cardiovasc Res* 1997; 33: 623-630.
34. Hittinger L, Shannon RP, Bishop SP, Gelpi RJ, Vatner SF. Subendomyocardial exhaustion of blood flow reserve and increased fibrosis in conscious dogs with heart failure. *Circ Res* 1989; 65: 971-980.

35. Nitenberg A, Foulst J-M, Blanchet F, Zouioueche S. Multifactorial determinants of reduced coronary flow reserve after dipyridamole in dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1985; 55: 748-755.
36. Lüscher TF, Noll G. Endothelium dysfunction in the coronary circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24 (suppl 3): S16-S26.
37. Treasure CB, Vata JA, Cox DA, Fish D, Gordon JB, Mudge GH, Colucci WS, St-John MG, Selwyn AP, Alexander RW, Ganz P. Endothelium-dependent dilation of the coronary microvasculature is impaired in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1990; 81: 772-779.
38. Wang J, Seyedi N, Xu X-B, Wolin MS, Hintze TH. Defective mediated control of coronary circulation in conscious dogs after heart failure. *Am J Physiol* 1994; 266: H670-H680.
39. Larosa G, Armstrong PW, Foster C. Endothelium-dependent relaxations in canine coronary arteries are enhanced in early heart failure and persist in recovery. *Can J Pharmacol Physiol* 1994; 72: 1148-1154.
40. O'Murchu B, Miller VM, Perrella MA, Burnett JC Jr. Increased production of nitric oxide in coronary arteries during congestive heart failure. *J Clin Invest* 1994; 93: 165-171.

41. Stewart DJ, Cernacek P, Costello P, Rouleau JL. Elevated endothelin-1 in heart failure and loss of normal response to postural change. *Circulation* 1992; 85: 510-517.
42. Clozel J-P, Clozel M. Effects of endothelin on the coronary vascular bed in open-chest dogs. *Circ Res* 1989; 65: 1193-1200.
43. Grover GJ, Sleph PG, Fox M, Trippodo NC. Role of endothelin-1 and big-endothelin-1 in modulating coronary vascular tone, contractile function and severity of ischemia in rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263: 1074-1082.
44. Wang Q-D, Pernow J. The nonpeptide endothelin receptor antagonist bosentan enhances myocardial recovery and endothelial function during reperfusion of the ischemic rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26 (suppl 3): S445-S447.
45. Cavero PG, Miller WL, Heublein DM, Margulies KB, Burnett JC Jr. Endothelin in experimental heart failure in the anesthetized dog. *Am J Physiol* 1990; 259: F312-F317.
46. Fu L-X, Sun X, Hedner T, Feng Q-P, Liang Q-M, Hoebeke J, Hjalmarson A. Decreased density of mesenteric arteries but not of myocardial endothelin receptors and function in rats with chronic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 177-182.

47. Calderone A, Rouleau JL, de Champlain J, Bélichard P, Stewart DJ. Regulation of the endothelin-1 transmembrane signaling pathway: the potential role of agonist-induced desensitization in the coronary artery of the ventricular pacing-overdrive dog model of heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25: 895-903.
48. Clozel M, Gray GA, Breu V, Löffler B, Osterwalder R. The endothelin ET_B receptor mediates both vasodilation and vasoconstriction in vivo. *Biochem Biophys Res Comm* 1992; 186: 867-873.
49. Li K, Stewart DJ, Rouleau JL. Myocardial contractile actions of endothelin-1 in rat and rabbit papillary muscle. Role of endocardial endothelium. *Circ Res* 1991; 69: 301-312.
50. McClellan G, Weisberg A, Winegrad S. Endothelin regulation of cardiac contractility in absence of added endothelin. *Am J Physiol* 1995; 268: H1621-H1627.
51. Yasuhara M, Yamagushi M, Shimizu H, Hashimoto Y, Hama N, Itoh H, Nakao K, Mori R. Natriuretic peptide-potentiating actions of neutral endopeptidase inhibition in rats with experimental heart failure. *Pharm Res* 1994; 11: 1726-1730.
52. Bolger GT, Berry R, Liard F, Garneau M, Jaramillo J. Cardiac responses and binding sites for endothelin in normal and cardiomyopathic hamsters. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 260: 1314-1322.

53. Kasai H, Takanashi M, Takasaki C, Endoh M. Pharmacological properties of endothelin receptor subtypes mediating positive inotropic effects in rabbit heart. *Am J Physiol* 1994; 266: H2220-H2228.
54. McClellan G, Weisberg A, Rose D, Winegrad S. Endothelial cell storage and release of endothelin as a cardioregulatory mechanism. *Circ Res* 1995; 75: 85-96.
55. Zeiher AM, Goebel H, Schächinger V, Ihling C. Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. *Circulation* 1995; 91: 941-947.
56. Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Yazaki Y. Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultures endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; 161: 859-864.

Table 1**Baseline hemodynamic data in normal and failing hamster hearts**

	NORMAL HEARTS	FAILING HEARTS
Left ventricular pressure (mmHg)	55 ± 2	37 ± 2*
Coronary flow (ml/min)	6.8 ± 0.3	5.0 ± 0.2*
Heart rate (beats/min)	157 ± 5	136 ± 5*

Data are expressed as mean ± SEM (n = 31, normal hearts; n = 30, failing hearts).

* p<0.05 versus normal hearts.

Table 2

Effects of exogenous ET-1 with and without BQ 788 and BQ 123 on left ventricular pressure

	NORMAL HEARTS	FAILING HEARTS
ET-1 (control)	+19 ± 5*	+7 ± 3*‡
ET-1 + BQ 788	+11 ± 3*	+2 ± 4
ET-1 + BQ 123	-4 ± 4■	-9 ± 2*■

Data are expressed as percent change (%) from baseline (Mean ± SEM).

* p<0.05 versus baseline within each group.

‡ p<0.05 versus normal hearts.

■ p<0.05 versus ET-1 (control conditions) within each group.

Table 3

Cardiac effects of phosphoramidon, BQ 788 and BQ 123 in normal and failing hearts before exogenous administration of ET-1

	HEART RATE		LVP	
	NORMAL	FAILING	NORMAL	FAILING
Phosphoramidon (10 μ M)	-4 \pm 6	-3 \pm 3	-20 \pm 5*	-19 \pm 6*
BQ 788 (1 μ M)	-2 \pm 3	-4 \pm 3	-3 \pm 4	-5 \pm 4
BQ 123 (1 μ M)	2 \pm 5	4 \pm 3	-7 \pm 3*	-8 \pm 2*

Data are expressed as percent change (%) from baseline within each group. Mean \pm SEM (n = 7-10 per group).

* p<0.05 versus baseline within each group.

Figure legends

Figure 1 Typical recording of the effects of exogenous ET-1 in an isolated normal hamster heart

Abbreviations: **LVP** = left ventricular pressure; **CPP** = coronary perfusion pressure.

Figure 2 Effects of exogenous ET-1 on coronary perfusion pressure (CPP): dose-response curve in normal and failing hamster hearts

Data are expressed as percent change (%) of the maximal increase in CPP. Values are mean \pm SEM (n = 5-7 per group).

Inset: Probit plot of values and the estimated EC_{50} for normal (dotted line) and failing hearts (dashed line).

Figure 3 Effects of phosphoramidon on basal coronary perfusion pressure (CPP) in normal and failing hamster hearts

Data are expressed as absolute coronary perfusion pressure values (mmHg). Individual values are presented along with the mean \pm SEM in normal and failing hearts.

Normal (⊙) and failing (⊗) hearts.

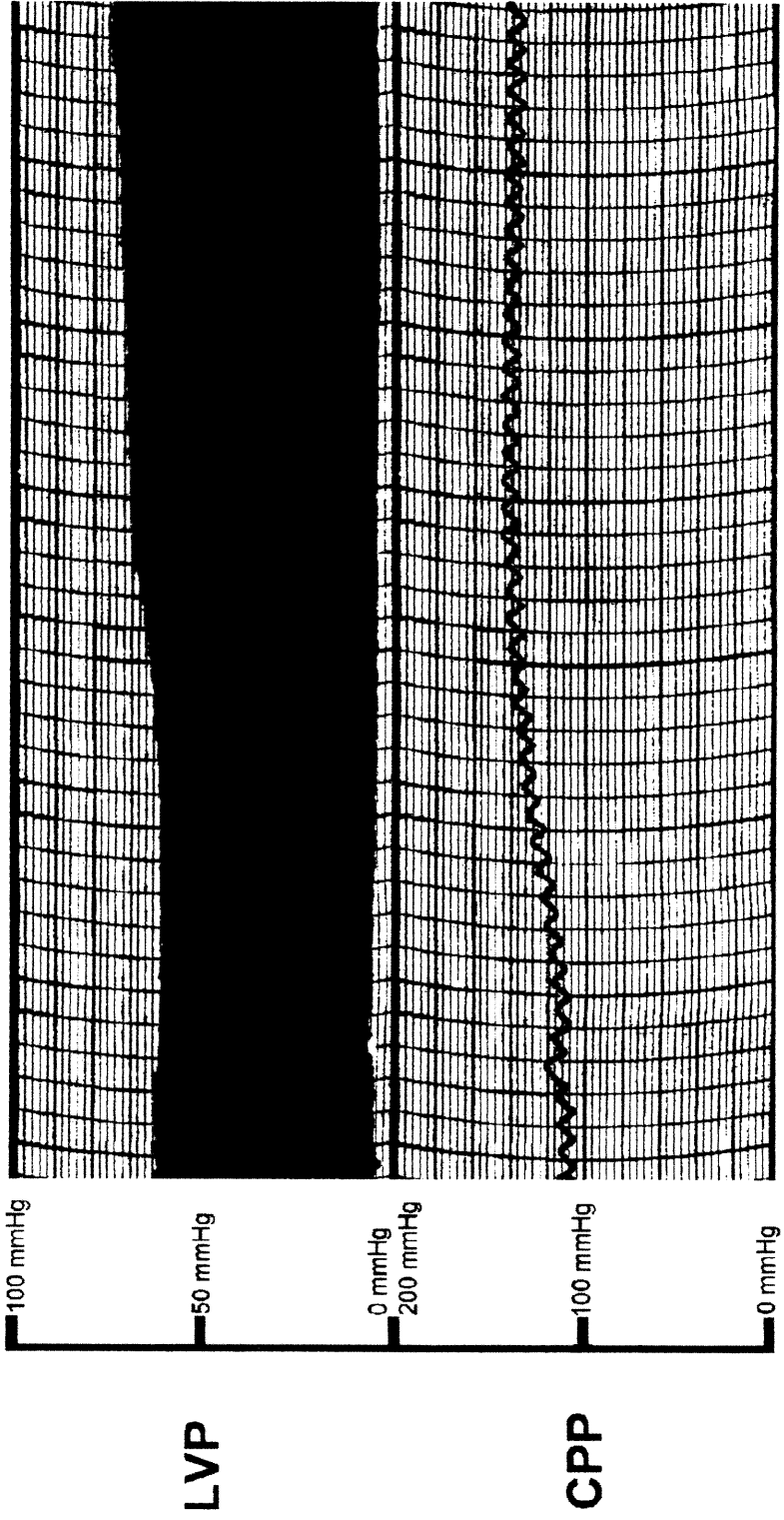
Figure 4 Effects of the ET_B receptor antagonist, BQ 788, with and without exogenous ET-1 on coronary perfusion pressure in normal and failing hearts

Data are expressed as percent change (%) from baseline within each group. Values are mean \pm SEM.

Figure 5 Effects of the ET_A receptor antagonist, BQ 123, with and without exogenous ET-1 on coronary perfusion pressure in normal and failing hearts

Data are expressed as percent change (%) from baseline within each group. Values are mean \pm SEM.

* $p < 0.05$ versus normal hearts.



\uparrow Endothelin-1 10 pmol (0.1 ml) ┌ 10 sec

Figure 1

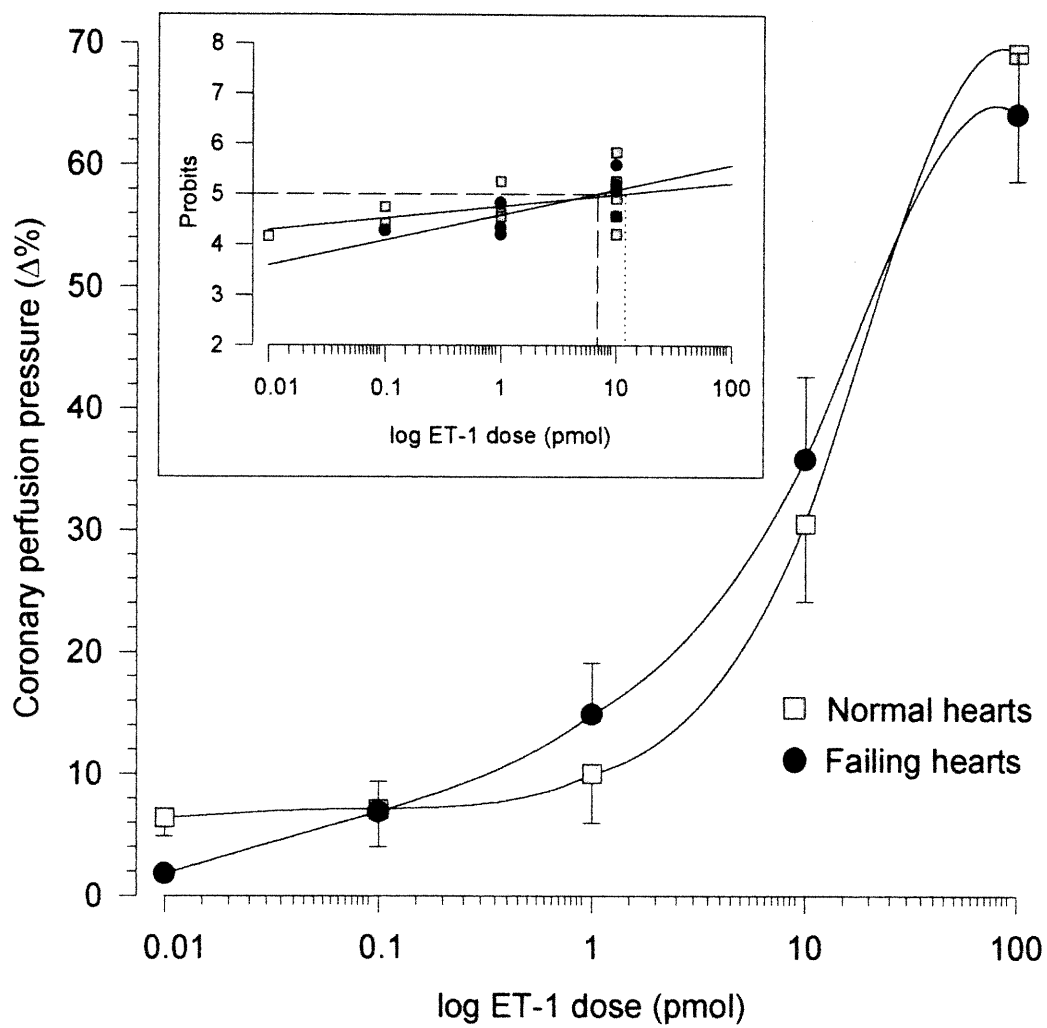


Figure 2

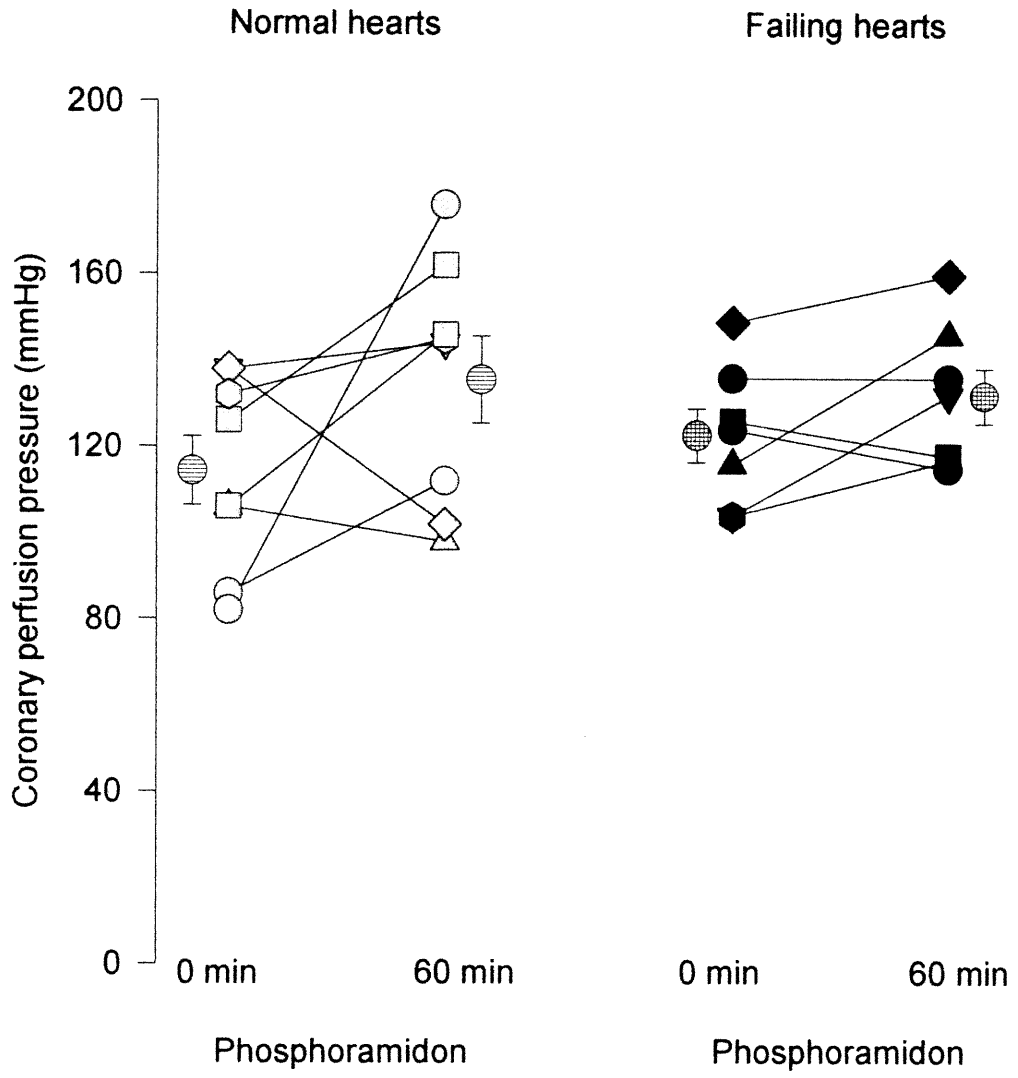


Figure 3

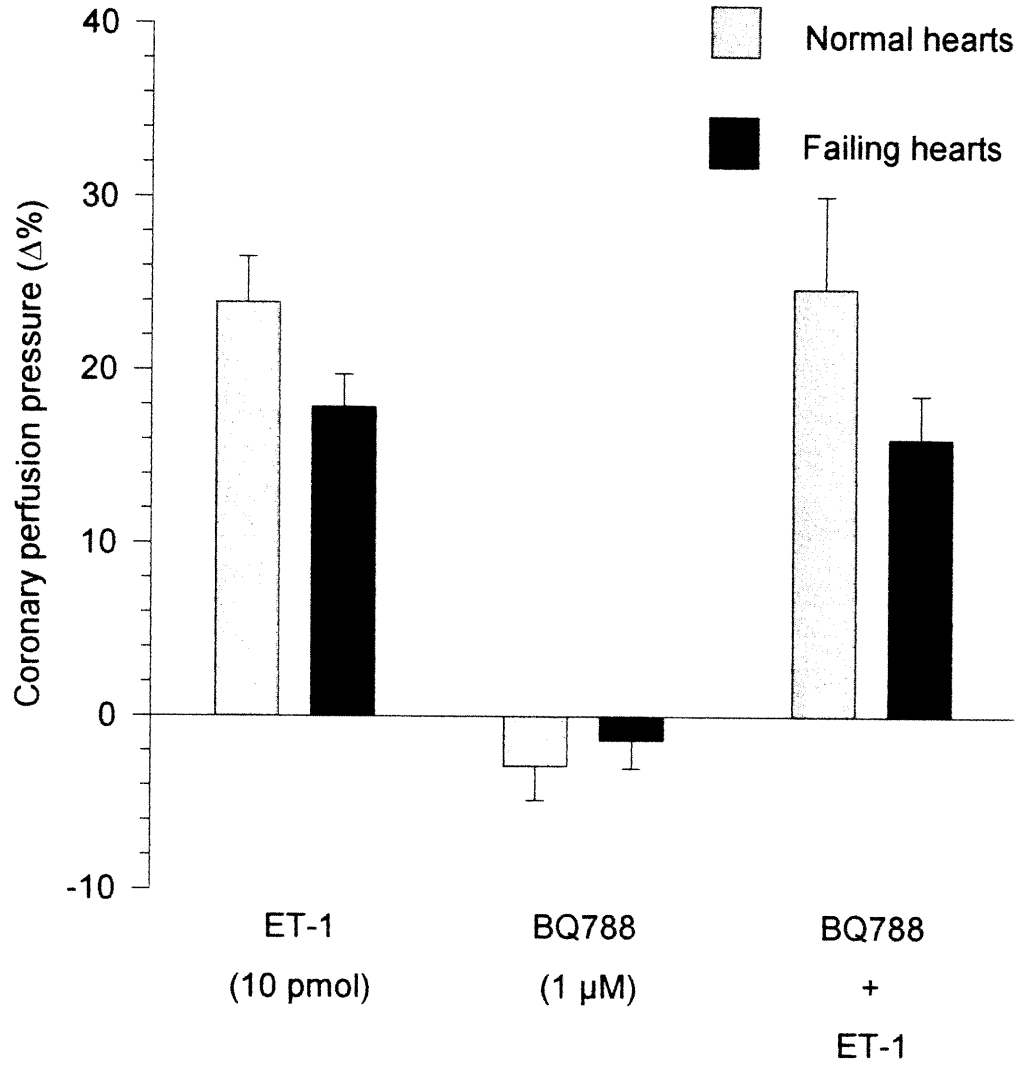


Figure 4

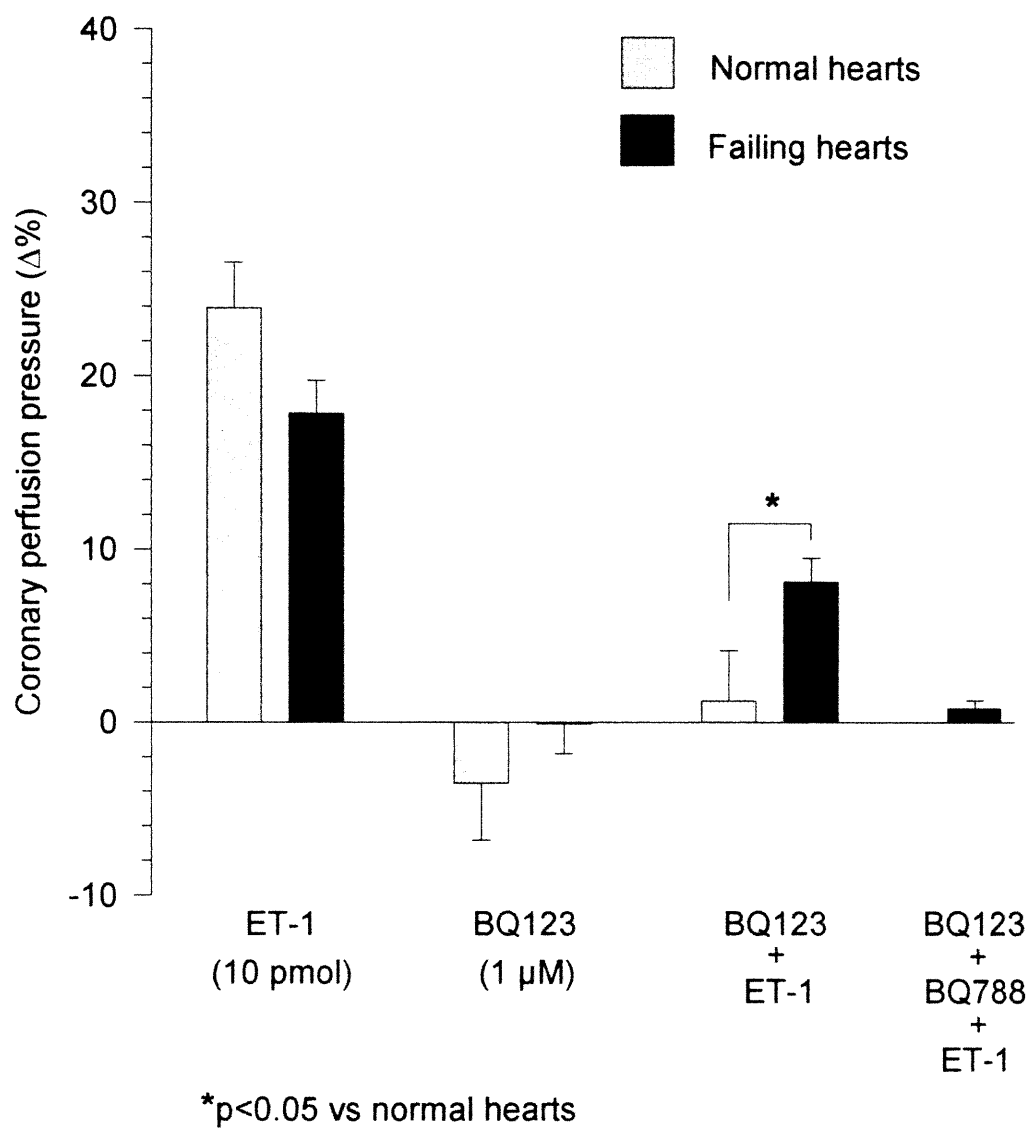


Figure 5

CHAPITRE 3

DISCUSSION

3.1 Modèle expérimental

Le hamster cardiomyopathique Syrien est de plus en plus accepté en tant que modèle expérimental de défaillance cardiaque chronique et celui-ci permet d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de cette pathologie. Le hamster UM-X7.1 est un sous-type de la lignée Bio 14.6 développé à l'Université de Montréal. L'apparition chronologique des caractéristiques pathophysiologiques est bien déterminée. Des lésions ischémiques induisent le développement de fibrose et d'hypertrophie myocardique qui culminent par l'apparition de la phase de défaillance cardiaque vers l'âge de 200 jours (Jasmin et Eu 1979). Les facteurs qui contribuent à l'apparition des dysfonctions contractiles sont nombreux et l'on reconnaît aujourd'hui qu'une surcharge calcique intracellulaire, de même qu'un défaut génétique de la structure et des fonctions des membranes des cardiocytes, jumelés à l'apparition de spasmes des vaisseaux résistifs artériolaires, sont à l'origine du développement de la maladie (Hano et Lakatta 1991; Sonnenblick et coll. 1985). Cependant la défaillance cardiaque du hamster cardiomyopathique ne correspond pas à toutes les conditions pathologiques initiatrices de la défaillance cardiaque prévalant chez l'homme. Ce modèle exclu des conditions émanant d'une origine ischémique (infarctus du myocarde), d'une déficience valvulaire, d'une hypertension pulmonaire (Smith et Nuttall 1985), d'une origine virale (Ertl et Kochsiek 1993), d'une myocardite, d'une cardiomyopathie due à l'alcool ou la cocaïne et d'un diabète sucré (LeJemtel et Sonnenblick 1993).

3.2 Modèle chronique vs aigu

Un des avantages de ce modèle est l'évolution chronique de la maladie (Chemla et coll. 1991). Tout comme chez l'homme, l'évolution de la maladie s'étend sur une longue période, contrairement aux formes aiguës de défaillance cardiaque que l'on observe avec l'utilisation d'un modèle par ligature d'une coronaire, par surcharge volumique du ventricule gauche ou par l'utilisation de substances cardiotoxiques. Ces modèles montrent une évolution beaucoup plus rapide de la maladie (quelques semaines).

Tout comme chez l'homme, des dysfonctions coronariennes associées à la défaillance cardiaque ont été rapportées dans le modèle que nous avons utilisé. Des vasospasmes coronariens contribuent à l'altération de la perfusion coronarienne et pourraient jouer un rôle dans l'évolution de la maladie (Factor et coll. 1982). Ce modèle serait donc plus près de la pathologie humaine, quant à son évolution, que le modèle expérimental de défaillance cardiaque obtenue par surcharge de volume qui est plus approprié pour l'étude des changements hormonaux rencontrés dans la défaillance cardiaque (Smith et Nuttall 1985). Certaines études utilisant le hamster cardiomyopathique ont rapporté, dans la phase pré-hypertrophique de la maladie, une augmentation de la réponse vasculaire à des agents vasoconstricteurs comme la noradrénaline, la sérotonine et l'arginine-vasopressine (Conway et coll. 1987; Conway et coll. 1994; Hunter et coll. 1983). D'autres études rapportent une altération de la réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium (Lüscher et Noll 1994; Treasure et coll. 1990; Wang et coll. 1994). Cependant, peu d'études se sont attardées à la phase tardive de la maladie (défaillance cardiaque).

Récemment, une étude a démontré une augmentation de la sensibilité à l'ET-1 dans les artères de conductance de hamsters cardiomyopathiques âgés d'un an (Noll et coll. 1994). Nous avons récemment démontré (Véronneau et coll. 1997) dans le coeur défaillant du hamster cardiomyopathique que les voies de signalisation de la NO-synthase et de la cyclooxygénase ne sont pas impliquées dans les dysfonctions coronariennes et que la réponse vasodilatatrice coronarienne dépendante ou indépendante de l'endothélium est maintenue dans le coeur défaillant. Donc, une anomalie de la production de vasodilatateurs dans les vaisseaux coronariens n'explique pas les dysfonctions coronariennes observées dans ce modèle de défaillance cardiaque chronique et compense pour la vasoconstriction excessive associée à la défaillance cardiaque.

3.3 Utilisation du coeur isolé, perfusé

Un avantage de la méthode du coeur isolé, par rapport à celle du vaisseau isolé, est l'utilisation de l'organe tout entier ce qui offre l'opportunité d'étudier les vaisseaux artériolaires de résistance et leurs composantes environnantes, ce que l'on ne peut faire à partir de vaisseaux isolés. L'étude de ces vaisseaux résistifs s'avèrent très importante puisque ce sont ces vaisseaux qui sont impliqués dans les dysfonctions coronariennes (vasospasmes) associées à la défaillance cardiaque puisqu'il s'agit d'un désordre de la microcirculation (Sonnenblick et coll. 1985). Bien que l'interprétation des résultats soit plus complexe, cette méthode reflète mieux l'environnement physiologique du vaisseau étudié de même que des interactions avec les différents types cellulaires environnants. Par

exemple, l'ET-1 diffuse des vaisseaux vers les cardiomyocytes pour produire son effet inotrope positif.

L'utilisation de la méthode du coeur isolé offre aussi des avantages par rapport à l'utilisation de l'animal entier. Premièrement, il n'y a plus d'interférence du système nerveux qui pourraient moduler l'action des différentes substances étudiées et de là rendre l'interprétation des résultats difficiles. Également, il est plus facile de contrôler les paramètres fonctionnels puisqu'il n'y a plus d'influence périphérique. La perfusion rétrograde de l'aorte permet d'irriguer spécifiquement les artères coronariennes. L'utilisation du ballon intraventriculaire permet d'étudier les interactions médicaments-contractilité myocardique et perfusion coronarienne-contractilité myocardique. La perfusion du coeur isolé à débit constant permet d'observer l'effet direct d'une substance au niveau de la contractilité sans interférence du débit coronarien (effet érectile indirect). Bien entendu, le débit constant ne reflète pas la réalité physiologique et il faut donc être prudent dans l'interprétation des résultats et leur transposition chez l'homme. La plage de débit utilisée dans l'étude englobe les débits coronariens des groupes de coeurs normaux et défaillants. Puisque nous ne voulions pas produire de variations hémodynamiques trop importantes lors de la perfusion à débit constant, nous ajustions le débit de la pompe pour qu'il soit le plus près possible de la valeur obtenue à pression constante. Cette valeur de débit se situait, pour le groupe défaillant, aux environs de 5 ml/min, tandis que cette valeur était plus élevée pour les coeurs normaux. De plus, pour certains coeurs, indépendamment de la pathologie, le débit coronarien était plus élevé (10 ml/min). Ce sont là des valeurs de débit que l'on observe fréquemment au laboratoire et qui sont considérées comme

acceptables. Enfin, l'utilisation de solutions physiologiques peut être perçue comme un avantage, l'absence des éléments circulants du sang élimine les interactions possibles entre ceux-ci et les substances étudiées (Zeihner et coll. 1995). Le modèle s'avère donc fort utile pour l'étude de la réactivité coronarienne et cardiaque à des substances vasoactives.

Nous avons choisi d'étudier l'ET-1 puisque c'est le plus puissant vasoconstricteur endogène connu et que plusieurs études suggèrent que l'ET-1 est impliquée dans la défaillance cardiaque (Nakamura et coll. 1993; Miyauchi et coll. 1995; Sakai et coll. 1996). Puisque l'on observe des vasospasmes coronariens dans ce modèle de défaillance cardiaque, il est possible que l'ET-1 puisse médier ces dysfonctions vasculaires.

3.4 Effets de l'ET-1, du phosphoramidon, du BQ 788 et du BQ 123

Il a été établi que l'ET-1 est un puissant agent vasoactif et les effets vasoconstricteurs de l'ET-1 exogène sont bien connus (Cannan et coll. 1995; Traverse et coll. 1996). Cependant, aucune étude n'a clairement démontré le rôle de l'ET-1 endogène dans le maintien du tonus vasculaire coronarien dans la défaillance cardiaque.

L'ET-1 endogène ne semble pas impliquée dans le tonus basal coronarien puisque l'infusion du phosphoramidon, inhibiteur de la synthèse de l'ET-1, du BQ 788, antagoniste spécifique des récepteurs ET_B, ou du BQ 123, antagoniste sélectif des récepteurs ET_A, n'a pas d'effet significatif sur la pression de perfusion coronarienne. Cette observation se compare à d'autres études démontrant que l'utilisation d'antagonistes spécifiques des

récepteurs de l'ET-1 n'altère pas significativement la perfusion coronarienne dans les coeurs normaux (Grover et coll. 1992; Wang et coll. 1995). On observe cependant des controverses en ce qui concerne l'action de ces antagonistes dans la défaillance cardiaque. Sakai et ses collaborateurs (1996) a démontré que le BQ 123 n'avait pas d'effet sur la pression sanguine dans la défaillance cardiaque, tandis que le bosentan, un antagoniste non-spécifique des récepteurs de l'ET-1, induit une vasodilatation systémique (Shimoyama et coll. 1996).

De plus, l'administration d'un bolus d'ET-1 exogène à des doses croissantes nous a permis d'observer qu'il n'y a pas d'hypersensibilité coronarienne et que la réponse maximale à la plus forte concentration d'ET-1 utilisée est similaire pour les deux groupes, ce qui suggère que l'ET-1 ne participe pas aux dysfonctions coronariennes associées à la défaillance cardiaque. Cependant, certaines études rapportent que dans la défaillance cardiaque il existe une diminution de la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1 exogène dans certains territoires vasculaires (Cannan et coll. 1996; Fu et coll. 1993), et cet effet pourrait s'expliquer par une désensibilisation de la voie de signalisation post-récepteur de l'ET-1 (Calderone et coll. 1993). Une étude récente rapporte une sensibilité à l'ET-1 qui est similaire dans les artères de résistance mésentériques alors qu'une réponse accrue est observée dans des anneaux aortiques provenant de hamsters cardiomyopathiques atteints de défaillance cardiaque (Noll et coll. 1994). Les différentes espèces, les différents modèles de défaillance, les différents territoires vasculaires et les divers types de vaisseaux (résistifs vs capacitifs) utilisés dans ces études pourraient expliquer cette disparité dans les résultats.

La contribution des récepteurs ET_B à l'effet vasoconstricteur de l'ET-1 n'est pas significatif au niveau coronarien puisque le BQ 788 n'antagonise pas l'augmentation de la pression de perfusion coronarienne occasionnée par l'administration d'ET-1 exogène. Ces récepteurs serviraient de récepteurs de clairance de l'ET-1 circulante (Fukuroda et coll. 1994) ou seraient impliqués dans la relâche de médiateurs endothéliaux vasodilatateurs.

L'infusion du BQ 123, par contre, montre l'importance des récepteurs ET_A dans la médiation de l'action vasoconstrictrice de ET-1 puisque la réponse coronarienne à l'ET-1 est complètement inhibée dans les coeurs normaux. Cette observation est confirmée par d'autres études démontrant que les récepteurs ET_A sont responsables de l'effet vasoconstricteur de l'ET-1 (Cannan et coll. 1995; Wang et coll. 1994; Davenport et coll. 1995). Cependant, l'ajout du BQ 788 est nécessaire pour bloquer complètement la réponse coronarienne dans les coeurs défailants. Ces observations suggèrent une amplification du mécanisme d'action relié aux récepteurs ET_B , situés au niveau musculaire lisse, ou un déséquilibre entre une stimulation des récepteurs ET_B , au niveau de la cellule endothéliale, médiant la vasodilatation et celle des récepteurs ET_B , situés au niveau de la musculature lisse, médiant une vasoconstriction (Clozel et coll. 1992).

L'utilisation du phosphoramidon, du BQ 788, du BQ 123 et d'ET-1 exogène nous a également permis d'étudier les effets cardiaques de l'ET-1. Aucun effet significatif, sur la fréquence cardiaque, n'a été observé lors de l'administration d'ET-1, des antagonistes de ses récepteurs ou de la combinaison d'ET-1 et des antagonistes de ses récepteurs. Comparativement à une faible contribution au maintien du tonus vasculaire coronarien,

l'ET-1 est importante dans le maintien de la contractilité cardiaque. La baisse de contractilité cardiaque observée après l'infusion du phosphoramidon et du BQ 123 suggère un effet inotrope positif de l'ET-1 endogène et que cette action est médiée principalement par les récepteurs ET_A cardiaques, puisque l'infusion du BQ 788 n'a pas d'effet significatif sur la contractilité. Contrairement à ce que l'on était en mesure de s'attendre selon la littérature disponible, l'ET-1 ne serait pas un facteur aggravant la condition pathologique mais au contraire un important médiateur de la fonction contractile et son action cardiaque apparaît comme bénéfique dans la défaillance cardiaque. Il appert que l'action de l'ET-1 ressemblerait à celle d'autres agents vasoactifs endogènes, tels que la noradrénaline et l'angiotensine II. Cependant, il ne faut pas oublier que notre étude a été réalisée à l'aide de coeurs isolés, éliminant de ce fait les interactions possibles entre les facteurs sanguins et l'ET-1. Ainsi il a été rapporté que les macrophages et les leucocytes polymorphonucléaires synthétisent l'ET-1 alors que la thrombine et les plaquettes stimulent sa production. De plus, l'ET-1 potentialise les effets vasoconstricteurs des catécholamines, de la sérotonine et de l'angiotensine II (Zeihner et coll. 1995).

3.5 Portée clinique des résultats

Nos résultats démontrent que l'ET-1 ne semble pas impliquée dans le maintien du tonus coronarien du coeur défaillant, ce qui n'en fait pas un médiateur des dysfonctions coronariennes observées dans cette condition. Par contre, l'ET-1 joue un rôle important dans le maintien de la contractilité cardiaque. Cette dernière observation suggère que

l'utilisation thérapeutique d'inhibiteur de la synthèse de l'ET-1 ou d'un antagoniste des récepteurs ET_A comporterait un risque chez les patients dont la fonction cardiaque est déprimée. Le développement d'antagonistes des récepteurs ET_A plus sélectifs pour les récepteurs localisés sur le muscle lisse vasculaire semble nécessaire et permettrait un usage thérapeutique plus sécuritaire chez les insuffisants cardiaques.

Plusieurs antagonistes spécifiques des récepteurs ET_A ou mixtes ET_A/ET_B sont présentement en début d'étude clinique, certains de nature peptidergique, d'autres pouvant être administrés par voie orale (Ferro et Webb 1996). Il reste à déterminer lesquels se montreront les plus efficaces. L'implication de l'ET-1 dans une multitude de situations pathologiques telles l'hypertension pulmonaire, l'infarctus du myocarde, l'angine instable et l'insuffisance rénale fait en sorte que l'apparition des antagonistes des récepteurs de l'ET-1 ou des inhibiteurs de sa synthèse pourrait apporter une contribution importante à l'arsenal thérapeutique actuel. Par contre, nos résultats suggèrent des actions cardiaques et vasculaires opposées. Il reste donc beaucoup d'études à faire pour intégrer tous les effets de l'activation de la voie de l'ET-1 et permettre le développement d'antagonistes efficaces.

BIBLIOGRAPHIE

Anonyme, *Principales causes de décès sélectionnées, selon le sexe, Canada, 1994*, Statistiques Canada, Division des statistiques sur la santé, http://www.statcan.ca/Francais/Pgdb/People/Health/Death_F.htm, 1997.

Braunwald E, Colucci WS, Grossman W, *Clinical aspects of heart failure: High-output heart failure; pulmonary edema.*, tiré de *Heart disease. A textbook of cardiovascular medicine*, 5th ed., volume 1, WB Saunders Company, USA, 445-70, 1997.

Brunner F, *Cardiac tissue endothelin-1 levels under basal, stimulated and ischemic conditions*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 26 (suppl. 3): S44-6, 1995.

Buser PT, Auffermann W, Wu ST, Jasmin G, Parmley WW, Wikman-Coffelt J, *Dobutamine potentiates amrinone's beneficial effects in moderate but not in advanced heart failure. ³¹P MRS in isolated hamster hearts*, *Circ. Res.*, 66: 747-53, 1990.

Buser PT, Camacho SA, Wu ST, Higgins CB, Jasmin G, Parmley WW, Wikman-Coffelt J, *The effect of dobutamine on myocardial performance and high-energy phosphate metabolism at different stages of heart failure in cardiomyopathic hamsters: a ³¹P MRS study*, *Am. Heart J.*, 117: 86-91, 1989.

Buser PT, Wu ST, Parmley WW, Jasmin G, Wikman-Coffelt J, *Distinct modulation of myocardial performance, energy metabolism, and $[Ca^{2+}]_i$ transients by positive inotropic drugs in normal and severely failing hamster hearts*, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 9 (1): 151-7, 1995.

Calderone A, Rouleau JL, de Champlain J, Bélichard P, Stewart DJ, *Regulation of the endothelin-1 transmembrane signaling pathway: the potential role of agonist-induced desensitization in the coronary artery of the rapid ventricular pacing-overdrive dog model of heart failure*, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 25: 895-903, 1993.

Camacho SA, Wikman-Coffelt J, Wu ST, Watters TA, Botvinick EH, Sievers R, James TL, Jasmin G, Parmley WW, *Improvement in myocardial performance without a decrease in high-energy phosphate metabolites after isoproterenol in Syrian cardiomyopathic hamster*, *Circulation*, 77: 712-9, 1988.

Cannan CR, Burnett JC Jr, Brandt RR, Lerman A, *Endothelin at pathophysiological concentrations mediates coronary vasoconstriction via the endothelin-A receptor*, *Circulation*, 92: 3312-7, 1995.

Cannan CR, Burnett JC Jr, Lerman A, *Enhanced coronary vasoconstriction to endothelin-B-receptor activation in experimental congestive heart failure*, *Circulation*, 93: 646-51, 1996.

Cannon RO, Cunnion RE, Parillo JE, Palmeri ST, Tucker EE, Schenke WH, Epstein SE, *Dynamic limitation of coronary vasodilator reserve in patients with dilated cardiomyopathy and chest pain*, J. Am. Coll. Cardiol., 10: 1190-200, 1987.

Chemla D, Scalbert E, Desché P, Lecarpentier Y, *La cardiomyopathie du hamster syrien*, Arch. Mal. Coeur, 84 (IV): 85-7, 1991.

Clozel M, Gray GA, Breu V, Löffler B, Osterwalder R, *The endothelin ET_B receptor mediates both vasodilation and vasoconstriction in vivo*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 186: 867-73, 1992.

Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, Carpers Q, Kelley R, *Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure*, Circulation, 85: 504-9, 1992.

Cohn JN, *Neuroendocrine activation after acute myocardial infarction*, Am. J. Cardiol., 65: 281-311, 1990.

Colucci WS, *Myocardial endothelin. Does it play a role in myocardial failure?*, Circulation, 93: 1069-72, 1996.

Conway RS, Factor SM, Sonnenblick EH, Baez S, *Microvascular reactivity of the myopathic Syrian hamster cremaster muscle*, Cardiovasc. Res., 21: 796-803, 1987.

Conway RS, Natelson BH, Chen WH, Ting W, *Enhanced coronary vasoconstriction in the Syrian myopathic hamster supports the microvascular spasm hypothesis*, *Cardiovasc. Res.*, 28: 320-4, 1994.

Davenport AP, Kuc RE, Maguire JJ, Harland SP, *ET_A receptors predominate in the human vasculature and mediate constriction*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 26 (suppl 3): S265-7, 1995.

Delehanty JM, Himura Y, Elam H, Hood WB, Liang CS, *β -adrenoceptor downregulation in pacing-induced heart failure is associated with increased interstitial NE content*, *Am. J. Physiol.*, 266: H930-5, 1994.

Douglas SA, Beck GR Jr, Elliott JD, and Ohlstein EH, *Pharmacologic evidence for the presence of three functional endothelin receptor subtypes in rabbit saphenous vein*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 26 (Suppl. 3): S163-8, 1995.

Du XJ, Riemersma RA, *Effects of presynaptic α -adrenoreceptors and neuronal reuptake on noradrenaline overflow and cardiac response*, *Eur. J. Pharmacol.*, 211: 221-6, 1992.

Ducimetière P, Richard JL, *Insuffisance cardiaque et hypertrophie ventriculaire gauche dans la population, tiré de Recherches en...Hypertrophie et insuffisance cardiaques*, INSERM, France, 3-8, 1990.

Ertl G, Kochsiek K, *Development, early treatment, and prevention of heart failure*, Circulation, 87 (suppl IV): IV-1-IV-3, 1993.

Factor SM, Minase T, Cho S, Dornitz R, Sonnenblick EH, *Microvascular spasm in the cardiomyopathic Syrian hamster: a preventable cause of focal myocardial necrosis*, Circulation, 66: 342-54, 1982.

Ferro CJ, Webb DJ, *The clinical potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular medicine*, Drugs, 51 (1); 12-27, 1996.

Forfar JC, *Neuroendocrine activation in congestive heart failure*, Am. J. Cardiol., 67: 3C-5C, 1991.

Francis GS, Goldsmith SR, Ziesche SM, Cohn JM, *Response of norepinephrine and epinephrine to dynamic exercise in patients with congestive heart failure*, Am. J. Cardiol., 49: 1152-6, 1982.

Frelin C, Guedin D, *Why are circulating concentrations of endothelin-1 so low?*, Cardiovasc. Res., 28 (11): 1613-22, 1994.

Fu L-X, Sun X-Y, Hedner T, Feng Q-P, Liang Q-M, Hoebeke J, Hjalmarson A, *Decreased density of mesenteric arteries but not of myocardial endothelin receptors and function in rats with chronic ischemic heart failure*, J. Cardiovasc. Pharmacol., 22: 177-82, 1993.

Fukuda K, Hori S, Kusuhara M, Satoh T, Kyotani S, Handa S, Nakamura Y, Oono H, Yamaguchi K, *Effect of endothelin as a coronary vasoconstrictor in the Langendorff-perfused rat heart*, Eur. J. Pharm., 165: 301-4, 1989.

Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, and Nishikibe M, *Clearance of circulating endothelin-1 by ET_B receptors in rats*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 199: 1461-5, 1994.

Godfraind T, *Evidence for heterogeneity of endothelin receptor distribution in human coronary artery*, Br. J. Pharmacol., 110 (3): 1201-5, 1993.

Grover GJ, Sleph PG, Fox M, Trippodo NC, *Role of endothelin-1 and big-endothelin-1 in modulating coronary vascular tone, contractile function and severity of ischemia in rat hearts*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 263: 1074-82, 1992.

Haleen SJ, Weishaar RE, Overhiser RW, Bousley RF, Keiser JA, Rapundalo SR, Taylor DG, *Effects of quinapril, a new angiotensin converting enzyme inhibitor, on left ventricular failure and survival in the cardiomyopathic hamster*, *Circ. Res.*, 68: 1302-12, 1991.

Hano O, Lakatta EG, *Diminished tolerance of prehypertrophic, cardiomyopathic Syrian hamster hearts to Ca^{2+} stresses*, *Circ. Res.*, 69: 123-33, 1991.

Harding SE, Poole-Wilson PA, *Beta-adrenoceptors in heart failure: a mechanism or a cAMP follower?*, *tiré de Heart failure mechanisms and management*, Springer-Verlag, Germany, 15-20, 1991.

Haynes WG, Strachan FE, Gray GA, and Webb DJ, *Forearm vasoconstriction to endothelin-1 is mediated by ET_A and ET_B receptors in vivo in humans*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 26 (Suppl. 3): S40-3, 1995.

Haynes WG et Webb DJ, *Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone*, *Lancet*, 344: 852-4, 1994.

Hickey KA, Rubanyi GM, Paul RJ, Highsmith RF, *Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells*, *Am. J. Physiol.*, 248: C550-6, 1985.

Hirsch AT, Dzau VJ, Creager MA, *Baroreceptor function in congestive heart failure: effect on neurohumoral activation and regional vascular resistance*, *Circulation*, 75 (suppl. IV): IV-36-48, 1987.

Hunter EG, Elbrink J, *Increased contractility in vascular smooth muscle of dystrophic hamsters*, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 61: 182-5, 1988.

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T, *The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2863-7, 1989a.

Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T, *The human preproendothelin 1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression*, *J. Biol. Chem.*, 264: 14954-9, 1989b.

Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T, *Positive inotropic action of a novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea-pig atria*, *Am. J. Physiol.*, 255: H970-3, 1988a.

Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T, *Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide*, *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, 413: 108-10, 1988b.

Jasmin G, Eu HY, *Cardiomyopathy of hamster dystrophy*, Ann. NY Acad. Sci., 317: 46-58, 1979.

Kannel WB, Plehn JF, Cupples LA, *Cardiac failure and sudden death in the Framingham study*, Am. Heart J., 115: 869-75, 1988.

Karne S, Jayawickreme C, Lerner MR, *Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET_C receptor) from Xenopus laevis dermal melanophores*, J. Biol. Chem., 268: 19126-33, 1993.

Katzung BG, *Basic and clinical pharmacology*, 6th ed., Appleton & Lange, USA, 115-31, 1995.

Kiowski W, Sütsch G, Hunziker P, Müller P, Kim J, Oeschlin E, Schmitt R, Jones R, and Bertel O, *Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure*, Lancet, 346: 732-6, 1995.

Kloog Y, Sokolovsky M, *Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins*, Trends Pharmacol. Sci., 10: 212-4, 1989.

Krause SM, Lynch JJ, Stabilito SI, Woltmann RF, *Intravenous administration of the endothelin-1 antagonist BQ-123 does not ameliorate myocardial ischaemic injury following acute coronary artery occlusion in the dog*, Cardiovasc. Res., 28: 1672-8, 1994.

La M, Reid J, *Endothelin-1 and the regulation of vascular tone*, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 22: 315-23, 1995.

Lamping KG, Clothier JL, Eastham CL, Marcus ML, *Coronary microvascular response to endothelin is dependent on vessel diameter and route of administration*, Am. J. Phys., 263: H703-9, 1992.

Larosa G, Armstrong PW, and Forster C, *Endothelium-dependent relaxations in canine coronary arteries are enhanced in early failure and persist in recovery*, Can. J. Phys. Pharm., 72: 1148-54, 1994.

LeJemtel TH, Sonnenblick EH, *Heart failure: adaptive and maladaptive processes*, Circulation, 87 (suppl VII): VII-1-VII-4, 1993.

Lerman A, Hildebrand FL Jr, Aarhus LL, Burnett JC Jr, *Endothelin has biological actions at pathophysiological concentrations*, Circulation, 83: 1808-14, 1991.

Li K, Stewart DJ, Rouleau JL, *Myocardial contractile actions of endothelin-1 in rat and rabbit papillary muscles. Role of endocardial endothelium*, Circ. Res., 69: 301-12, 1991.

Lüscher TF, and Noll G, *Endothelium dysfunction in the coronary circulation*, J. Cardiovasc. Pharm., 24 (suppl. 3): S16-26, 1994.

Masaki T, Vane JR, Vanhoutte PM, *International union of pharmacology nomenclature of endothelin receptors*, Pharmacological Reviews, 46 (2): 137-42, 1994.

McMahon EG, Palomo MA, Moore WM, McDonald JF, Stern MK, *Phosphoramidon blocks the pressor activity of porcine big-endothelin-1 (1-39) in vivo and conversion of big-endothelin-1 (1-39) to endothelin-1 (1-21) in vitro*, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 88: 703-7, 1991.

Mercadier JJ, Michel JB, *Modifications hormonales dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques, tiré de Recherches en...Hypertrophie et insuffisance cardiaques*, INSERM, France, 523-62, 1990.

Miller WL, Redfield MM, Burnett JC, *Integrated cardiac, renal and endocrine actions of endothelin*, J. Clin. Invest., 83: 317-20, 1989.

Minatoguchi S, Ito H, Ishimura K, Watanabe H, Imai Y, Koshiji M, Asano K, Hirakawa S, Fujiwara H, *Modulation of noradrenaline release through presynaptic α_2 -adrenoreceptors in congestive heart failure*, Am. Heart J., 130: 516-21, 1995.

Minatoguchi S, Majewski H, *Modulation of norepinephrine release in adriamycin-induced heart failure in rabbits: Role of presynaptic α_2 -adrenoceptors and presynaptic angiotensin II receptors*, J. Cardiovasc. Pharmacol., 23: 438-45, 1994.

Miyaguchi T, Sakai S, Ihara M, Kasuya Y, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y, *Increased endothelin-1 binding sites in the cardiac membranes in rats with chronic heart failure*, J. Cardiovasc. Pharmacol., 26 (suppl 3): S448-51, 1995.

Nakamura M, Arakawa N, Yoshida H, Funakoshi T, Chiba M, Abe Y, Makita S, Aoki H, and Hiramori K, *Increased plasma endothelin concentrations in patients with acute heart failure after myocardial infarction*, Japanese Circ. J., 57: 371-8, 1993.

Nitenberg a, Foulst JM, *Circulation coronaire. Données cliniques, tiré de Recherches en...Hypertrophie et insuffisance cardiaques*, INSERM, France, 591-612, 1990.

Noll G, Tschudi MR, Novosed D, Lüscher TF, *Activity of the arginine/nitric oxide pathway and endothelin-1 in experimental heart failure*, J. Cardiovasc. Pharmacol., 21: 916-21, 1994.

O'Murchu B, Miller VM, Perrella MA, and Burnett JC Jr, *Increased production of nitric oxide in coronary arteries during congestive heart failure*, J. Clin. Invest., 93: 165-71, 1994.

Ono K, Eto K, Masaki T, Sada T, Hashimoto K, Tsujimoto G, *Negative chronotropic effect of endothelin 1 mediated through ET_A receptors in guinea pig atria*, Circ. Res., 76: 284-92, 1995.

Pasternac A, Noble J, Streulens Y, Elie R, Henschke C, Bourassa MG, *Pathophysiology of chest pain in patients with cardiomyopathies and normal coronary arteries*, *Circulation*, 65: 778-89, 1982.

Riegger AJG, *Hormones in heart failure-regulation and counterregulation*, *Eur. Heart J.*, 12 (suppl. D): 190-2, 1991.

Rosendorff C, *Autonomic receptor function in congestive heart failure*, tiré de *Heart failure mechanisms and management*, Springer-Verlag, Germany, 3-14, 1991.

Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Kasuya Y, Ihara M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y, *Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. Marked increase in endothelin-1 production in the failing heart*, *Circulation*, 93: 1214-22, 1996.

Schiffrin EL, *L'endothéline est-elle impliquée dans l'hypertension?*, *Médecine/Sciences*, 12: 599-607, 1996.

Shichiri M, Hirata Y, Ando K, Emori T, Ohta K, Himoto S, Ogura M, Inoue A, and Marumo F, *Plasma endothelin levels in hypertension and chronic renal failure*, *Hypertension*, 15 (5): 493-6, 1990.

Shimoyama H, Sabbah HN, Borzak S, Tanimura M, Shevlyagin S, Scicli G, Goldstein S, *Short-term hemodynamic effects of endothelin receptor blockade in dogs with chronic heart failure*, *Circulation*, 94: 779-84, 1996.

Smith HJ, Nuttal A, *Experimental models of heart failure*, *Cardiovasc. Res.*, 19: 181-6, 1985.

Sonnenblick EH, Fein F, Capasso JM, Factor SM, *Microvascular spasm as a cause of cardiomyopathies and the calcium-blocking agent verapamil as potential primary therapy*, *Am. J. Cardiol.*, 55: 179B-84B, 1985.

Sonnenblick EH, LeJemtel TH, Anversa P, *Heart failure: etiological models and therapeutic challenges, tiré de Heart failure mechanisms and management*, Springer-Verlag, Germany, 33-41, 1991.

Stefenelli T, Wu ST, Parmley WW, Mason DT, Wikman-Coffelt J, *Influence of positive inotropic agents on intracellular calcium transients. Part II. Cardiomyopathic hamster hearts*, *Am. Heart J.*, 118: 1228-36, 1989.

Swynghedauw B, *Recherches en...Hypertrophie et insuffisance cardiaques*, INSERM, France, 1, 1990.

Tanguay M, Jasmin G, Blaise G, Dumont L, *Resistance of the failing dystrophic hamster heart to the cardioprotective effects of diltiazem and clentiazem: evidence of coronary vascular dysfunctions*, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 73: 1108-17, 1995.

Tanguay M, Jasmin G, Blaise G, Dumont L, *Impaired coronary sensitivity to diltiazem in experimental heart failure: involvement of the cyclooxygenase but not the nitric oxide-synthase pathway*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 28: 232-9, 1996.

Toyo-oka T, Wang Y, Inukai M, Sakamoto A, *An endothelin family: recent progress in basic and clinical science*, *Update of review in Coronary artery disease* (2: 314-22), 65-71, 1991a.

Toyo-oka T, Aizawa T, Suzuki N, Hirata Y, Miyauchi T, Shin WS, Yanagisawa M, Masaki T, and Sugimoto T, *Increased plasma level of endothelin-1 and coronary spasm induction in patients with vasospastic angina pectoris*, *Circulation*, 83: 476-83, 1991b.

Traverse JH, Judd D, Bache RJ, *Dose-dependent effect of endothelin-1 on blood flow to normal and collateral-dependent myocardium*, *Circulation*, 93: 558-66, 1996.

Treasure CB, Vata JA, Cox DA, Fish D, Gordon JB, Mudge GH, Colucci WS, St-John MG, Selwyn AP, Alexander RW, Ganz P, *Endothelium-dependent dilation of the coronary microvasculature is impaired in dilated cardiomyopathy*, *Circulation*, 81: 772-9, 1990.

Turner AJ, Murphy LJ, *Molecular pharmacology of endothelin converting enzymes*, *Biochem. Pharmacol.*, 51: 91-102, 1996.

Unverferth DV, Magorien RD, Lewis RP, Leier CV, *The role of subendocardial ischemia in perturbing myocardial failure in patients with nonischemic congestive heart failure*, *Am. J. Cardiol.*, 105: 176-9, 1983.

van Riper DA, McDaniel NL, Rembold CM, *Myosin light chain kinase phosphorylation in nitrovasodilator induced swine carotid artery relaxation*, *Biochimica Biophys. Acta*, 1355: 323-30, 1997.

Vatner SF, *Reduced subendocardial myocardial perfusion as one mechanism for congestive heart failure*, *Am. J. Cardiol.*, 62: 94E-98E, 1988.

Véronneau M, Tanguay M, Fontaine E, Jasmin G, and Dumont L, *Endothelium-mediated dilation of coronary resistance vessels is maintained in the failing hamster heart*, *Cardiovasc. Res.*, 33: 623-30, 1997.

Wang J, Seyedi N, Xu XB, Wolin MS, and Hintze TH, *Defective endothelium-mediated control of coronary circulation in conscious dogs after heart failure*, *Am. J. Phys.*, 266: H670-80, 1994.

Wang Q-D, Li XS, Pernow J, *Characterization of endothelin-1-induced vascular effects in the rat heart by using endothelin receptor antagonists*, Eur. J. Pharmacol., 271: 25-30, 1994.

Wang Q-D, Pernow J, *The nonpeptide endothelin receptor antagonist bosentan enhances myocardial recovery and endothelial function during reperfusion of the ischemic rat heart*, J. Cardiovasc. Pharmacol., 26 (suppl 3): S445-7, 1995.

Warner TD, Allcock GH, Corder R, and Vane JR, *Use of the endothelin antagonists BQ123 and PD142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and release of EDRF*, Br. J. Pharmacol., 110: 777-82, 1993.

Warner TD, Mitchell JA, De Nucci G, Vane JR, *Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of rat and rabbit*, J. Cardiovasc. Pharmacol., 13 (suppl. 5): S85-8, 1989.

Weiss MB, Ellis K, Sciacca RR, Johnson LL, Schmidt DH, Cannon PJ, *Myocardial blood flow in congestive and hypertrophic cardiomyopathy*, Circulation, 54: 484-94, 1976.

Weissberg PL, Witchell C, Davenport A, Hesketh TR, Metcalfe JC, *The endothelin peptides ET-1, ET-2, ET-3 and sarafotoxin S6b are co-mitogenic with platelet-derived growth factor for vascular smooth muscles*, Atherosclerosis, 85: 257-62, 1990.

Wikman-Coffelt J, Stefenelli T, Wu ST, Parmley WW, Jasmin G, $[Ca^{2+}]_i$ transients in the cardiomyopathic hamster heart, *Circ. Res.*, 68: 45-51, 1991.

Yanagisawa M, Kuhihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, and Masaki T, *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells, Nature*, 332: 411-5, 1988.

Zeiber AM, Goebel H, Schächinger V, Ihling C, *Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. A clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina, Circulation*, 91: 941-7, 1995.